

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologie végétale

**CARACTERISATION BIOCHIMIQUE, HISTOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE
D'UNE PLANTE MEDICINALE(BEROUSTOUM), *Aristolochia longa* L.**

Par

CHERIF Hamida–Saida

Devant le jury composé de :

M. Khali	Maître de Conférences A, U S D de Blida	Président
M. Bendahmene	Professeur, U de Sidi-bel-abbès	Examinatrice
S. Aouichet-Bouguerra	Professeur, USTHB	Examinatrice
L. Khelifi	Professeur, ENSA	Examineur
M. Benchabane	Maître de Conférences A, U S D de Blida	Examineur
F. SAIDI	Professeur, U S D de Blida	Promoteur

Blida, Mai 2012

RESUME

Cette étude concerne une plante utilisée en médecine populaire Algérienne, *Aristolochia longa* L. Le travail porte sur des enquêtes ethnobotaniques effectuées sur terrain, et sur la détermination de quelques caractères biochimiques, principalement la teneur en acides aristolochiques, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), des essais de culture *in vitro*, ainsi qu'un test préliminaire de toxicité aigue de l'aristoloche.

La fraction minérale des cendres analysée par chromatographie ionique et par spectrométrie d'absorption atomique montre que le sodium (40%) et le calcium (30%) sont les cations majoritaires. Le nitrite (46%) est l'anion dominant. 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 CG/SM des huiles essentielles extraites des feuilles. L'analyse par CG/SM des huiles essentielles extraites des feuilles sèches, a permis de distinguer un ensemble de pics, dont trois majoritaires : le Diisocylfталate (DOP), le s-Indacen et le Deenaxe. Le profil lipidique déterminé au niveau des feuilles, tubercules et fruits, montre que cette plante est riche en acides palmitique et linoléique.

La multiplication d'*Aristolochia longa* L. par culture *in vitro* par voie directe et indirecte, a abouti à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des explants en l'occurrence le HgCl₂ à 0.6g/l pendant 10min.

Par ailleurs, le milieu de base MS complété avec 1.5mg/ BAP et 0.5mg/l ANA s'est révélé le meilleur milieu car il favorise le développement des bourgeons. L'élongation est plus favorable sur le milieu MS avec 1.5 mg/ l GA3 et dans MS avec 0.5 mg/l GA3 et 1mg/l ANA.

Le test du pouvoir antibactérien des différentes concrètes alcooliques, de l'huile essentielle et de l'acide aristolochique purifié à partir des tubercules, montre qu'ils sont actifs sur *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et inactifs sur *E. coli* et *Candida albicans*. Les essais préliminaires de la toxicité ont mis en évidence le caractère toxique de la plante, à forte dose.

Mots clés : *Aristolochia longa* L., enquêtes ethnobotaniques, caractérisation biochimique, acide aristolochique, culture *in vitro*, toxicité aigue.

SUMMARY

This study is related to a plant used in Algerian popular medicine, *Aristolochia longa* L. The work concerns the ethnobotanic investigations carried out into the field, and the determination of several biochemical characteristics, mainly the content of aristolochic acids, by high performance liquid chromatography (HPLC), *in vitro* culture assay, in addition to *Aristolochia longa* L. preliminary test of acute toxicity.

The mineral fraction of ashes analyzed by ionic chromatography and atomic absorption spectrometry shows that sodium (40%) and calcium (30%) are the majority cations. The nitrite (46%) is the dominating anion. The aristolochic acid purification reveals that, *Aristolochia longa* L. is rich with this acid. Indeed we identified two aristolochic acids I and II, in the flowering period and after maturity of seeds, in leaves (0.0099%) and tubers (0.025%). The analysis by CG/SM of the essential oils extracted from dry leaves, allowed us to distinguish a lot of peaks, including three dominants: the Diisooctylfthalate (DOP), the S-Indacen and Deenaxe. The lipidic profile in leaves, tubers and fruits, shows that this plant is rich in palmitic and linoleic acids.

The *in vitro* culture of *Aristolochia longa* L. by direct and indirect way, has leads to the determination of a methodology for a better disinfection of explants: the HgCl_2 with 0.6g/l during 10 minutes. In addition, basic medium MS supplemented with 1.5mg/BAP and 0.5mg/l ANA appears to be the best medium which supports the development of the buds. The elongation is more favorable on medium MS with 1.5 mg/l GA3 and in MS with 0.5 mg/l GA3 and 1mg/l ANA.

The test of the antibacterial activity of the various alcoholics concretes, of the essential oil and the purified aristolochic acid of tubers, reveals that they are active on *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* and inactive on *E. coli* and *Candida albicans*. The toxic character was reveal at high dose

Key words: *Aristolochia longa* L., ethnobotanic investigations, biochemical characterization, aristolochic acid, *in vitro* culture, acute toxicity

ملخص

يتعلق هذا البحث في دراسة نبتة طبية جد مستعملة في الطب الشعبي الجزائري و يتعلق الأمر بنبتة لونغا زراود (*Aristolochia longa* L.) حيث تم من خلال هذه الدراسة إجراء مسح "إثنونباتي" و تحديد بعض الخصائص الكيميائية الحيوية و بالخصوص نسبة الأحماض الأريستولوشية (acides aristolochiques) بواسطة إستعمال طريقة التحليل الكروماتوغرافي اللوني السائل العالي الأداء (HPLC) بالإضافة إلى إجراء تجارب زرع النبتة داخل أنابيب إختبار و تحديد مدى إحتوائها على أعراض سمومة حادة.

كشفت مختلف الفحوص الكروماتوغرافية الأيونية و الإمتصاص الذري الطيفي أن الرماد المعدنية للنبتة تحتوي على مجموعة من الأملاح المعدنية من أهمها الصوديوم (40 %) و الكالسيوم (30 %) و النيتريت (46 %). كذلك فقد كشفت عملية تنقية حمض الأريستولوش أن نبتة الزراوند غنية بهذا الحمض حيث تبين أن نسبته ضئيلة نوعا ما (0.0099 %) على مستوى الأوراق خلال فترة الإزدهار وذلك بالمقارنة مع الدرنات (0.025 %). كما سجل إرتفاع هذه النسبة بعد نضج البذور.

أما بالنسبة للفحص الكروماتوغرافي (CG-SM) فقد كشف أن الزيوت الأساسية لهذه النبتة، و المستخرجة من الأوراق الجافة، تحتوي على ثلاثة عناصر أساسية ((Diisooctylftalate (DOP)، s- Indacen، Deenaxe) في حين تتميز الزيوت النباتية المستخلصة من الأوراق و الدرنات و الثمار بغناها بحمض النخيل (acide palmitique) و حمض ليونولينيك (acide linoléinique).

لقد سمحت عملية التكاثر المخبري لنبتة الزراوند بالطريقة المباشرة و الغير مباشرة عن تحديد المنهجية الفعالية في تطهير و تنقية أعضاء النبتة و المتمثلة في HgCl₂ بنسبة 0.6 غرام/لتر و لمدة زمنية تقدر ب 10 دقائق. من جهة أخرى فإن الوسط الغذائي MS و المضاف إليه 1.5 ملغ/ل من BAP و 0.5 ملغ/ل من ANA يعتبر الأمثل كون أنه يساعد في نمو و تطوير البراعم.

أما بالنسبة لفحص مدى فعالية مستخلصات النبتة الكحولية و الزيوت الأساسية و حمض الأريستولوش على نمو و تطور الجراثيم، فقد كشفت هذه الدراسة عن أن تلك المستخلصات جد فعالة كون أنها تثبطت نمو بعض البكتيريا (*Proteus vulgaris*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*) في حين لم يكن لها أي تأثير على جراثيم أخرى (*Candida albicans*، *E. Coli*). أخيرا، فقد كشفت مختلف التحاليل الأولية عن سمومية النبتة عند إستعمال الجرعة العالية.

الكلمات الرئيسية: *Aristolochia longa* L.، الفحوص الكيميائية الحيوية، حمض الأريستولوش، نمو النبات في أنابيب إختبار الفعالية ضد الجراثيم، السمية.

Remerciements

Merci à Dieu le tout puissant de m'avoir accordé courage et volonté pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements et ma vive reconnaissance à Madame le Professeur SAIDI F, ma directrice de thèse, pour ses conseils et son aide en toutes circonstances.

Son soutien moral sans faille et sa confiance m'ont encouragé à persévérer dans ce travail, qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude.

Avec une immense joie, j'ai l'honneur d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur KHALI .M, maître de conférence-A-à l'université de Blida, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, un grand merci lui est adressé pour son soutien durant ce parcours. Mes remerciements vont également à Mesdames, le Professeur Bendahmene. M, de l'université de Sidi-bel-abbès, et le Professeur Aouichat-Bouguerra. S de l'USTHB, qui me font l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Khelifi. L de l'ENSA et Monsieur Benchabane. M , de l'USDB, d'avoir accepté de juger ce travail.

Ma sincère gratitude est transmise à Monsieur CHELHA directeur du laboratoire de culture in vitro de l'ENARP et tout le personnel de cet établissement, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci est adressé à toutes les personnes du complexe Antibiotical de Médéa – Groupe Saidal en particulier : Monsieur Nemri, chef de service du laboratoire de toxicologie, Monsieur Kermich, Monsieur Benaouda et Monsieur Medjedji et tout le personnel des laboratoires de pharmacotoxicologie, stérilité, microbiologie et physicochimie.

Un grand merci est adressé aux personnels des laboratoires de la police scientifique(Alger) et le centre de recherche nucléaire de Draria .

Je ne voudrais pas omettre de remercier le Recteur de l'université des Sciences Agricoles et médecine vétérinaire de Cluj-Napoca, Monsieur le Professeur. Dr.Doru Pamfil, ainsi que le personnel du département de Biochimie, surtout Madame le Professeur Socacciu Carmen, Monsieur le Professeur Béle. C et Mateas . C , pour toute leur aide et disponibilité .

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation de ce travail, un grand merci s'adresse en particulier à Monsieur Rouibi, Monsieur Boukhatem, Madame Metidji .H , Madame Bensalah. L , Madame Benouaklil . F et Madame Brahim-Errahmani . D, du laboratoire de la post graduation de Biotechnologie végétale, département de biologie.

Je tiens à exprimer une reconnaissance particulière à Monsieur le Professeur Kaidi et Madame Kaidi du département de Biologie, pour leur amitié et encouragements.

Que mes collègues du département de biologie et toutes les personnes qui m'ont aidé et ont voulu voir le fruit de ce travail, trouvent ici l'assurance de ma sincère gratitude.

A tous je dis Merci !!!

Hamida- Saida

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes plus cher ;,

Ma défunte mère, qui nous a transmit le sens du devoir et du sacrifice.

A mon père – Poupa qui nous a guidé vers la connaissance et le savoir.

A mon mari pour sa patience, sa gentillesse et sa présence à mes côtés dans les moments les plus durs, merci à toi, Hatem, je ne sais pas si j'aurais pu mener à terme ma thèse sans ton aide. Ce travail c'est le tien aussi

A la prunelle de mes yeux : mes enfants Rached, Seif et Amir. Merci de m'avoir fait découvrir la plus belle chose qui soit à mes yeux : la maternité.

A ma belle famille, surtout ma belle mère et mon beau père – mes seconds parents, pour leurs encouragements

A mes frères et sœurs dont la tendresse et la compréhension ont été d'un grand soutien moral.

A mes beaux frères, mes belles sœurs, mes neveux et mes nièces,

A Madame Saidi F. pour tout ce qu'elle représente pour moi.

Que mes amis(es) les plus chers trouvent ici l'expression de toute ma gratitude et affection

Hamida- Saida

TABLE DE MATIERES

RESUME

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Historique

1.2. La phytothérapie

1.3. Généralités sur les Aristoloches

1.4. Historique d'*Aristolochia longa* L.

1.5. Description botanique de la plante

1.6 .Etymologie

1.7. Systématique

1.8. Répartition

1.9. Composition chimique d'*Aristolochia longa* L.

1.10. Vertus d'*Aristolochia longa* L.

1.11. Les Etapes d'étude d'une plante médicinale

2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSE

2.1. Matériel d'études

2.1.1. Matériel non biologique

2.1.2. Matériel végétal

2.1.3 Matériel animal

2.2 .Méthodes

2.2.1. Etude ethnobotanique

2.2.2. Etude macroscopique et microscopique

2.2.3. Etude phytochimique

2.2.4. Essai bactériologique

2.2.5. Etude préliminaire de la toxicité aigue de *Aristolochia longa* L .

2.2.6. Essais de culture In Vitro

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'étude ethnobotanique

3.2. Résultats de l'étude macroscopique et microscopique *Aristolochia longa* L

3.3. Résultats de l'étude phytochimique

3.4. Résultats des essais bactériologiques

3.5. Résultats des essais de culture *in Vitro*

3.6. Résultats de l'étude préliminaire de la toxicité d'*Aristolochia longa* L

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

APPENDICES

Liste des figures et des tableaux

Figure 1.1	Les poils internes au niveau de la fleur	22
Figure 1.2	Tubercule d' <i>Aristolochia longa</i> L. (8x3 cm)	30
Figure 1.3	Tiges d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	30
Figure 1.4	Forme et Nervures palmées au niveau de la feuille.....	31
Figure 1.5	Fleurs d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	33
Figure 1.6	Structure interne des fleurs d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	33
Figure 1.7	Fruits d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	34
Figure 1.8	Grains d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	34
Figure 2.1	Etape de la double coloration.....	50
Figure 2.2	Type d'étiquetage.....	76
Figure 3.1	Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie	80
Figure 3.2	Pourcentage des utilisateurs de la phytothérapie.....	81
Figure 3.3	Pourcentage des connaisseurs de l'Aristolochie.....	82
Figure 3.4	Pourcentage des sources de connaissances.....	83
Figure 3.5	Pourcentage des maladies traitées par l'Aristolochie.....	84
Figure 3.6	Pourcentage des parties utilisées de la plante.....	85
Figure 3.7	Pourcentage des résultats d'utilisation de l'Aristolochie.....	86
Figure 3.8	Pourcentage des effets secondaires.....	87
Figure 3.9	Pourcentage des traitements adoptés par les personnes interrogées.....	88
Figure 3.10	Position des étamines par rapport à l'ovaire.....	89
Figure 3.11	Coupe transversale dans la partie supérieure de l'ovaire.....	89
Figure 3.12	Coupe transversale au niveau de l'ovaire.....	90
Figure 3.13	Grains de pollen d' <i>Aristolochia longa</i> L	90
Figure 3.14	Coupe transversale de la tige	93
Figure 3.15	Coupe transversale au niveau du limbe de la feuille.....	94
Figure 3.16	Poils técteurs de la feuille de <i>Aristolochia longa</i> L.(G x 4).....	95
Figure 3.17	Chromatogramme des cations dans les cendres.....	97
Figure 3.18	Chromatogramme des anions dans les cendres.....	98
Figure 3.19	Balayage par spectrophotométrie UV- visible de la concrète apolaire des tubercules.....	101
Figure 3.20	Balayage par spectrophotomètre UV-VI de la concrète apolaire des feuilles.....	102
Figure 3.21	Balayage par spectrophotométrie UV- visible de la concrète polaire des tubercules.....	104
Figure 3.22	Balayage par spectrophotométrie UV- visible de la concrète polaire des feuilles.....	105
Figure 3.23	Séparation des métabolites secondaires par Chromatographie sur couche mince.....	107
Figure 3.24	Composition des tubercules	109
Figure 3.25	Analyse du standard par HPLC (période de floraison).....	111
Figure 3.26	Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC.....	112
Figure 3.27	Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC.....	113
Figure 3.28	Analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles par HPLC	114
Figure 3.29	Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC.....	115
Figure 3.30	Analyse du standard par HPLC (après maturité des graines.....	117

Figure 3.31	Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC.....	118
Figure 3.32	Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC.....	119
Figure 3.33	Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC.....	120
Figure 3.34	Analyse du mélange des deux acides aristolochiques purifiés des tubercules.....	122
Figure 3.35	Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines.....	123
Figure 3.36	Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche des tubercules....	124
Figure 3.37	Teneur en acide aristolochique dans la concrète alcoolique des tubercules.....	125
Figure 3.38	Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche et la concrète alcoolique des feuilles en période de floraison..	125
Figure 3.39	Spectre UV- Vis de la concrète alcoolique des feuilles.....	130
Figure 3.40	Spectre de la concrète alcoolique des tubercules.....	130
Figure 3.41	Analyse du standard.....	131
Figure 3.42	Chromatogramme de la poudre des feuilles	133
Figure 3.43	Chromatogramme de la poudre des fruits.....	134
Figure 3.44	Chromatogramme de la poudre des tubercules.....	134
Figure 3.45	Chromatogramme de la poudre des feuilles d' <i>Aristolochia clematitis</i> (Roumanie)	135
Figure 3.46	Chromatogramme de la concrète des feuilles	136
Figure 3.47	Chromatogramme de la concrète des tubercules.....	136
Figure 3.49	Chromatogramme de la CG/MS de l'huile essentielle des feuilles sèches d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	139
Figure 3.50	Spectre de masse de Diisocylftalate.....	140
Figure 3.51	Spectre de masse de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3,5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-.....	141
Figure 3.52	Spectre de masse de Deenaxe	142
Figure 3.53	Chromatogramme de la CG/MS de l'huile essentielle des tubercules secs d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	144
Figure 3.54	Spectre de masse du Lycopene, 1,2-dihydro-1-hydroxy-	145
Figure 3.55	Spectre de masse de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3,5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-.....	146
Figure 3.56	Spectre de masse de 2-[4-methyl-6-(2, 6,6-trimethylcyclohex -1-enyl) hexa-1, 3,5-trienyl] cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde.....	147
Figure 3.57	Spectre de masse de Carda-4,20(22)-dienolide, 3-[(6-deoxy-3-O-methyl- α -D-allopyranosyl)oxy]-1, 14-dihydroxy-,	148
Figure 3.58	Spectre de masse de la Lycopene, 1,2-dihydro-1-hydroxy-	149
Figure 3.59	Spectre de masse de 2, 4, 6, 8,10-Tetradecapentaenoique, 9a (acetoxyl)-1a, 1b, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a-decahydro-4a, 7b-dihydroxy-3- ester	150
Figure 3.60	Présence des esters méthyliques sur plaque de CCM.....	154
Figure 3.61	Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des feuilles de <i>Aristolochia longa</i> L.....	155
Figure 3.62	Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des fruits D' <i>Aristolochia longa</i> L.....	155
Figure 3.63	Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des tubercules D' <i>Aristolochia longa</i> L.....	156
Figure 3.64	Résultats du test antibactérien de la récolte de 2007	160
Figure 3.65	Effet de Ca(ClO) ₂ et HgCl ₂ sur le taux de contaminations.....	164
Figure 3.66	Nécrose au niveau des fragments des feuilles et des tiges.....	166

Figure 3.67 Effet des combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons (avec cytokinines)	169
Figure 3.68 Effet des combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons (avec Kinétine).....	170
Figure 3.69 Développement des bourgeons après 10 jours d'introduction dans le milieu M ₆	172
Figure 3.70 Vitro-plant développé.....	173
Figure 3.71 Pousses ramifiés.....	173
Figure 3.72 Effet des sub- cultures sur l'allongement moyen de la tige.....	174
Figure 3.73 Effet des combinaisons hormonales sur l'élongation.....	176
Figure 3.74 Effet des combinaisons hormonales sur l'enracinement.....	178
Figure 3.75 Plantules enracinées issues d'organogenèse directe.....	180
Figure 3.76 Touffe des plantules enracinées issues d'organogenèse directe.....	180
Figure 3.77 Effet des combinaisons hormonales entre le BAP et les auxines sur l'apparition des cals	184
Figure 3.78 Effet des combinaisons hormonales entre la Kinétine et les auxines sur l'apparition des cals.....	185
Figure 3.79 Evolution de la callogenèse exprimée en poids frais de feuilles sur les milieux de culture.....	186
Figure 3.80 Début de formation des cals.....	188
Figure 3.81 Aspect des cals issus des milieux M ₁ et M ₂ à l'obscurité.....	188
Figure 3.82 Aspect de cals issues du milieu M ₃ à l'obscurité.....	188
Figure 3.83 Aspect de cals issues du milieu M ₅ à l'obscurité.....	189
Figure 3.84 Aspect de cals issues des milieux M ₁ , M ₂ , M ₅ et M ₃ à la lumière	190
Figure 3.85 Aspect de cals issues du milieu M ₅ à la lumière.....	191
Figure 3.86 Développement de bourgeon issu du cal (loupe Gx4.5).....	191
Figure 3.87 Aspect des cals après 3 à 4 sub- cultures.....	191
Figure 3.88 Effet des hormones de croissance sur l'allongement moyen de la tige....	193
Figure 3.89 Effet des sub- cultures sur l'allongement moyen de la tige.....	195
Figure 3.90 Effet des hormones de croissance sur l'enracinement des vitro-plants issus des cals.....	196
Figure 3.91 Cal enraciné sur le milieu M ₁	197
Figure 3.92 Développement des plantules issues des cals.....	197
Figure 3.93 Développement des racines des vitro-plants issus des cals.....	198
Figure 3.94 Aspect des plantules enracinées et vitrifiées.....	200
Figure 3.95 Pourcentage de réussites après un mois d'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse directe et indirecte après un mois.....	201
Figure 3.96 Plantules début de l'acclimatation.....	202
Figure 3.97 Développement des plantules après 3 semaines de l'acclimatation.....	203
Figure 3.98 Plantules issues de l'organogenèse directe après 40 jours.....	203

Tableau 1.1	Quelques terpènes des espèces <i>Aristolochia</i>	24
Tableau 1.2	Différents types d'acides aristolochiques.....	App A
Tableau 1.3	Différents types d'aristolactames.....	App A
Tableau 1.4	Certains constituants d' <i>Aristolochia longa</i> L.	37
Tableau 1.5	Principales réactions générales de colorations et de précipitation Pour la caractérisation des métabolites secondaires.....	41
Tableau 2.1	Les conditions de l'analyse par chromatographie ionique.....	52
Tableau 2.2	Les révélateurs et les métabolites recherchés pour La caractérisation de certains métabolites secondaires d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	57
Tableau 2.3	Les souches bactériennes (Essai 2007).....	65
Tableau 2.4	Les souches bactériennes (Essai 2008).....	66
Tableau 2.5	Protocole de stérilisation.....	68
Tableau 2.6	Compositions de solutions minérales utilisées lors de l'expérimentation.....	69
Tableau 2.7	Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml.....	69
Tableau 2.8	Combinaisons hormonales d'organogenèse directe.....	70
Tableau 2.9	Combinaisons hormonales d'organogenèse indirecte.....	71
Tableau 2.10	Balances hormonales de milieu d'élongation	71
Tableau 2.11	Balances hormonales du milieu d'enracinement	72
Tableau 2.12	Répartition des souris en lots.....	73
Tableau 3. 1	Résultat de la teneur en eau	95
Tableau 3.2	Teneur en cendres des tubercules.	96
Tableau 3.3	Cations détectés dans les cendres par chromatographie ionique.....	97
Tableau 3.4	Anions détectés dans les cendres par chromatographie ionique.....	98
Tableau 3.5	Résultats de la spectrométrie d'absorption atomique.....	98
Tableau 3.6	Teneur en azote total et en protéines dans les tubercules.....	99
Tableau 3.7	Teneur en composés apolaires des tubercules et des feuilles.....	101
Tableau 3.8	Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS de la concrète apolaire des tubercules.....	102
Tableau 3.9	Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS de la concrète apolaire des feuilles.....	103
Tableau 3.10	Teneur en composés polaires des tubercules et des feuilles.....	103
Tableau 3.11	Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS de la concrète polaire des tubercules.....	104
Tableau 3.12	Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS de la concrète polaire des feuilles	105
Tableau 3.13	Résultats de la caractérisation des métabolites secondaires.....	107
Tableau 3.14	Taux de migration (<i>R_f</i>) des métabolites secondaires Caractérisés.....	108
Tableau 3.15	Teneur en acide aristolochique dans les feuilles et les tubercules.....	110
Tableau 3.16	Résultats de l'analyse du standard	111
Tableau 3.17	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles.....	112
Tableau 3.18	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules.....	113
Tableau 3.19	Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié desfeuilles.....	115
Tableau 3.20	Analyse par HPLC de l'acide aristolochique purifié des Tubercules	116
Tableau 3.21	Résultat de l'analyse du standard.....	117
Tableau 3.22	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles.....	118
Tableau 3.23	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules	119
Tableau 3.24	Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules..	121
Tableau 3.25	Résultat du test de confirmation	122
Tableau 3.26	Résultats de l'analyse du standard.....	131

Tableau 3.27 Résultats de l'analyse des échantillons séchés (poudres).....	133
Tableau 3.27 Résultats de l'analyse des différentes concrètes.....	137
Tableau 3. 28 Composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	151
Tableau 3.29 Composés majoritaires de l'huile essentielle des tubercules.....	152
Tableau 3.30 Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des feuilles.....	157
Tableau 3.31 Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des fruits	158
Tableau 3.32 Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des tubercules.....	159
Tableau 3.33 Activité antibactérienne de la concrète alcoolique et de l'acide aristolochique.....	160
Tableau 3.34 Les diamètres des zones d'inhibition des feuilles	161
Tableau 3.35 Les diamètres des zones d'inhibition des tubercules.....	161
Tableau 3.36 Les diamètres des zones d'inhibition des fruits.....	162
Tableau 3.37 Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle.....	162
Tableau 3.38 Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige.....	176
Tableau 3.39 Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals.....	187
Tableau 3.40 Couleur et texture des cals à l'obscurité.....	188
Tableau 3.41 Couleur et texture des cals après transfert à la lumière.....	189
Tableau 3.42 Effet des hormones de croissances sur l'allongement des vitros plants.....	194
Tableau 3.43 Rapport entre le taux de mortalité et la dose administrée.....	205
Tableau 3.44 Les taux de mortalités observées	207

INTRODUCTION

Les plantes sont depuis toujours utilisées par les Hommes à des fins curatives. Ces derniers ont même, appris à apprécier leurs vertus apaisantes et analgésiques [1].

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé(OMS), 80% de la population des pays en voie de développement, ont recours presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé primaire.

Devant des populations peu informées des questions de santé, en absence de législation stricte et en absence de contrôle de l'efficacité des plantes, l'usage de celles –ci pour ces populations ,reste une solution facile et naturelle [2]. Cependant, naturel ne veut pas dire nécessairement sans danger [3].

Ainsi, nombre de ces plantes composant les remèdes naturels, peuvent être toxiques, leur mésusage, que ce soit à but thérapeutique, accidentel, criminel ou suicidaire, abouti à des intoxications graves, voire mortelles [2 ;4].

Et parmi les plantes toxiques qui provoquent des dégâts : la Belladone et la Digitale [5] ou encore *Aristolochia longa* L., contenant des composés chimiques toxiques [6 ;7] appelés acides aristolochiques.

Aristolochia longa L., est fortement utilisée en médecine traditionnelle Algérienne [8], Marocaine [9 ;10 ;4 ;11] ou encore chinoise[12;13] comme remède naturel, principalement contre le cancer, et ce, malgré la toxicité qui la caractérise.

Notre travail s'inscrit, ainsi, dans une dynamique, ayant pour but l'étude et la valorisation de la plante *Aristolochia longa* L. , connue localement sous le nom de Berroustoum et faisant partie des ressources phytogénétiques dont recèle l'Algérie. Elle appartient à la famille des Aristolochiaceae, localisée principalement au centre du pays.

A travers cette étude, les objectifs que nous nous sommes assignées, concernent :

- Le volet biochimique, par l'identification et la caractérisation des métabolites secondaires, les principaux principes actifs de la plante, ainsi que la détermination de la teneur en acides aristolochiques, en plus de la composition en acides gras ;
- Le volet biotechnologique, par les techniques de culture un vitro, outil efficace pour assurer la multiplication et la conservation des plantes intensivement utilisées par l'Homme ;
- Le volet Ethnobotanique, qui permet de vulgariser la connaissance de *Aristolochia longa* L .son utilisation par les spécialistes et l'étendue de son impacte sur la population (ou une partie) Algérienne, en effectuant des enquêtes sur terrain ;
- Le volet histologique par l'étude macroscopique de la fleur dans le but de rechercher toute spécificité et l'étude microscopique de la feuille, la tige et le tubercule de la plante afin de voir l'agencement des tissus et les sites sécréteurs.
- L'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Aristolochia longa* L. contenant les acides aristolochiques ;
- Une étude préliminaire sur les effets pharmaco–toxicologiques des extraits de la plante d'étude afin de déterminer la DL50 (toxicité aigue).

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Historique

Les plantes médicinales font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines. La connaissance de leurs propriétés thérapeutiques est également un héritage commun à tous les Hommes [14].

Aujourd'hui encore les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives [1].

Il est établi que les vertus bénéfiques des plantes n'ont été découvertes par l'Homme qu'à partir du Néolithique (8000 ans avt.J.C) par une approche plutôt progressive avec l'essor de l'agriculture et la sédentarisation des populations [15].

En chine, il y a 5000 ans, l'empereur Shen Nung passionné par la phytothérapie répertoria plus de 365 plantes médicinales [16]. Et quatre mille ans avant J.C, les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner, de même pour les civilisations indienne et aztèque, dans lesquelles on trouve des traces d'utilisations médicinales très anciennes [15].

A la même période (4000 ans avant J.C) les Egyptiens savaient déjà extraire l'essence de Cèdre, ils en utilisaient aussi les huiles essentielles en bains aromatiques, les essences de Myrte pure, de la cannelle et autres parfums pour l'embaumage [17].

Concernant l'époque gréco-romaine, les médecins grecs utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou les émétiques.

Théophraste (370-285avt J.C) considéré comme le père de la botanique, rédigea au IVe siècle avant notre ère l'histoire des plantes « *Historia plantarum* », où il présenta les propriétés de plusieurs centaines de végétaux [18].

Quant à la période romaine [18], elle sera dominée par :

- Pline l'Ancien auteur d'une « histoire naturelle » de près de quarante volumes,
- Galien qui développa et systématisa la fabrication des médicaments à base de végétaux,
- Discoride, médecin grec, dont l'ouvrage « *materia medica* » répertoriant environ 600 plantes, restera une référence jusqu'à une époque récente.

A l'apogée de l'empire arabe, les spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr el Razi ou Rhazès (865-925) grand médecin de son temps et précurseur de la psychothérapie [9]. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne vers l'an Mille, qui rédigea le « Canon de la médecine », influençant ainsi et pendant des siècles la médecine européenne [18].

Plus tard, Ibn el Baytar (1197-1248) rédigea « Le très complet somme des simples » contenant une liste de 1400 préparations de plantes médicinales [15], donnant ainsi à la pharmacie tout son caractère scientifique.

Après une période d'oubli, au cours des dernières décennies, il y a eu prise de conscience de l'intérêt thérapeutique des plantes, pour soigner efficacement un grand nombre d'affections [19], et de ce fait l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de soin. Ainsi en plus des médicaments fabriqués uniquement par synthèse chimique, d'autres sont obtenus par traitement chimique de substances naturelles végétales, le plus souvent, mais aussi des remèdes purement naturels provenant exclusivement de plantes [20], [21].

1.2. La phytothérapie

1.2.1. Définition

La phytothérapie est étymologiquement le traitement par les plantes ou leurs formes dérivées [22]. Elle permet de soigner les différents maux dont on peut être victime [20].

On utilise ainsi, fleurs, feuilles, racines, ou les plantes entières cueillies dans la nature, mises sous forme de tisanes, gélules, teintures ou autres [23].

D'après Lamnaouer [24], il existe deux types de phytothérapie :

- une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes réputées médicinales, encore massivement utilisées.
- une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette pratique est assimilée aux médicaments, c'est la pharmacognosie.

1.2.2. Intérêt de la phytothérapie

Selon Maoti et al.[25] , la phytothérapie dispose de tous les atouts qui lui permettent d'accéder au rang des disciplines thérapeutiques majeures. Elle représente l'un des moyens les plus simples, les moins dangereux, les plus efficaces et les moins onéreux pour le traitement de nombreux syndromes et maladies, aigus ou chroniques, occupant une grande place dans la pathologie journalière .

A cet effet, d'après l'OMS [26] durant cette décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt à travers le monde. En chine, 40% environ de l'ensemble des soins s'inspirent de la médecine populaire, quant en Amérique latine plus de 50% de la population a recours à cette thérapie.

En Afrique, près de 6377 plantes sont utilisées [26]. En 2004, 75% de la population africaine ont eu recours aux plantes pour se soigner surtout des maladies qui ont une grande ampleur telle que la malaria et le syndrome d'immunodéficience acquise (sida) [27].Il en est de même, pour les pays du Maghreb, où l'usage des plantes médicinales est fréquent dans toutes les zones rurales, notamment au Maroc où le recours à ces plantes atteint jusqu'à 70%de la population [28].

Dans les pays développés, la médecine traditionnelle connaît toutefois un succès croissant, surtout qu'elle peut être acquise à moindre coût, sans effet

secondaires [26]. Certains de ces pays s'orientent même vers la reconnaissance totale et officielle de la phytothérapie, tel le cas de l'Angleterre.

1.2.3. Situation de la phytothérapie en Algérie

Il est établi que pour l'ensemble des pays de l'Afrique du Nord, les pharmacopées régionales s'inspirent de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins.

Suivant les recommandations de l'OMS et le sommet de Rio, des stratégies de conservations des plantes médicinales sont élaborées pour ces pays. Ainsi, en Algérie les ressources naturelles présentent une richesse inestimable, aussi bien pour l'économie nationale, que pour le maintien de l'équilibre écologique de la région. Parmi ces ressources naturelles, il existe au moins 500 espèces de plantes médicinales utilisables par les phytothérapeutes [8] dont 100 espèces se vendent chez les herboristes [29]. Cependant, selon Halimi [30], il y a environ 126 plantes médicinales utilisées couramment en médecine traditionnelle Algérienne.

1.3. Généralités sur les Aristoloches

1.3.1. Caractères généraux des Aristoloches

La famille des *Aristolochiaceae* est une famille [31][32] de plantes dicotylédones [33][34]. Ces dernières, dans l'antiquité, étaient considérées comme plantes médicinales [35]. Cette famille botanique comprend, 625 espèces [31] réparties en 7 genres [31][24] parmi lesquels *Aristolochia* et *Saruma* sont les plus importants [31].

Les *Aristolochiacées* sont des plantes herbacées ou des lianes, plus rarement sous forme de buisson [32].

Les feuilles sont plus fréquemment alternées, pétiolées, simples et entières [33][34][35]. Le limbe peut parfois être bilobé [35] ou trilobé [36]. Les feuilles présentent une nervation palmée [18] et les stipules sont généralement absentes [35].

Les fleurs des *Aristolochiacées* sont hermaphrodites, actinomorphes [35], [33] ou zygomorphes [37][32][34] de couleur jaune, pourpre ou rose [38].

Le calice en forme d'entonnoir [32] est formé de trois sépales soudés [32][34], tubulaires, en forme de S ou en pipe [32]. Il présente trois lobes étalés ou un lobe de grande taille [32].

Le périanthe caduc est irrégulier, tubuleux en languette, et poilu à l'intérieur [37][39]. Les étamines sont insérées sur l'ovaire. Leur nombre varie de 6 à 12 selon les genres [33]. Les Carpelles de 4 à 6, sont souvent soudées mais libres chez *Saruma*.

L'ovaire est semi-infère ou infère [32], uniloculaire ou pluriloculaire de 4 à 6 loges [32][36]. La placentation est axiale ou pariétale. Les stigmates au nombre de 4 à 6 sont souvent lobés. Les ovules sont nombreux et nectaires [32][37].

A l'exception du genre *Saruma*, qui produit des follicules [35], les fruits sont des capsules [32][33][34] qui ressemblent parfois à des nucelles [34] ou à une baie à 3 ou 5 loges [33], renfermant chacune un grand nombre de graines [32].

Ces graines triangulaires [40] renferment un abondant albumen cartilagineux à réserves oléagineuses. Elles peuvent être amyloacées [34]. Elles sont souvent pendantes et déhiscentes à partir de la base aplatie [32]. Les graines sont ailées ou associées à un tissu charnu [32]. Elles contiennent un embryon très petit, enfermé dans un endosperme charnu [33] et abondant [31].

1.3.2. Distribution

Les *Aristolochiacées* sont surtout tropicales [13][31][32][34][41] et subtropicales [13][39][42].

Elles vivent ainsi dans les régions tempérées [32][34][42][43][44] dans la région méditerranéenne, en particulier en Europe centrale et méridionale [39][31]. La famille des *Aristolochiacées* se rencontre sur tous les continents à l'exception de l'Australie [32][34].

1.3.3. Reproduction

La biologie florale des aristoloches offre des particularités remarquables [32]. Elle présente une nette adaptation à la pollinisation par les insectes [32].

Les fleurs des *Aristolochiacées* sont pollinisées par les diptères [32][42] et les arthropodes en particulier [31].

Le syndrome de la pollinisation est particulièrement spécialisé chez *Aristolochia* dont les fleurs réalisent un piège très élaboré au moyen du calice hautement adapté [32][42]. Les insectes sont attirés par la couleur [32] et les odeurs ammoniacales [34]. Les insectes chargés de pollen sont piégés dans la partie inférieure du tube calycinal [32][34][39], où ils ne peuvent pénétrer que par une étroite ouverture, souvent pourvue de poils dirigés vers le bas [32] (figure 1.1). 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 [39][32]. Après la pollinisation, les stigmates se fanent et prennent une position dressée, exposant à ce moment les anthères qui deviennent déhiscentes. Les insectes sont saupoudrés de pollen et peuvent émerger du calice [32].

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 [31].

Les espèces de la famille des *Aristolochiacées* préfèrent les endroits ombrés, et un sol frais et poreux [35]. Les aristoloches présentent une inflorescence variable, en grappe [35], cyme, corymbe [34] ou fleurs solitaires axillaires [35][41]. La floraison a lieu au printemps ou en été [35].

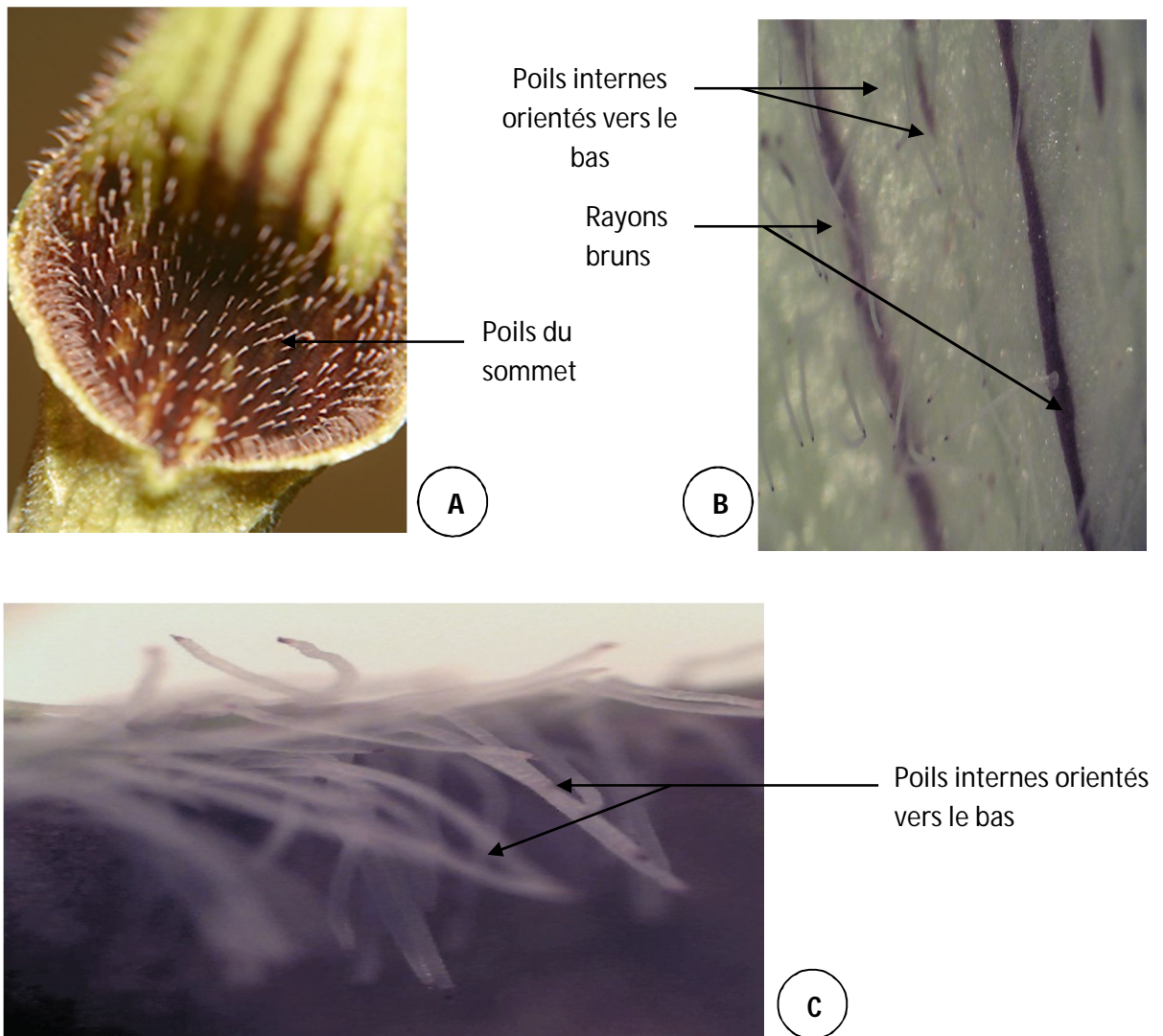


Figure 1.1 : les poils internes au niveau de la fleur (originale)

(A) partie supérieur de la fleur

(B) poils internes vus à la loupe Gx20

(C) poils internes vus à la loupe Gx40

1.3.4. Composition chimique des Aristoloches

Les principaux composants chimiques des Aristoloches sont : l'acide aristolochique, l'aristolochine (un alcaloïde hautement toxique), l'acide malique, les tanins, les résines, l'allantoïne, la phytostérine [45], l'huile essentielle [46], les flavones, les terpènes, l'aporphine, et les divers composés classiques des extraits végétaux [1].

1.3.4.1. Les principes amers

Les principes amers ne forment pas un groupe chimique, leur seule propriété commune est la saveur amère. C'est à cette propriété commune qu'ils doivent leur 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 [45].

1.3.4.2. Les terpènes

Ce sont des lipides construits à partir d'un motif de base : l'isoterpène, molécule insaturée à 5 carbones [41]. Selon le nombre d'unités isoterpéniques qui les constituent, il existe : les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les triterpènes en C30, les tetraterpènes en C40 [47][48][49][5] et les polyterpènes [49]. Plus de 200 terpènes ont été isolés et caractérisés chez les espèces du genre *Aristolochia*. Ils contiennent, principalement, des diterpènes, des sesquiterpènes ainsi que des monoterpènes, triterpènes et des tetraterpènes [13].

1.3.4.3 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 [50]. Une huile essentielle est un mélange complexe qui renferme principalement des terpénoïdes et parfois des dérivés phénylpropaniques [48].

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 (alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes, cétones, acides gras et des esters aliphatiques), des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés) et des composés aromatiques [51].

Tableau 1.1 : Quelques terpènes des espèces *Aristolochia*.

Type de terpène	Certains composés
Monoterpènes	Largement distribués dans les huiles essentielles d' <i>Aristolochia</i> , surtout sous forme cyclique. Exemples : menthane, pinane et camphane [13].
Sesquiterpènes	Plus de 24 types de sesquiterpènes ont été rapportés au genre <i>Aristolochia</i> dont les principaux : cadinène, aristolène, germacrène et bicyclogermacrène [13].
Diterpènes	Vaste groupe de composés dérivés de géranyl-géranyl-pyrophosphate [13].
Triterpènes	Groupe de divers composés dérivés du squalène tel que le lupeol, et l'acide ursolique [13].
Tetraterpènes	Résultent de l'association de deux molécules géranyl-géranyl pyraphosphate tel que le loliolide et des apocaroténoïdes [13].

1.3.4.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments issus des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [47]. Les flavonoïdes sont présents dans les cellules superficielles, et jouent un rôle d'écran vis-à-vis des effets nocifs du rayonnement ultraviolet [49].

1.3.4.6. Les tanins

Historiquement, l'importance des drogues à tanins est liée à leurs propriétés tannantes [44], c'est-à-dire à la propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible qui est le cuir [48][49][52].

Les tanins sont des composés polyphénoliques [52], hydrosolubles [5] ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3 000 [5][48][52]. Ils précipitent les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [48][5] et sont réputés par leur action astringente [50][52].

1.3.4.7. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W. MESNER au début du XIX^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, donc comme des alcalis [52][46].

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900 [5]. Ce sont des substances organiques complexes [50]. Ils sont doués à faibles doses de propriétés biologiques marquées [5], tel que stimulant le système immunitaire [53][60] et inhibiteur de tumeur [54][61] [62] et agissent particulièrement sur le système nerveux central et le système nerveux sympathique ou parasympathique [50].

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 *Annoniacées*. Des études pharmacologiques ont fait mention d'activités cytotoxiques et antitumorales pour certains éléments de cette famille [53].

La famille des *Aristolochiacées* est marquée par la présence des acides aristolochiques et ses analogues comme principe actif [43][44]. Les acides aristolochiques sont souvent accompagnés par des aristolactames. Ainsi, environ 29 acides aristolochiques et 23 aristolactames ont été trouvés dans les plantes d'Aristolochiaceae [54] [55]. Ces acides sont des substances jaunes et amères [46].

1.3.4.7.1. Acide aristolochique

L'acide aristolochique est un alcaloïde extrait à partir des feuilles et des racines des plantes du genre *Aristolochia*. Il est synthétisé au niveau des feuilles et accumulé au niveau des tubercules [56a][43]. Son précurseur est l'acide phénanthrol [3 -4-*d*]-1,3-dioxole-6-nitro-5-carboxylique [57][58].

Les études qui ont été réalisées sur l'extrait de la partie souterraine d'*Aristolochia longa* L. par DEPASCUAL [56.a] et KUMAR [59] ont montré la

présence de plusieurs types d'acide aristolochique et ses dérivés (Tableau 1.2 Appendice A) :

- Acide aristolochique I, acide aristolochique méthyle ester Ia.
- Acide aristolochique II, acide aristolochique méthyle ester Iia
- Acide aristolochique III méthyle ester.
- Acide aristolochique IV, acide aristolochique IV méthyle ester
- 2-Phenanthro-[3.4-d]-1.3-dioxole-6-nitro-5-carboxamidopropanoïque méthyle ester.

L'acide aristolochique Ia est un agent mutagène direct sur les *Salmonella typhimurium* [60] et *drosophilla* [61]. Il est carcinogène chez le rat [62].

L'acide aristolochique a montré une activité herbicide contre *Chenopodium album*, *Amaranthus repraeflexus*, *Lindemia pyxidaria* et *Setaria viridis* [6] [63]. Il a longtemps été prescrit comme régulateur du flux menstruel [63][64] et augmente la phagocytose des globules blancs [65][66][67][68]. Il présente des propriétés cicatrisantes pouvant être mises à profit au cours du traitement des fistules, ulcères, furonculoses, acnés rebelles, infections gynécologiques et urinaires [66]. L'acide aristolochique stimule le système immunitaire [59] [67][68] et inactive le venin des serpents [69]. Il est également utilisé en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire [70][67][68], diurétique et analgésique [73], mais surtout comme inhibiteur de tumeur [71][59][46], antibactérien [46][44], antifongique et antiviral [71][72].

Néanmoins, l'acide aristolochique est un composant très toxique pour les reins. Il provoque des néphrotoxicités qui conduisent à des défaillances rénales nécessitant une transplantation [73][74].

1.3.4.7.2. Les aristolactames

Les aristolactames sont des petits groupes d'alcaloïdes de lactames phénanthrènes structurellement et bio génétiquement liés à des aporphines [75] [76][77]. La source la plus riche de ce type d'alcaloïdes sont les feuilles et les racines des espèces d'*Aristolochia* [64][77][78].

L'aristolactame la a été isolé à partir de l'extrait de la partie souterraine d'*Aristolochia longa* L. (Tableau I.3 Appendice A). Une leucémie lymphoblastique et un carcinome épidermoïde bronchique ont été observés *in vitro* lors d'une cytotoxicité par le mélange de l'aristolactame la et de l'acide aristolochique I. Ces composés ont également montré une activité antibactérienne sur *Eshcerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* [79].

1.3.4.8. Résines

Ce sont des substances colloïdales. Elles résultent de l'action de l'oxygène sur les terpènes [50]. Ce sont des produits de constitution complexe, souvent formés dans un appareil sécréteur et définis par un ensemble de propriétés physiques. Ces substances sont amorphes, dures à température ordinaire mais se ramollissent par chauffage. Elles sont souvent transparentes ou translucides, à cassure colloïdale brillante [46].

1.3.5. Vertus des Aristolochiaceae

L'intérêt attaché aux Aristolochiacées est fort ancien [15][71][78][80] puisqu'elles ont été utilisées en thérapie dès l'époque gréco-romaine [15]. Elles sont réputées en médecine populaire par leurs effets emménagogues [46][47][74] ocytociques [46], diurétiques [81][82], toniques [13][46][80] et expectorants [44][46][52].

En outre, beaucoup d'espèces, notamment celles d'Amérique du sud, sont utilisées, contre les morsures des serpents [48][67]. L'emploi des Aristoloches, fleur et racine, aurait donné des résultats satisfaisants en gynécologie sur des cas de stérilité, d'oligominorrhée, de dysménorrhée et des troubles de la ménopause [81]. De nombreuses *Aristolochiacées* et leurs préparations ont été utilisées en médecine traditionnelle comme des agents anti-inflammatoires [72] pour le traitement des arthrites, la goutte [79][81][82], l'asthme [44][51][82] et le rhumatisme [79][82].

Les aristoloches sont des plantes âcres, irritantes, drastiques [47] et stimulantes [80][47]. Elles sont aussi stomachiques [47] analgésiques, antiphlogistiques et antitussives [44][13]. Elles ont été utilisées aussi dans le traitement des infections cutanées [78][79][82].

1.4. Historique sur *Aristolochia longa* L.

Aristolochia longa L. ou l'Aristolochie longue est une plante médicinale connue et décrite depuis longtemps [40].

Le nom *Aristolochia* signifie en latin « bon accouchement », c'est pour cette raison que les médecins grecs l'employaient pour activer l'accouchement et faciliter l'évacuation du placenta. On l'utilise également contre les insuffisances ovariennes [40][82][83][84][85].

L'Aristolochie était largement utilisée chez les arabes, citée par plusieurs auteurs de la médecine arabe tels que Ibn-Sina, Ibn El-baytar et El-Antaki. Ils ont décrit la plante ainsi que ses propriétés médicinales et les maladies traitées par l'Aristolochie avec le mode d'emploi [87][88][89][90][91].

Au Maroc, les espèces du genre *Aristolochia* sont employées dans les maladies cutanées, en particulier les mycoses. Les plantes entières, séchées et pulvérisées sont utilisées en usage externe et dans les traitements de la teigne [64][67].

Actuellement, *Aristolochia longa* L. est connue plus particulièrement pour son principe actif, l'acide aristolochique.

Par ailleurs, l'Aristolochie est utilisée couramment en médecine populaire pour soigner certaines tumeurs (bénignes ou malignes). Cela est dû aux propriétés antimitotiques que possède son principe actif [44].

1.5. Description botanique de la plante

Aristolochia longa L. est une herbe vivace rampante.

1.5.1. Racine

Les racines d'*Aristolochia longa* L. sont tubérisées aux formes variées de cylindriques à fusiformes, napiformes ou ovoïdes parfois même lobés (Figure 1.2). Les tubercules verticaux peuvent atteindre 8x3 cm [37][89][91].

1.5.2. Tige

Chaque tubercule émet plusieurs tiges simples ou rameuses anguleuses de 30 à 80 cm de long, glabres ou légèrement pubescentes (Figure 1.3). Chaque tige porte à sa base quelques écailles puis des feuilles et des rameaux ordinairement plus ou moins étalés [36][8].

1.5.3. Feuilles

Les feuilles se disposent alternativement sur presque toute la longueur de la tige. Elles ont une dimension qui varie entre 3,5 à 6 et 3 à 4,5 cm. Leurs pétioles de 0.5 à 1 cm de longueur portent des feuilles sous forme ovale. Chaque feuille est parcourue par un réseau de nervures palmées (Figure 1.4 A et 1.4 B) [37][8].

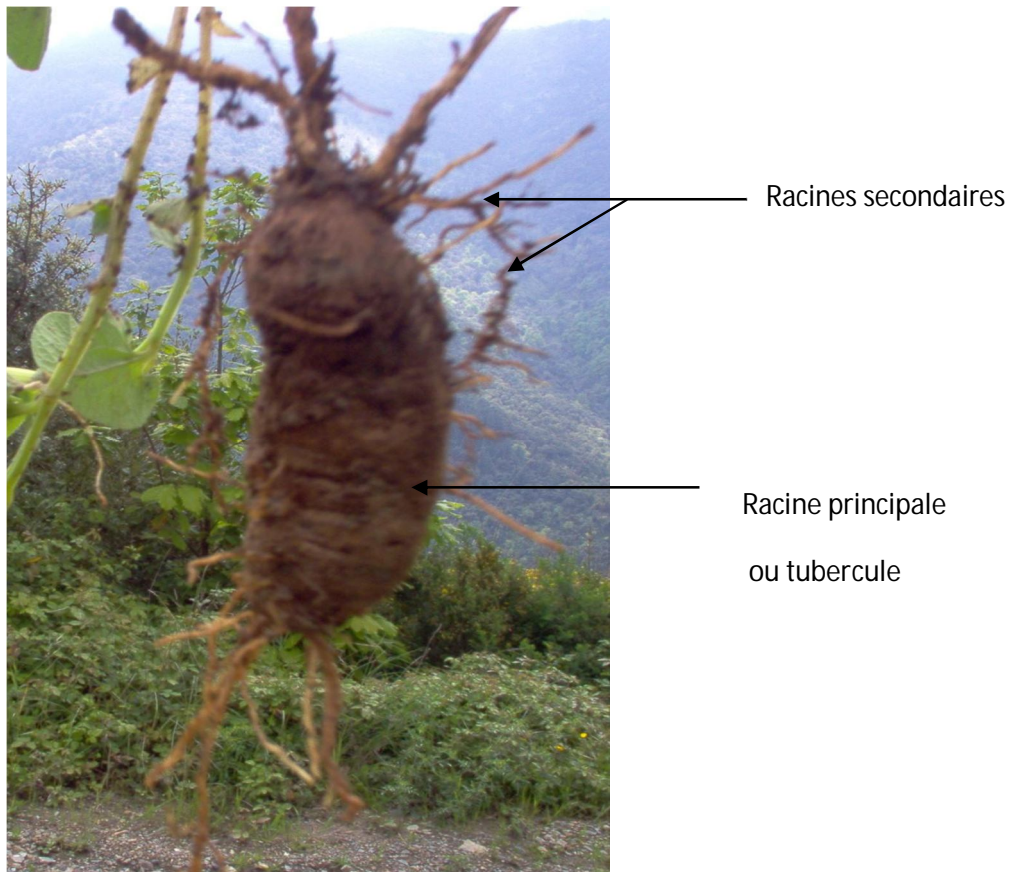


Figure 1.2 : Tubercule d'*Aristolochia longa* L. (8x3 cm) (originale, 2009)

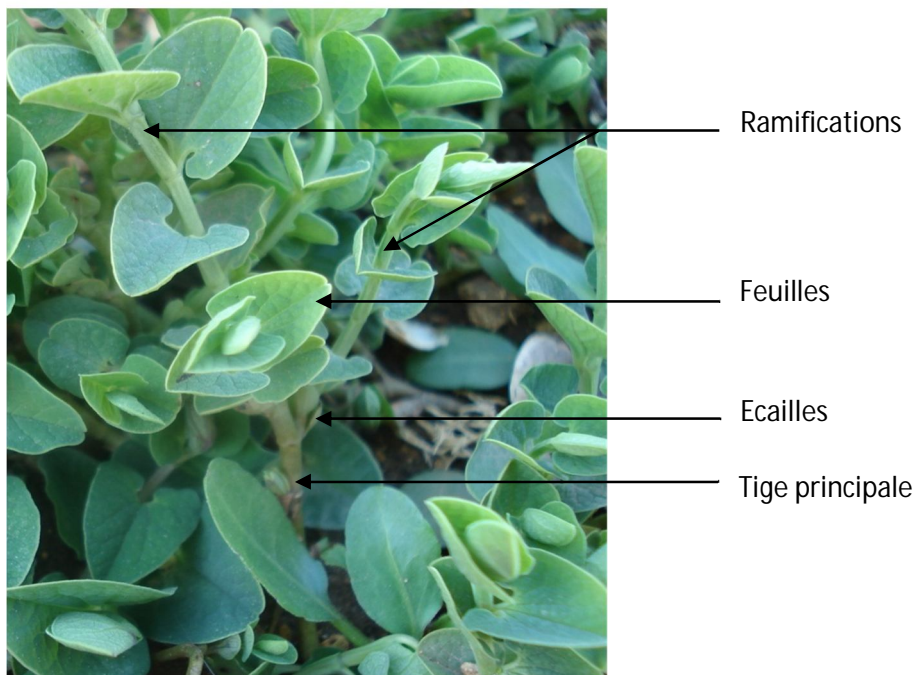


Figure 1.3 : Tiges d'*Aristolochia longa* L. (originale, 2009)

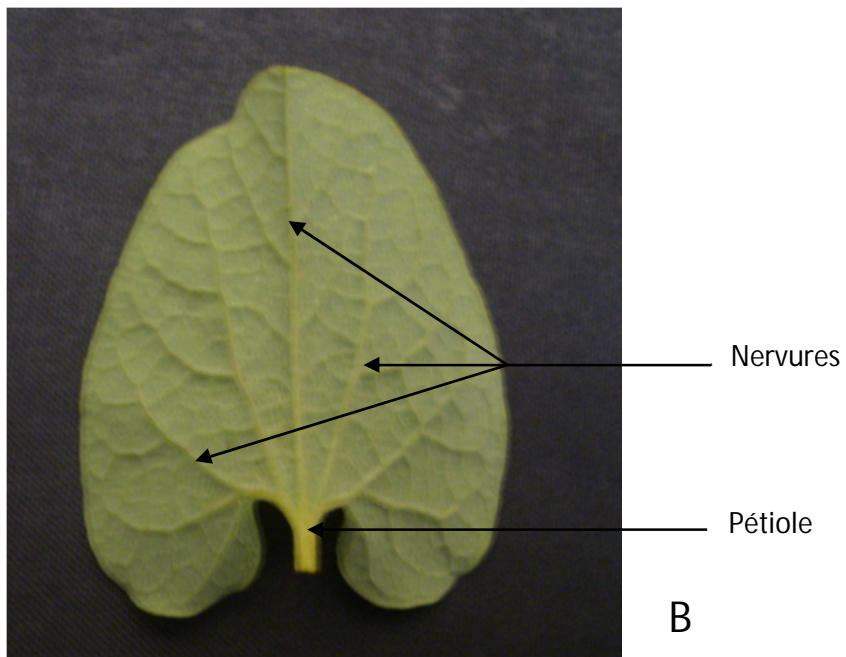
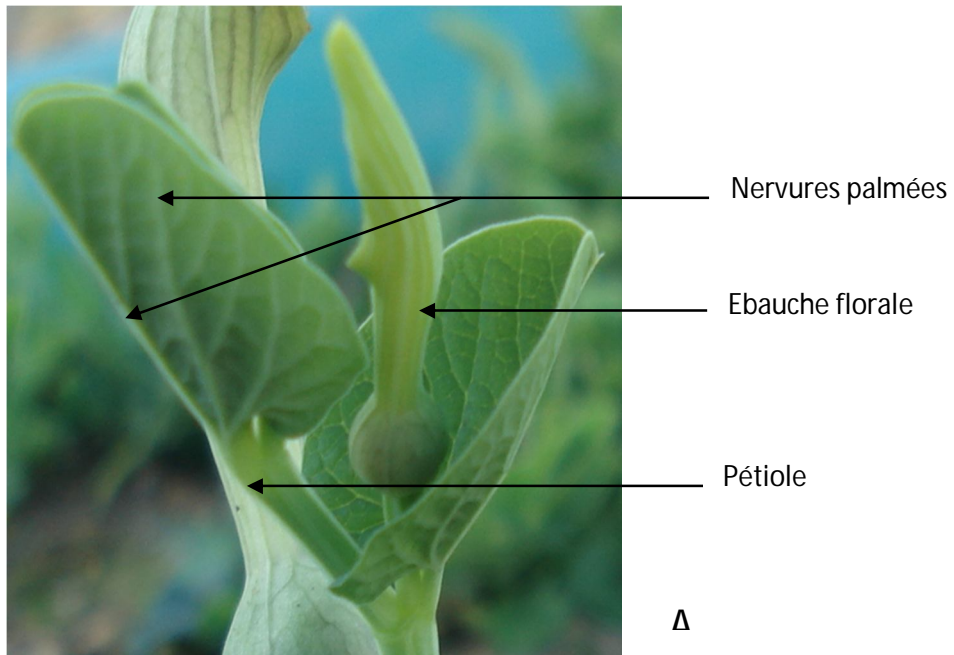


Figure 1.4 : Forme et Nervures palmées au niveau de la feuille (A) Vue du plan (B) vue dorsale (originale, 2009)

1.5.4. Fleurs

Les fleurs sont axillaires de couleur verdâtre ou jaunâtre rayées de brun. Le périanthe est soudé en forme de cornet dont le sommet est recourbé en tête de cobra. Il est renflé à la base et garni intérieurement de poils dont la longueur varie entre 3.5 et 8 cm (figure 1.5). Les pièces florales sont portées par un pédoncule de 1cm de longueur [89][8].

Les fleurs sont hermaphrodites avec des ovaires infères à placentation pariétale. Le nombre d'étamines est de 10 et plus, adhérentes au gynécée et à anthères extrorses (figure 1.6) [37].

1.5.5. Fruits

Les fruits d'*Aristolochia longa* L. sont des capsules ellipsoïdales–subglobuleuses. La déhiscence commence par le sommet (figure 1.7) [A ; B ; C ; D]). Chaque fruit porte 6 valves [37][8].

1.5.6. Graines

Les graines sont brunes, aplaties et triangulaires convexes et chagrinées sur une face, concaves sur l'autre avec un raphé charnu. Elles présentent un embryon droit et minuscule (figure 1.8). Les graines ont une largeur de 4 à 8 mm [37][93].

La période de floraison d'*Aristolochia longa* L. se situe entre les mois d'avril et de mai [36][37].

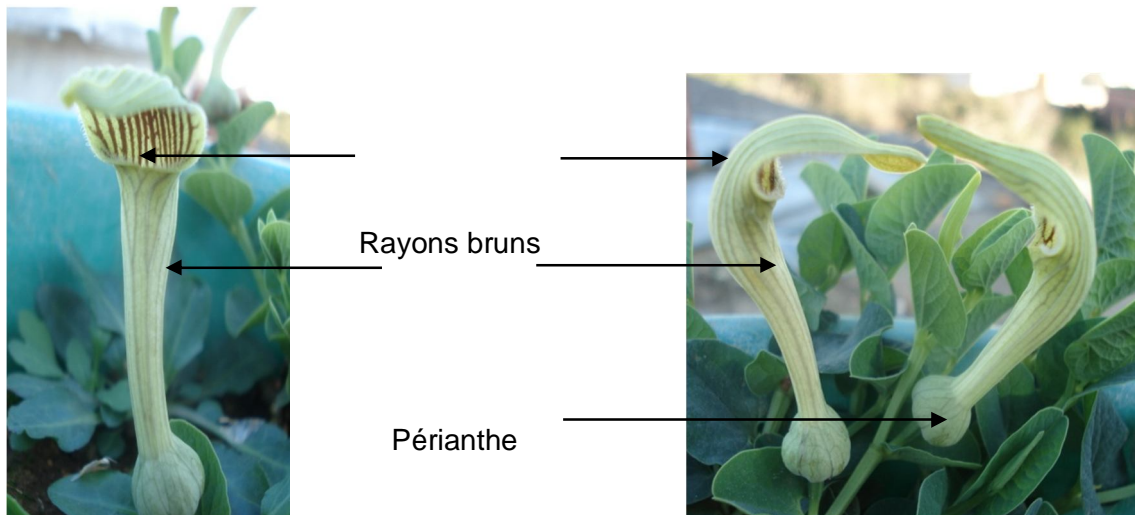


Figure 1.5 : Fleurs d'*Aristolochia longa* L. (originale, 2009)

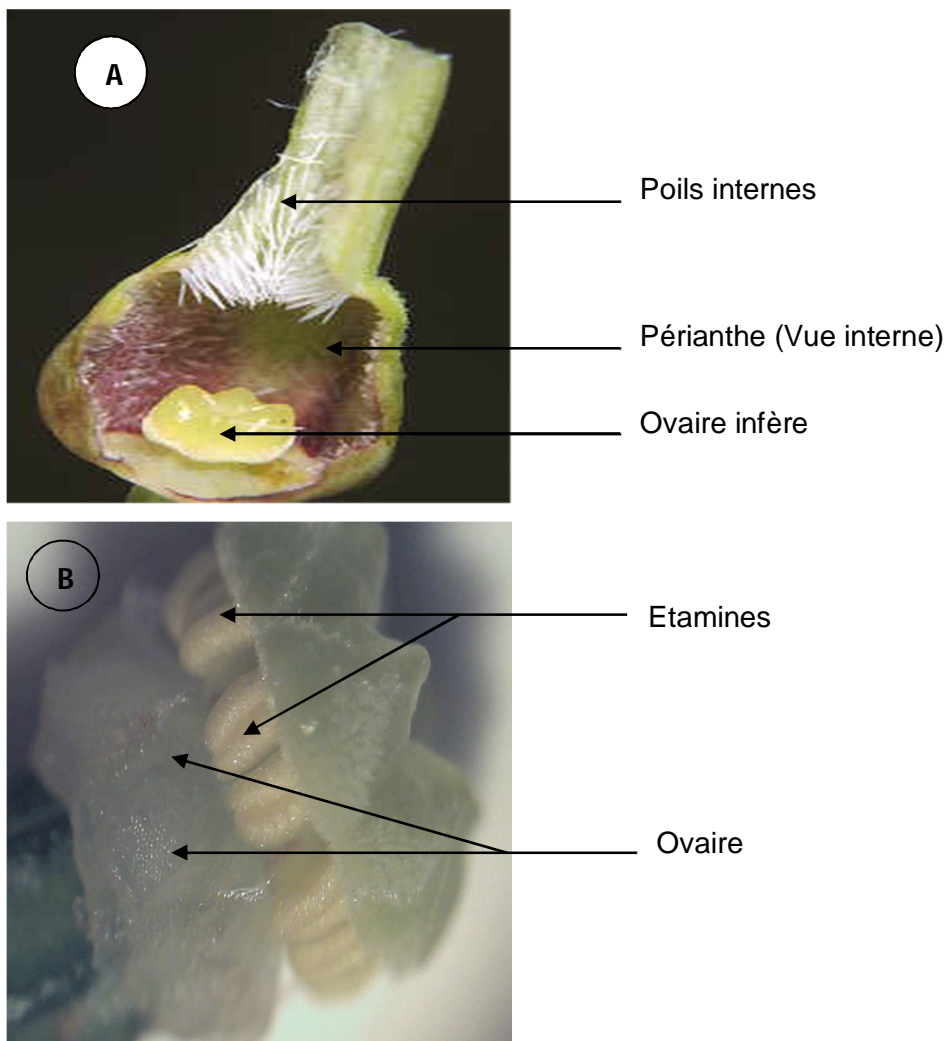


Figure 1.6 : Structure interne des fleurs d'*Aristolochia longa* L. (originale, 2009)

(A) coupe longitudinale de la partie inférieure de la fleur

(B) vue d'ensemble « ovaire et étamines » (loupe G X20)

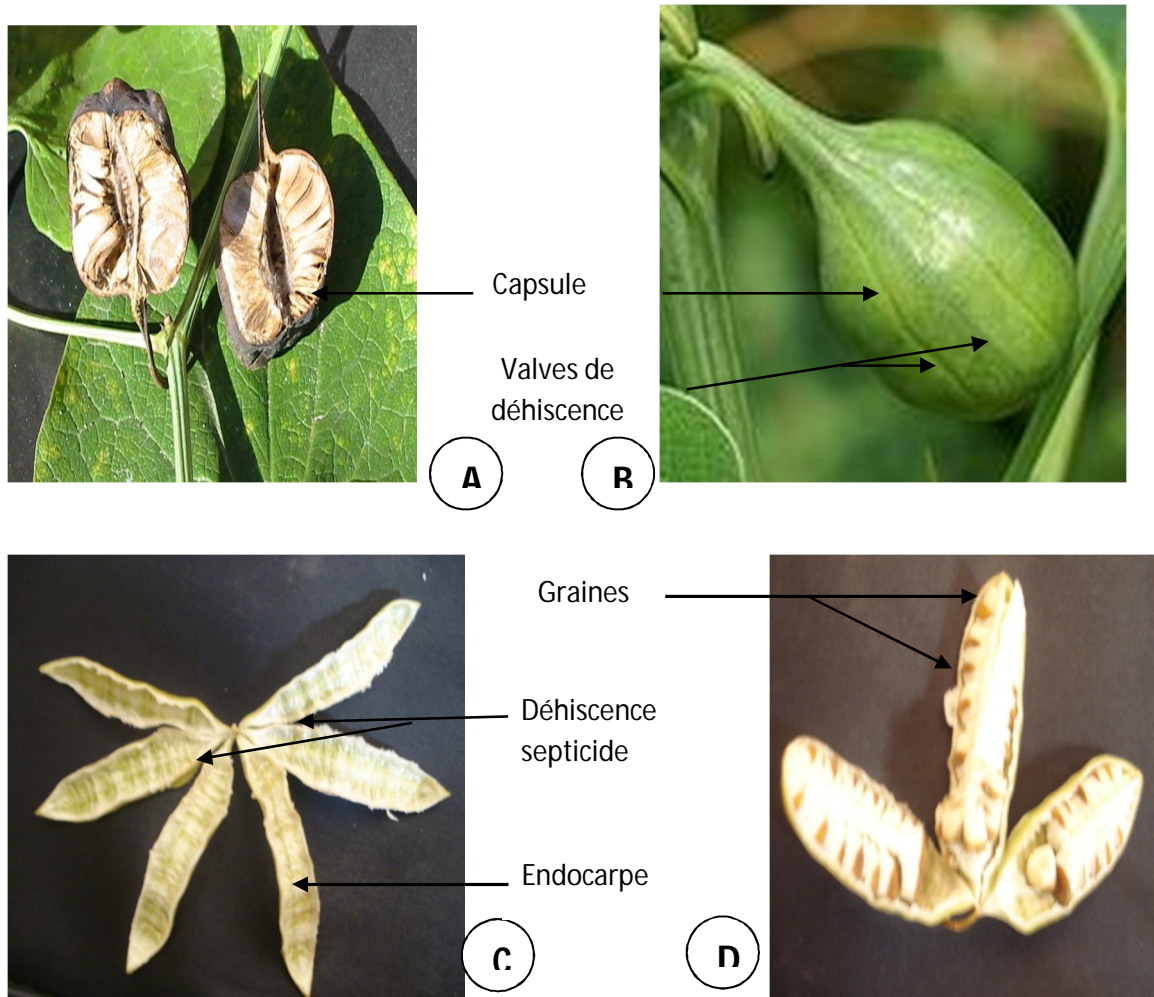


Figure 1.7 : Fruits d'*Aristolochia longa* L. (originale, 2009)

Fruits séchés ; (B) Fruits frais ; (C) vue d'intérieure ; (D) insertion des graines



Figure 1.8 : Grains d'*Aristolochia longa* L. (originale, 2009)

1.6. Etymologie

Aristolochia : ancien nom Latin exprimant les propriétés eutociques de cette plante (facilite l'accouchement), il dérive de deux mots :

- Aristos : excellent, le meilleur
- Lokia : (lochéra) accouchement [94]
- *Longa* : les caractères de leurs souches allongées [8]

En anglais : c'est Birthwort [92]

Latin : *Aristolochia long*

En arabe : Zaraound El-taouil, selon IBN EL BAYTAR [88]

Appellations locales : Mousquar, Quattsa El Haya, Boubralla, Afgouce El Rhioul ou Beroustoum et Ajrarkhi en Berbère [8]

1.7. Systematique

La systématique adoptée d'*Aristolochia longa* L. est celle de MAIRE [37].

- Règne : Plantae
- Phylum : Spermaphyte
- Sous phylum : Angiosperme
- Classe : Dicotylédone
- Sous classe : Apétale
- Série : Dicotylédone à ovaire infère
- Ordre : Aristolochiale
- Famille : Aristolochiaceae
- Genre : *Aristolochia*
- Espèce : *Aristolochia longa* L.
- Sous espèce :
 - Fontanesii :
 - Djurdjurae
 - Multinervis
 - Paucinervis :
 - Typica
 - Longilabiata
 - Parviflora
 - Pseudorotunda

1.8. Répartition

D'après MAIRE [37], *Aristolochia longa* L. est une espèce endémique. Elle pousse sur des terres rouges, des lieux humides et souvent sur les broussailles. On la retrouve dans les montagnes jusqu'à une altitude de 1800 m [36].

1.8.1. Dans le monde

Elle se trouve en :

- Europe méridional et rarement en Espagne.
- Macaronésie (les îles Canaries, Madère et Selvagens).
- Assez commune dans les régions tropicales, et sub tropicales d'Asie.
- L'Afrique du nord et dans le sud de l'Amérique [93] (Figure 1.9, Appendice A[93]).

1.8.2. Répartition en Algérie

Aristolochia longa L. ssp *paucinervis* (Pomel) Batt

- Assez commune dans le Tell et à l'Est de l'Orannie.
- Montagnes de Tlemcen.
- Moyennement commune dans le Nord, le centre (très présente en Kabylie) et l'ouest, dans le Moyen Atlas et le Grand Atlas [94].

Aristolochia longa L. ssp *Fantanesii*

- Assez commune dans la région de Bougie.
 - Rare : en Kabylie, le littoral Algérois et la Mitidja
- Assez commune dans les montagnes de Tlemcen, la vallée de Mostaganem et celle du Chélif [8][36][37][94][95].

1.9. Composition chimique d'*Aristolochia longa* L.

Certains composés étudiés de cette espèce sont illustrés dans le tableau 1.3 :

Tableau 1. 3 : Certains constituants d'*Aristolochia longa* L.

Métabolites	Composés
Lipides	Partie aérienne : 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 isoprénoïdes (3%) ainsi que des squalènes, ont été détectés [96] Tubercule : acides gras : acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique ; glycérides ; des esters éthyliques et isobutyliques de l'acide palmitique, oléique et linoléique, des sitostérol et d'autres composés non identifiés [96]
Huiles essentielles	Monoterpènes : bornyl acétate, bornanol, pin-2-en-8-ol, 8-acetoxy-pin-2-ene et le (S)-Linalool. Sesquiterpènes : β - Caryophyllene, Caryophyllene oxyde, $\Delta^{1(10)}$ Aristolène, $\Delta^{1(10)}$ Aristolone [51.b] ; [51.a]. Tab1.4 Appendice A.
Aristolactames	Aristolactame Ia [75]
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 carboxamido-propanoïque méthyle ester sodium aristolochate II. [56.b][59].

1.10. Vertus d'*Aristolochia longa* L.

Maîtres de l'art, tels que *Hippocrate* et *Galien*, *Discoride* fait l'éloge de la plante. Il exalte ses vertus alexipharmaques et alexitères. Il recommande son utilisation, pour faciliter le flux menstruel, la sortie du fœtus, et l'écoulement des lochies. L'infusion édulcorée de cette espèce est employée à titre de diurétique et d'emménagogue. *Aristolochia longa* L. est aussi utilisée contre les chloroses, la leucophlegmatie, les fièvres intermittentes, l'asthme humide, l'anorexie glaireuse

[97] et comme tonique [98][99]. Elle est également utilisée dans le traitement des acnés rebelles, ulcères et fistules [20].

Bue avec de l'eau, elle dissipe les obstructions de la rate, les douleurs de côté, et est d'une merveilleuse efficacité contre les fièvres malignes. Une décoction d'*Aristolochia longa* L., employée en boisson, dissipe les affections de la matrice [10][99].

Le rhizome d'*Arisrolochia longa* L., en poudre, avec du beurre salé (smèn) est utilisé pour traiter des infections cutanées et la gangrène [99][71]. L'ingestion de petites quantités de cette poudre avec du miel ou du beurre salé est aussi utilisée en tradition pour le traitement des douleurs abdominales et les infections de la partie supérieure du tractus respiratoire [100]. Cette espèce est connue pour sa grande activité antibactérienne [63] contre des souches anaérobies et aérobies [99] et activité anti cancer [59][13], en particulier en cas de sclérose, de cancer d'utérus et le cancer du nez [13].

1.11 Les Etapes d'étude d'une plante médicinale

1.11.1. L'Ethnobotanique

- Définition : Science des plantes et des coutumes agricoles d'un peuple [100], elle étudie toutes les relations que l'homme entretient avec les plantes [101].

Les méthodes utilisées en ethnobotanique sont :

1.11.1.1. Inventaire de la biodiversité

L'inventaire de la biodiversité est une liste de contrôle. C'est une liste d'entités biologiques se trouvant sur une zone ou dans un milieu particulier [102]. Dans l'inventaire de biodiversité, des spécimens de tous les individus sont collectés et mis en archive dans des herbiers ou des musées, cela rend les noms scientifiques fiables. Les résultats des inventaires de biodiversité sont d'habitude présentés comme des listes d'espèce, classées par famille et par genre, pour une localité donnée. Ces listes permettent la comparaison des données entre des sites différents et contribuent à la préparation des cartes de distribution des espèces [103].

1.11.1.2. Inventaire floristique

Cette opération consiste à effectuer des expéditions sur terrain, qui ont lieu six à huit fois par an. Elles sont consacrées à la récolte des plantes endémiques, surtout médicinales ou de plantes en danger de disparition, pour essayer de les acclimater dans le jardin botanique. Par la suite, les utiliser pour la recherche, ainsi que des plantes destinées à produire des médicaments. Au cours de ces déplacements, les ethnobotanistes sont souvent accompagnés par des guérisseurs locaux qui partagent avec eux leurs connaissances [104].

1.11.1.3. Enquêtes ethnobotanique et socioéconomique

Il s'agit d'une collecte d'informations que les communautés locales détiennent sur les ressources naturelles dont ils disposent, à savoir l'utilisation et la distribution des ressources végétales dans leur écosystème [105][106].

Les procédures et les méthodes utilisées lors de la réalisation des enquêtes ethnobotaniques et socio-économiques, permettent d'obtenir des informations sur les connaissances traditionnelles [107].

1.11.1.4. Intérêt de l'ethnobotanique

L'étude ethnobotanique permet l'évaluation du savoir des populations locales et de leurs relations avec les plantes. Elle fournit des éléments qui permettent de mieux comprendre comment les sociétés anciennes se sont insérées dans leur milieu naturel [108].

En outre, l'étude ethnobotanique s'intéresse à la culture, la récolte et l'utilisation possible et effective des plantes, ainsi que leurs rôles dans la vision du monde et la langue.

Le sujet le plus vaste est celui des plantes utilisées à des fins économiques, que ce soit des plantes domestiquées ou des plantes spontanées [101][108].

1.11.2. Essai botanique

Ce contrôle comporte :

1.11.2.1. Etude morphologique et analyse des caractères organoleptiques de la plante

Cette étude comprend notamment l'examen de la plante (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, et l'astringence pour les plantes à tanins) [46][52].

L'identification de la plante impose de connaître ses dénominations internationales qui sont les noms du genre et de l'espèce en latin, complétés par le nom de l'auteur et éventuellement par la variété [109]. Ces informations sont édictées par un document : le code international de nomenclature botanique (CINB) [24].

1.11.2.2. Analyse microscopique

L'essai botanique vise 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 [46][52].

1.11.2.3. Contrôle physico-chimique

Il complète le contrôle de l'identité et de la pureté et renseigne de même, sur l'activité de la drogue. Ce contrôle se divise en :

1.11.2.3.1. Essais qualitatifs

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

- par des tests physiques ou chimiques réalisés sur la drogue elle-même ou sur un extrait rapidement préparé : examen en lumière ultra-violette, les essais de solubilité et les réactions de coloration et de précipitation. Ces dernières peuvent aussi servir à la caractérisation des principes actifs en

chromatographie sur couche mince ou sur papier et à leur dosage [46][52] (Tableau 1.5).

- par une séparation et une identification des différents principes par des micro - méthodes physico- chimiques: chromatographie sur papier, chromatographie sur couche mince, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse, ainsi que des techniques combinées tel la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [110][111].

Tableau 1.5 : Principales réactions générales de colorations et de précipitation pour la caractérisation des métabolites secondaires [52].

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 catéchiqes.
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 Raymaond-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

[52]

1.11.2.3.2. Essais quantitatifs

- Dosage de l'eau :

Les végétaux frais sont très riches en eau : feuilles 60 à 80%, tissus lignifiés 40 à 50%. Pour une bonne conservation des plantes, la teneur en eau doit, en générale, être inférieure à 10%.

Il est important de connaître la teneur en eau puisqu'elle influe directement sur celle des principes actifs [52].

- Dosage des cendres :

Ce dosage est toujours préconisé dans l'essai de drogues végétales. C'est une évaluation de la teneur en éléments minéraux des drogues végétales. Il permet de détecter les falsifications par des charges minérales, ou les souillures par la terre au moment de la récolte de divers organes [46][52]

- Dosage des principes actifs :

Il permet, en général, d'apprécier la qualité de la drogue végétale. Il commence toujours par une extraction et une purification des principes à doser. Le dosage, proprement dit, 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 [46][52].

1.11.2.4. 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 [52]. L'essai physiologique d'une drogue comprend deux parties :

- 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.

- 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 d'un ou de plusieurs principes actifs. Elle consiste à :

- vérifier l'action spécifique de la drogue végétale sur les différentes fonctions physiologiques ou sur les organes chez l'animal ;
- réaliser des essais, *in vitro* et *in vivo*, sur 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'extrapolation des résultats observés chez les animaux ne peut être extrapolé à l'homme [46][52].

1.11.3. 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 :

1.11.3.1. Les méthodes microscopiques

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Cette image est soit observée à l'œil 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 [111].

1.11.3.2. Les méthodes chromatographiques

C'est un ensemble de méthodes de séparation basées sur différents principes physiques. Les plus utilisées sont la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Le couplage de la chromatographie gazeuse à la spectrométrie de masse est particulièrement intéressant pour l'identification des substances naturelles ou médicamenteuses [110].

1.11.3.3. Techniques spectroscopiques

Nombreuses sont les techniques spectroscopiques utilisées pour l'étude des plantes médicinales, nous en citerons à titre d'exemple : la spectrophotométrie UV-visible, la spectrophotométrie moléculaire infra-rouge (IR), la spectrométrie de masse, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire, ou encore la spectroscopie atomique [111][112].

1.11.3.4. Techniques de culture *in vitro*

La culture *in vitro* englobe un ensemble de techniques en plein essor, dont le principe consiste à reproduire des plantes semblables à la plante mère. Elles sont appelées « clones ». Elles sont obtenues par la stimulation des capacités naturelles de multiplication végétative de l'espèce, ou par l'induction d'une nouvelle organogenèse (directe ou indirecte) des bourgeons ou des racines, dans un milieu de culture approprié [113]

Ces techniques font intervenir, d'une part des éléments d'asepsie et d'autre part, la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé (milieu défini en particulier) [114]. Ces méthodes s'appliquent tout autant à des plantes entières qu'à des fragments de plants (tissus ou organes) ou à des cellules plus ou moins isolées [115].

D'une manière générale, la mise en culture *in vitro* des plantes apporte une solution élégante à de nombreux problèmes :

- Maintenir l'explant en vie mais aussi en activité,
- La conservation des génotypes dans des conditions idéales de protection contre les intempéries, les agressions, des ravageurs et des agents pathogènes,
- La multiplication dans des tubes d'une grande quantité de plants à partir de quelques individus d'où la possibilité de stocker dans un espace peu important des génotypes divers. Cette collection doit être dupliquée et conservée en des lieux géographiques distincts,
- La maintenance permanente d'un stock suffisant d'individus pour assurer la fourniture régulière d'une variété couramment commercialisée,
- La conservation des variétés en voie de disparition,
- La multiplication accélérée et la propagation des plantes dont la sexualité est défailante (cas de certains hybrides) [113][116][117][118].

CHAPITRE 2

EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSE

Les différentes extractions ont été réalisées au niveau du laboratoire de recherche de biologie végétale, du département de Biologie à l'université 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 ;
- Le centre de recherche et développement de Sonatrach- Boumerdès.

La composition lipidique de l'aristoloche et la détermination de la teneur et types d'acides aristolochiques ont été déterminées au département de chimie et biochimie, à l'université des Sciences Agricoles et Médecine Vétérinaire de Cluj-Napoca- Roumanie.

Les essais antibactériens ont été réalisés au niveau du laboratoire de stérilité du complexe Antibiotical de SAIDAL et au laboratoire de recherche de Biologie Végétale du département de Biologie (Université Saad Dahlab de Blida).

L'expérimentation de la culture *in vitro* a été réalisée dans le laboratoire de la culture *in vitro* de l'ENARP (Bab Ezzouar).

L'étude de la toxicité aigue des différents extraits de la plante *Aristolochia longa* L. a été réalisée au laboratoire de toxicologie du complexe SAIDAL de Médéa.

2.1. Matériel d'études

2.1.1. Matériel non biologique (Voir appendice B).

2.1.2. Matériel végétal

Les plantes d'*Aristolochia longa* L. ont été récoltées au niveau de la station de Ben-Ali, dans la forêt de *Chréa* à 700m d'altitude. Leur identification 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 feuilles et les tubercules ont été récoltés en période de floraison au cours de trois sorties le 24-04-2007, le 06-05-2007 et le 21-05-2007. Après maturité des graines un autre prélèvement a eu lieu le 23-07-2007.

Les plantes ont été lavées et séchées, à l'abri de la lumière et à température ambiante (25 à 28°C). Après séchage, le matériel végétal est fractionné en deux parties : l'une est broyée pour obtenir une poudre fine, qui servira à la préparation des extraits, l'autre pour l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau. En mai 2008, un autre prélèvement de feuilles, tubercules et fruits a été effectué dans la même région

2.1.3. Les microorganismes utilisés

Les bactéries utilisées sont des bactéries identifiées et référencées par le laboratoire de stérilité et le laboratoire de microbiologie (Complexe Antibiotical SAIDAL), et par le laboratoire de recherche de microbiologie du département vétérinaire de l'université de Blida.

2.1.4. Matériel animal

Les animaux de laboratoires utilisés dans l'essai préliminaire de la toxicité sont des souris en nombre de 48, avec l'identification suivante :

Souris : *Mus musculus*, variété Albinos.

Souche : NMRI.

Poids : de 18 à 21g.

Nourriture : Granules d'origine ONAB, fournisseur « la production locale », Bouzareah.

Boisson : eau du robinet (eau potable)

Les essais ont eu lieu dans les conditions normales d'une animalerie conventionnelle.

2.2. Méthodes

2.2.1. Etude ethnobotanique

L'enquête que nous avons menée sur terrain s'est déroulée en deux phases :

- La première phase porte principalement sur des entretiens effectués avec des personnes spécialisées dans le domaine de la phytothérapie et médecine traditionnelle (médecins phytothérapeutes et herboristes) , afin d'établir une fiche technique de la plante *Aristolochia longa*.L.

La fiche comporte :

- Nom vernaculaire
- Nom scientifique
- Famille de la plante
- Localisation de la plante
- Culture
- Parties utilisées
- Période de récolte.

- La deuxième phase concerne un sondage auprès d'un groupe de la population, représentant toutes les catégories sociales, suivant un questionnaire qui leur a été remis (Appendice B).

Ce sondage est effectué dans le but de recueillir des informations sur la plante mais aussi des informations sur les connaissances en phytothérapie de ce groupe et ses préférences entre un traitement médical et un traitement naturel.

Cette enquête a concerné un échantillonnage de 116 personnes questionnées aléatoirement, dans les Wilayas suivantes : Blida, Alger, Boumerdès, Constantine, Médéa, Ghardaïa, Sétif, Jijel.

2.2.2. Etude macroscopique et microscopique

Le but de cette étape est de chercher d'éventuelles spécificités morphologique et anatomique de la plante. Nous nous appuyons sur :

2.2.2.1. Examen macroscopique de la fleur

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

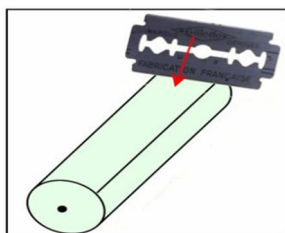
2.2.2.2. Examen microscopique de la tige et feuille

Nous avons étudié dans cette étape la tige et la feuille, par contre l'examen microscopique des tubercules n'a pas été fait, car ces organes végétaux sont très durs.

La coloration est réalisée selon le protocole adopté au sein du laboratoire de Biologie Végétale du Département de Biologie (Université de Blida) (Figure 2.1) avec les étapes suivantes :

- les coupes sont plongées dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules de leur contenu,
- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min,
- 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 pendant 5 à 10 min puis nous les plongeons dans le rouge Congo 15-20 min,
- Les coupes sont ensuite lavées à l'eau, montées entre lame et lamelle et observées au microscope photonique.

Réalisation des coupes :



Les différentes étapes de la double coloration :

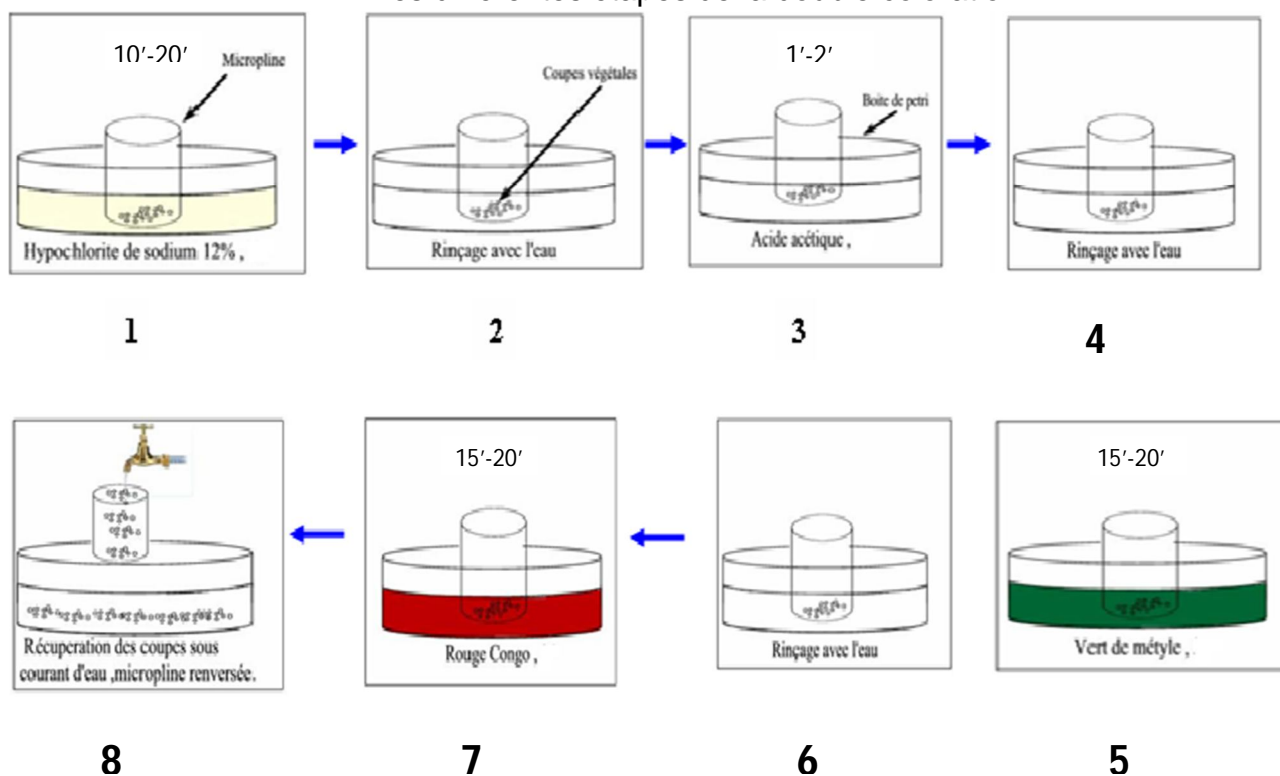


Figure 2.1 : Technique de la double coloration.

2.2.3. Etude phytochimique

Le but de cette étude est de :

- déterminer la teneur en eau et en cendres ;
- caractériser certains métabolites secondaires de la plante *Aristolochia longa* L.
- déterminer la teneur et les types d'acides aristolochiques de cette espèce.

2.2.3.1. Détermination de la teneur en eau et en matière minérale

2.2.3.1.1. Teneur en eau

Nous avons suivi le protocole de ZERRAD et al.[119]. Ainsi nous avons placé des échantillons de feuilles et de tubercules de poids déterminé dans une étuve portée à 75°C. Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures, pendant une semaine, jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

2.2.3.1.2. Teneur en matière minérale – cendres -

Nous avons fait la minéralisation selon le protocole de MARTIN et al. [120]. PINTA [121] ; PINTA [122].

Mode opératoire :

Les étapes de la minéralisation sont les suivantes :

- Dans une capsule en porcelaine, nous pesons 1 gramme de poudre de tubercules finement broyés,
- La capsule est déposée dans le four à moufle froid, puis nous élevons la température jusqu'à 450°C pendant 2 heures. Les échantillons y sont maintenus pendant 2 heures.
- Après refroidissement, nous humectons les cendres par 2 à 3 ml d'acide chlorhydrique concentré, elles sont ensuite chauffées jusqu'à l'apparition des premières vapeurs, quelques millilitres d'eau déminéralisée sont ajoutés.
- Le contenu ainsi obtenu est filtré, puis rincé 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 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 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 [123].

Mode opératoire :

1 ml de la solution des cendres est dilué dans un litre d'eau. De cette solution, nous avons injecté 20µl dans l'appareil de la chromatographie ionique de type ICS 3000. Les conditions de cette analyse sont regroupées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Les conditions de l'analyse par chromatographie ionique

	Anions	Cations
Eluant	NaOH 30 Mm	H ₂ SO ₄ 11Mm
Débit	1,5 ml/mn	1 ml/mn
Température	30°C	Ambiante
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, plus particulièrement les métaux, 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 fondamental le fait passer à un état excité. Le retour à l'état fondamental se manifeste par l'émission de radiation caractéristique dont la plus connue est généralement la plus intense et 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 fondamental, par une radiation de longueur d'onde connue. Ces atomes absorbent cette radiation [111].

2.2.3.1.3. Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été effectué par la technique de KJELDAHL, selon le protocole de MARTIN et al. [120] et PINTA [121].

Principe :

En attaquant la matière végétale par l'acide sulfurique concentré à ébullition, en présence de catalyseur, 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[120][121].

Mode opératoire :

- 200 mg de poudre de tubercules séchés, mélangés avec 5 ml d'acide sulfurique concentré, sont introduits dans un matras de 150 ml et laissés en contact pendant une demie heure ;
- Nous ajoutons 200 mg de catalyseur (composition en appendice B) nous chauffons quelques instants puis nous les portons à ébullition jusqu'à la décoloration des échantillons,
- Après refroidissement, nous ajoutons 30ml 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 contenant préalablement 0,5 ml d'indicateur coloré (composition en appendice B) 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. [121] et PINTA [122] : $N\% = n / 10Xp$

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 la méthode KJEDAHN, ensuite multiplier cette teneur en azote par le facteur conventionnel 6,25 [82].

$$\%PRO = \%N \times 6,25. [122]$$

2.2.3.2. Caractérisation de quelques métabolites secondaires d'*Aristolochia Longa*

Le but de cette étape est de révéler la présence de certains métabolites secondaires d'*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.

Principe :

Le protocole expérimental est celui de FOUNEGEB et al.[124]. Il repose sur la technique d'extraction par solvants successifs. Il se fait en deux étapes :

Mode opératoire :

Etape 1 :

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

- 10g de poudre végétale sont extraits par 300ml 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, 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 [125].

Les concrètes apolaires et polaires des tubercules et des feuilles vont être analysées par spectrophotométrie ultraviolet- visible. Pour cette analyse, nous avons préparé des solutions de 100µg /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 [110][111].

L'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800nm, correspond à l'ultra violet (190-400nm) et au visible (400-800nm) [112].

2.2.3.2.1. Identification des métabolites secondaires

Une fois extraits, les métabolites secondaires vont être identifiés par des réactions colorimétriques. Ainsi ces métabolites sont 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 [110]. 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 [123]. Il va entraîner la substance avec lui, chaque substance à une vitesse différente [110]. 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 [112]. 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) [111].

Mode opératoire :

- A partir de la concrète alcoolique, nous préparons une solution méthanolique de 1mg/ml [124],
- Nous déposons 10 μ l de la solution méthanolique préparée à environ 2cm 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 4-1-5 v/v,
- Après migration, les plaques sont séchées à température ambiante du laboratoire (25°C-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.[124]. Le réactif de Dragendorff est préparé selon le protocole de Meuwly [126].

Tableau 2.2 : Les révélateurs et les métabolites recherchés pour la caractérisation de certains métabolites secondaires d'*Aristolochia longa* L.

	Chlorure d'aluminium	Chlorure ferrique	Potasse alcoolique	Réactif de Dragendorff
Couleur des spots (résultat positif)	Tâche jaunes, jaunes vertes et ocre 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 au crayon et nous calculons le Rf. [123]

Calcul du *Rf* : La distance parcourue par la substance est mesurée en centimètre. [106][127].

2.2.3.2.2. Caractérisation des saponines

Pour caractériser les saponines et calculer l'indice de mousse nous avons suivi le protocole de Paris et Moyse [127] en calculant l'indice de mousse :

- Dans une fiole conique de 500 ml, renfermant 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 100ml avec de l'eau distillée,
- Dans une série de tubes à essai, nous mesurons successivement 1, 2 jusqu'à 10ml de décocté, puis nous ajustons le volume de chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée,
- Nous agitons les tubes pendant 15 secondes et nous laissons reposer 15 minutes,
- Nous mesurons ensuite la hauteur de la mousse.

$$I_m = \frac{10 \cdot H}{0,01 \cdot x}$$

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 [127]

2.2.3.2.3. Caractérisation des tanins

Nous introduisons dans un tube à essai 3 ml de la solution de la concrète polaire, puis nous ajoutons 2 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique [46].

2.2.3.3. Teneur et types des acides aristolochiques

Les teneurs et types des acides aristolochiques ont été déterminés pour les récoltes de 2007 et celle de 2008 avec des protocoles différents.

La séparation de l'acide aristolochique et sa purification ont été faites selon le protocole de CARRERAS [128]. Ce protocole se base sur la séparation liquide-liquide.

Mode opératoire :

- 100g de poudre de tubercule, sont extraits par l'hexane, au moyen du Soxhlet,
- La poudre dégraissée est séchée à la température ambiante du laboratoire (25-28° 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 décanter la solution,
- 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) afin d'identifier les différents types d'acide aristolochique présent dans la plante.

L'extraction a été répétée trois fois. Nous avons utilisé 100 grammes de poudre des tubercules dans chaque extraction, cependant pour les feuilles nous avons utilisés seulement 50 grammes 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 [120].

Mode opératoire :

- Préparation de la solution étalon :

La solution standard est préparée selon Yuan et al. [80 a]. Le standard est un mélange de deux types d'acide aristolochique. Il contient les acides aristolochiques I(AAI) et II(AAII) respectivement avec des teneurs de 29% et 69%. Nous avons pesé 5mg de ce standard et nous l'avons mis dans 5ml de méthanol. Après dissolution de la poudre, nous avons dilué la solution obtenue 10 fois dans du méthanol.

Dans la solution standard, la concentration en acides aristolochique I est de 29 μ g/ml et celle de l'acide aristolochique II est de 69 μ g/ml.

- Les solutions échantillons (feuilles et tubercules) sont composées de :

Extrait alcoolique :

- 300g de poudre végétale sont dilués dans 10ml de méthanol70%,
- Cette solution subit une sonication pendant 15min,

- Centrifugation pendant 10 minutes à 3100g,
- Ces étapes sont répétées trois fois. Les surnageants sont récupérés et additionnés,
 - Nous condensons la solution méthanolique par évaporateur rotatif,
 - Nous diluons la poudre obtenue avec 50ml de méthanol à 70% [84][85].

Solution de l'acide aristolochique purifié :

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

La séparation a été faite sur une colonne C 18(25cm/4.6mm) avec un débit de 0.5ml/ min pour les parties végétales récoltées en période de floraison, et un débit de 1ml/min pour les parties récoltées après maturité des graines. La température est de 30°C .La phase mobile utilisée est simple, reproductible, composée de méthanol eau 60-40 v/v. Cette phase ressemble beaucoup à celle utilisée par CHERIF et al. [129].

- Détermination des acides aristolochiques pour les échantillons de 2008 :

Le protocole utilisé est celui du laboratoire de biochimie du département de chimie à l'université de Cluj- Napoca – Roumanie.

Le matériel végétal a été récolté dans la forêt de Chréa en 2008 entre le mois de mai et juin.

Mode opératoire :

La spectrophotométrie infra rouge transformée de Fourier (FTIR) :

Elle a été utilisée afin de nous permettre de détecter les familles chimiques qui nous intéressent, en l'occurrence les alcaloïdes. La longueur d'onde est de 280nm. Les spectres UV-VIS sont enregistrés par un spectrophotomètre UV- VIS de marque Jasco V-530.

- HPLC

Préparation des échantillons :

- 0,1 g de la concrète alcoolique sont dilués dans 10 ml de méthanol 95%+1% HCl.
- L'extrait est filtré puis 20 μ l sont injectés dans l'appareil HPLC système Agilent 1200.

Conditions opératoires :

La séparation a été faite sur une colonne LC18 (25cm x4,6 mm) en utilisant un gradient A (méthanol : acide acétique : eau 10 :2 :88) et un gradient B (méthanol :acide acétique :eau 90 :3 :7) pendant 55 min, détection ou enregistrement à $\lambda = 280$ nm.

Gradient:

Temps	0	10	30	45	55
Solvant en %					
Solvant A %	100	85	50	15	100
Solvant B %	0	15	50	85	0

Debit: 1ml/min

Temperature: 25° C

Solution Standard :

Le Standard utilisé est un mélange de deux acides aristolochiques AA-I (66.13%) et AAII (33.87%). Les deux acides sont séparés dès les premières 20 minutes de l'analyse.

- Préparation des échantillons à analyser :

L'analyse a concerné 3 parties de la plante : Rhizomes, feuilles et fruits.

Par HPLC nous analysons les concrètes et poudres. Au préalable nous procédons à l'extraction par solvant (méthanol) au Soxhlet .

Vers la fin de l'opération nous récupérons la concrète des feuilles, et racines, ainsi que la poudre des feuilles, racines et fruit.

Nous injectons le standard de l'acide aristolochique dilué à 0.1 mg/ml, de même pour la concrète, vu sa forte concentration en composés divers, surtout les composés phénoliques qui apparaissent importants.

2.2.3.4. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par entraînement à la vapeur d'eau, afin d'en obtenir un maximum.

- Principe de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Le but est d'entraîner avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée en essence de la matière végétale distillée, se condense dans le condensateur avant d'être récupérée dans une ampoule à décanter. On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits [130]. Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile.

- Mode opératoire :

- Nous préparons la matière végétale sèche puis on s'assure que toutes les parties du dispositif sont reliées les unes aux autres.

- Nous remplissons le ballon avec 500g de matière végétale sèche (tubercules ou feuilles).

- Remplir l'Erlenmeyer jusqu'à 4L et laisser sur une plaque chauffante. La vapeur commence à s'acheminer à travers le tube vers l'ampoule de sécurité puis vers le ballon où se trouve le végétal.

- Le distillat s'écoule goutte à goutte dans l'ampoule à décanter dès qu'elle se remplit, celui-ci est transvasé dans un Erlenmeyer.

Ce distillat est constitué de 2 phases intimement mélangées, une phase huileuse qui est l'huile essentielle et une phase aqueuse,

- La séparation des deux phases se fait par une solution organique qui est l'éther diéthylique ; c'est l'extraction liquide-liquide,
- La phase organique est versée dans un ballon à fond plat, et nous jetons la phase aqueuse,

- Après la distillation sous vide dans un évaporateur rotatif, nous récupérons d'une part, le solvant qui est l'éther di éthylique et d'autre part, l'huile essentielle.

- Conditions opératoires :

L'huile essentielle récupérée est analysée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (CG 6890N) couplé à une spectrométrie de masse (5973 N Agilent Technologies), dans les conditions opératoires suivantes :

- Débit du gaz vecteur = 1ml/min, gaz : l'hélium, injecteur split,
- Colonne HP 5(30mx0.32mm, en silice fondue, phase stationnaire HP-1(méthyle silicone) Idx0.25µm,
- T° initiale = 37° pendant 5mn avec une pente de 2°C /min,
- T° finale = 250° C pendant 15mn,
- Energie du ID : 70Ev,
- Voltage du multiplicateur 200v

2.2.3.5. Détermination du profil lipidique

La détermination des acides gras a concerné les huiles essentielles et les concrètes des feuilles, racines et fruits d'*Aristolochia longa* L.

Le protocole utilisé est celui du laboratoire de biochimie du département de chimie à l'université de cluj-Napoca – Roumanie.

2.2.3.5.1. Conditionnement des concrètes

A 5 ml de concrètes diluées dans du Méthanol, rajouter 15ml d'éther éthylique, filtrer, rajouter ensuite 10ml d'eau distillée, conserver ou mettre à l'abri de la lumière.

10ml d'eau distillée sont encore rajoutés, sécher par la suite avec du Na₂So₄, et un courant de nitrogène.

Après trans-estérification et extraction des esters, vérifier les tâches sur plaque de CCM, et enfin injecter dans l'appareil de CPG.

2.2.3.5.2. Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse

- Appareil type Shimadzu CG17 A
- Détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Colonne de type capillaire : 30mx0.25um, fine couche de polyéthylène glycol (Altech AT-WAX)
- Gaz vecteur : L'hélium, pression de 147kPa
- T°C injecteur : 260°C
- T°C détecteur : 260C
- Volume d'injection : 1 µl.

2.2.4. Essai bactériologique

Le but de cette étape est d'étudier l'effet antibactérien, principalement de l'acide aristolochique présent dans les extraits de la plante (concrète et HE). Ce travail a concerné des échantillons récoltés en 2007 et ceux de 2008. Le premier essai bactériologique a concerné l'acide aristolochique extrait et purifié à partir des tubercules récoltés après maturité des graines en 2007, et l'extrait alcoolique des tubercules de 2007.

La méthode utilisée dans l'étude du pouvoir antibactérien est celle suivie dans le laboratoire de stérilité (SAIDAL).

Mode opératoire :

- Préparer le milieu de Soja-Agar selon le laboratoire de stérilité (SAIDAL). Ensuite, stériliser le milieu pendant 20min à 120°C.
- Laisser le milieu 5min à la température du laboratoire (25-28°C) avant de couler dans des boîtes de Pétri sous une hotte à flux laminaire.
- Préparer des solutions de 1mg/ml de l'acide aristolochique et de la concrète alcoolique des tubercules, dans de l'eau physiologique.
- Devant un bec-benzène, ensemercer les souches bactériennes (Tableau 2.3), en suspension dans de l'eau physiologique, dans les boîtes de Pétri contenant le milieu préparé de Soja-Agar.

- Imbiber les disques (de papier filtre de 1cm de diamètre) par les solutions à tester, puis déposer les boîtes de Pétri dans une étuve à 37°C pendant 24heures.
- Après 24 heures, mesurer la zone d'inhibition.

Tableau 2.3 : Les souches bactériennes (Essai de 2007)

Les souches	Références
<i>Bacillus subtilis</i> (B)	ATCC 6633
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas sp</i>	-
<i>Serratia marcesens</i>	-
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	ATCC 1803
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-

Un deuxième essai bactériologique a été effectué où nous avons utilisé séparément la poudre des feuilles, tubercules et fruits récoltée en 2008. En outre, l'huile essentielle des feuilles d'*Aristolochia longa* L. a aussi été testée.

Les souches utilisées (Tableau 2.4) sont des souches du laboratoire de microbiologie de SAIDAL–Médéa-

Tableau 2.4 : Les souches bactériennes (Essai de 2008)

Les souches	références
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29737
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>E. coli</i>	ATCC 2601
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 10536
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Mode opératoire :

- Mettre 1g de poudre de feuilles séchée et broyée dans 10 ml d'eau physiologique, ce mélange représente la solution mère,
- Répéter l'opération avec 1g de poudre de tubercule séché et broyé, faire de même pour la poudre de fruits.
- Après une heure filtrer la solution mère et préparer 4 dilutions dans des tubes à essai comme suit :
 - 1^{er} tube : dilution $\frac{1}{2}$ (2ml de solution mère + 2ml d'eau physiologique)
 - 2^{ème} tube : dilution $\frac{1}{4}$ (2ml de dilution $\frac{1}{2}$ + 2ml d'eau physiologique)
 - 3^{ème} tube : dilution $\frac{1}{8}$ (2ml de dilution $\frac{1}{4}$ + 2ml d'eau physiologique)
 - 4^{ème} tube : dilution $\frac{1}{16}$ (2ml de dilution $\frac{1}{8}$ + 2ml d'eau physiologique)
- Préparer par la suite, 6 boîtes de Pétri contenant le milieu de culture (le milieu Muller-Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour les champignons), -
Ensemencer les souches, chacune dans une boîte de Pétri contenant son milieu de culture adéquat,
- Immerger un disque dans la solution mère, ensuite le mettre dans la boîte de Pétri. Répéter la même chose pour les autres dilutions,
- Suivre les mêmes étapes pour les autres boîtes.
- Après une heure, incuber les boîtes dans une étuve portée à 37°C,
Les boîtes de Pétri contenant des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, sont incubées à 25°C.
- Après 18 heures, retirer les boîtes de Pétri de l'étuve,
- Pour l'huile essentielle, la solution mère est composée de 0,5ml d'huile + 0,5 ml d'hexane. Nous préparons les dilutions suivantes : $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{16}$, puis nous suivons les mêmes étapes que celles des échantillons en poudre.
- Après incubation, mesurer les diamètres des zones d'inhibition par un lecteur de zones.

2.2.5. Culture In Vitro

2.2.5.1 Matériel végétal

L'étude a porté sur les jeunes feuilles, les nœuds et les entres nœuds d'*Aristolochia longa* L. Les échantillons sont récoltés au niveau de la station de Chréa (BLIDA), entre le mois de Mai et juillet 2007.

2.2.5.2 Méthodes

2.2.5.2.1. Stérilisation du matériel végétal

Deux tests ont été réalisés pour la stérilisation des échantillons. Nous avons faits varier les concentrations en hypochlorite de calcium et ceux du chlorure mercurique. Toutes les étapes de désinfection ont lieu sous la hotte à flux laminaire. L'ensemble des expériences est illustré dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : protocole de stérilisation

	Désinfectant	Concentration	Temps de trempage
	Rinçage à l'eau courante		
	Bénomyl	1 g/l	30 min
	Ethanol	70%	30 secondes
Test 1	Hypochlorite de calcium Ca (OCl ₂)	3 mg/l	15 min
		5 mg/l	
		8 mg/l	
		11 mg/l	
Test 2	Chlorure mercurique HgCl ₂	0.2 mg/l	10 min
		0.35 mg/l	
		0.5 mg/l	
		0.8 mg/l	
	Rinçage 5 fois à l'eau distillée stérile		

L'eau distillée qui sert à la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, ainsi que la verrerie et les pinces, sont stérilisées à l'autoclave à une température de 120 °C pendant une heure.

2.2.5.2.2. Milieu de culture

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés par autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Le pH est ajusté à 5.7 à 5.8 avec NaOH ou avec HCL, selon le milieu, acide ou basique.

Le milieu de culture de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG [131](MS), qui comporte :

- Sels minéraux
 - Les macro-éléments MS
 - Les micro-éléments MS
 - Le Fer –EDTA
- Vitamines de Morel
- Antioxydant : Acide ascorbique ((0.1g/L)
- Source de carbone : Mannitol (20g/l)
- Gélification : l'agar-agar 7g/l

La composition des milieux est rapportée dans les tableaux 2.6 et 2.7 :

Tableau 2.6 : Compositions des solutions minérales utilisées lors de l'expérimentation

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)
Macroéléments MS	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₄ , 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ , 2H ₂ O	370
Microéléments MS	MnSO ₄ , 4 H ₂ O	16.9
	H ₃ BO ₃	6.2
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.6
	KI	0.83
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Fe EDTA	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3

Tableau 2.7 : solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml

Vitamines	Concentrations (mg/100ml)
Acide nicotinique	1
Pyridoxine (vitamine B ₆)	1
Thiamine (vitamine B ₁)	1
Pantothénate de Calcium	1
Biotine	0.01
Méso-inositol	100

[115]

- Les régulateurs de croissance :

SKOOG et MILLER [132] furent les premiers à mettre en évidence le rôle de l'équilibre auxine/cytokinine exogène dans l'orientation de l'organogenèse *in vitro*

Pour obtenir des plantules à partir de fragment de plante, nous avons utilisé la technique de micropropagation. Deux voies ont été étudiées :

2.2.5.3. Organogenèse directe

Les vitro-plants ont été obtenus directement à partir des explants sans passage par la forme de cal.

Dans ce cas, les explants utilisés sont des bourgeons axillaires et l'apex de la tige. Leurs longueurs varient entre 0.5 à 1 cm. Les explants sont repiqués dans le milieu de culture de base MS additionné de différentes quantités d'hormones de croissance en combinaisons suivantes : les BAP avec les auxines et la kinétine avec les auxines (tableau 2.8). Pour les combinaisons hormonales nous nous sommes appuyées sur les travaux de Augé et al [113]

Tableau 2.8 : combinaisons hormonales d'organogenèse directe

M ₁	Sans hormones
Première combinaison : BAP + auxines	
M ₂	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIB)
M ₃	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIA)
M ₄	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
M ₅	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (2.4-D)
M ₆	1.5 mg /l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
Deuxième combinaison : kinétine + auxines	
M ₈	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIA)
M ₉	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIB)
M ₁₀	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (ANA)
M ₁₁	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (2.4-D)

2.2.5.4. Organogenèse indirecte

Tous les vitro-plants obtenus passent par la phase de callogenèse. Nous avons utilisés des fragments de feuilles de 0.25 cm².

Les combinaisons hormonales utilisées entre les auxines et les cytokinines ont la même concentration (tableau 2.9).

Tableau 2.9 : combinaisons hormonales d'organogenèse indirecte.

Première combinaison : BAP + auxines	
M ₁	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIA
M ₂	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIB
M ₃	1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA
M ₄	1 mg/l BAP + 1 mg/l 2.4-D
Deuxième combinaison : Kinétine + auxines	
M ₅	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIA
M ₆	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIB
M ₇	1 mg/l Kin + 1 mg/l ANA
M ₈	1 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D

2.2.5.4.1. Phase d'élongation

Nous avons établi des balances hormonales Gibbérelline/cytokinines (tableau 2.10) dans le but de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds des vitro-plants obtenus à partir des deux types d'organogenèse directe et indirecte.

Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro-plants issus de l'introduction primaire. Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG [131]

Tableau 2.10 : Balances hormonales du milieu d'élongation.

	Gibbérelline (GA ₃)	Cytokinines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	1 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₃	1 mg/l GA ₃	1 mg/l BAP
M ₄	1.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₅	1 mg/l GA ₃	----

2.2.5.4.2. Phase d'enracinement

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. La rhizogenèse, comme tout phénomène d'organogenèse, est déclenchée par des interactions entre les hormones de croissances.

En effet, la différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines.

Les milieux utilisés sont illustrés dans le tableau 2.11.

Tableau 2.11 : Balances hormonales du milieu d'enracinement

	Gibbérelline (GA ₃)	Auxines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	0.5mg/l GA ₃	1mg/l 2.4 D
M ₃	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l AIA
M ₄	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l ANA
M ₅	0.5 mg/l GA ₃	1mg/l AIB

2.2.5.4.3. Acclimatation

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à acclimater progressivement les micro-plantules enracinées aux conditions externes. Nous commençons en premier lieu, par l'élimination de la gélose à la base des plantules par un lavage à l'eau. Ce dernier contient un fongicide (bénomyl à 1g/l) car le milieu qui subsiste sur les racines favorise le développement de micro-organismes.

Les pousses enracinées sont transférées vers des gobelets contenant soit de la tourbe préalablement stérilisée à 120°C pendant 2 heures, soit la tourbe avec la perlite.

Les parties aériennes des plantules sont recouvertes par un cache en plastique transparent de manière à les maintenir dans un environnement qui est voisin de 100 % d'humidité relative [133].

2.2.5.4.4. Conditions de culture

Les échantillons sont introduits dans des tubes à essais (20 x 2 cm) ou boîtes de Pétri. Ils sont installés dans deux chambres de culture :

Chambre 1 :

La température : 27°C ± 2°C.

La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité

Chambre 2 :

La température : $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

La photopériode : 24 heures d'obscurité.

2.2.5.5. Mode d'expression des résultats

Nous avons opté pour la randomisation totale avec un seul facteur pour cette expérimentation, vu que les conditions de l'environnement sont contrôlées.

Ainsi, le facteur est le milieu de culture. Il comprend des variantes qui sont les hormones de croissance.

Chaque traitement est répété vingt fois. Durant l'expérimentation, les observations réalisées après un mois de mise en culture, portent sur les paramètres suivants :

- Le nombre moyen et le type de contamination
- Le nombre moyen des explants qui poussent dans chaque milieu.
- La longueur moyenne de la tige en cm.
- Le nombre moyen des vitro-plants ayant émis des racines.
- Les poids des cals au cours du développement.
- La couleur et la texture des cals

Afin de comparer la morphogenèse des plants d'une subculture à l'autre et l'influence de celle-ci sur la morphogenèse des vitro-plants, les résultats obtenus sont traités par le calcul du :

- Pourcentage de réussite dans les milieux de multiplication
- Pourcentage d'enracinement
- Pourcentage des cals ayant émis des bourgeons et des racines.
 - Croissance en longueur des vitro-plants et le développement des cals sont traités par une analyse de la variance au seuil de signification $\alpha = 5\%$.

Le test de NEWMAN et KEULS permet de constituer les groupes de traitements homogènes en se basant sur les différences significatives (P.P.D.S). Lorsque la différence observée entre les moyennes extrêmes d'un groupe de K moyennes est inférieure à la P.P.D.S, nous pouvons déduire que les K moyennes

constituent des groupes homogènes [134]. Ces calculs sont faits par un logiciel de SPSS 15.0

2.2.6. Etude préliminaire de la toxicité aigue de *Aristolochia longa* L .

En 1928, Ivan pensa à une méthode chiffrée de comparaison de la toxicité des substances chimiques. Il créa alors la DL50 (Dose létale de 50% des animaux testés).

D'après HODGSON [135], les effets rencontrés avec la toxicité aigue consistent généralement en mortalité et /ou morbidité.

2.2.6.1. But

Elle permet de connaître le degré de toxicité d'un produit, en fonction de la voie d'administration et de l'espèce animale. Elle consiste à déterminer statistiquement la dose moyenne qui provoque la mortalité de la moitié des animaux testés [136].

2.2.6.2. Distribution des lots

Dans cet essai, nous avons choisi de travailler sur des souris en raison de leur disponibilité. Nous avons utilisé 48 souris, toutes de sexe mâle, réparties en quatre lots, contenant chacun 12 souris.

2.2.6.3. Essai limite

Nous avons testé la poudre de tubercules d'*Aristolochia longa* L., de la première récolte à savoir celle de 2007.

Principe :

Un essai limite de toxicité aigue peut être effectué sur des souris ou des rats [137] [138] en administrant par voie intra gastrique une dose unique du produit à tester et observer pendant 15 jours afin de signaler les cas de mortalité.

Mode opératoire :

Dans ce test il y a deux étapes

Etape 1 :

- Préparer 4 solutions à administrer, à des doses différentes : 0.4g/kg, 0.8 g/kg, 1.6g/kg et 3.2 g/kg.
- Calculer en premier lieu les doses correspondantes au poids moyen des souris (20 g).

La procédure est la suivante :

0.4g de poudre \longrightarrow 1000 g de poids corporel

X_1 \longrightarrow 20g (poids moyen d'une souris)

$$X=0.008g=8mg$$

8mg : c'est la quantité de la poudre à donner pour une souris de 20g de poids

Chaque souris reçoit 0.5ml de la solution à tester,

On procède au calcul suivant :

8mg \longrightarrow 0.5ml

Y \longrightarrow 5ml

$$Y=80mg/5ml \text{ d'eau distillée}$$

5ml : le volume de la solution à préparer pour les lots de souris

On fait le même calcul pour les autres doses :

0.8g \longrightarrow 1000g

X_2 \longrightarrow 20g

$$X_2=0.016g=16mg$$

16mg/0.5ml donc 160mg/5ml

1.6g \longrightarrow 100g

X_3 \longrightarrow 20g

$$X_3=0.032g=32mg$$

32mg/0.5ml donc 320mg/5ml

3.2g \longrightarrow 1000g

X_4 \longrightarrow 20g

$$X_4=64mg$$

64mg/0.5ml donc 640mg/5ml

- Une fois les doses calculées et les solutions préparées, nous répartissons les animaux de laboratoire en lots.

- Les souris sont réparties dans des cages numérotées en précisant l'espèce, le poids, le nombre, le sexe, le produit à tester, la nature et la date de l'analyse (Fig.2.2).

Test :
Dose :
N° de lot :
Espèce :
Poids :
Nombre :
Sexe :
Nom de produit :
Date de l'analyse :
Nom de l'analyste :

Fig.2.2 : Type d'étiquetage

- Mettre les souris à jeun la veille du test, les quantités d'eau ne sont pas limitées.
- Administrer par voie orale les doses préparées de la poudre végétale. Chaque souris reçoit 0.5ml de la solution à l'aide d'une sonde de gavage.

12 souris reçoivent la 1^{ère} dose de 80 mg/5ml.

12 souris reçoivent la 2^{ème} dose de 160 mg/5ml.

12 souris reçoivent la 3^{ème} dose de 320 mg/5ml.

12 souris reçoivent la 4^{ème} dose de 640 mg/5ml.

- Priver les souris de nourriture pendant 2 à 3 heures après l'administration de la solution,
- Noter toute mortalité ou comportement étranger.

Etape 2 :

Les doses dépassant 640mg/5ml sont insolubles dans l'eau physiologique, nous avons donc essayé de les mélanger premièrement avec l'aliment des souris et deuxièmement avec le fromage

Les doses préparées sont :

4g d'aliment (ou fromage) + 1g de poudre de tubercules.

3g d'aliment (ou fromage) + 2g de poudre de tubercules.

2g d'aliment (ou fromage) + 3g de poudre de tubercules.

1g d'aliment (ou fromage) + 4g de poudre de tubercules

2.2.6.4. Essai répété

Concernant la plante récoltée en 2008, nous avons appliqué le même test que précédemment, sauf que l'administration des solutions dure 15 jours.

Ce test concerne les feuilles, les fruits et les tubercules.

Pour les feuilles, la dernière dose (3,2g/kg) étant insoluble dans l'eau physiologique, elle sera donc éliminée.

La répartition des souris en lots est illustrée dans le tableau 2.12

Tableau 2.12 : Répartition des souris en lots

Organes végétaux Doses (mg/5ml)	Feuilles	Fruits	Tubercules	Lot témoin
80mg/ 5ml	3	3	3	-
160mg/ 5ml	3	3	3	-
320mg/5ml	3	3	3	-
640mg/5ml		3	3	-
	T=9	T=12	T=12	T=3

En plus de la mortalité, d'autres signes de toxicité, tel que les vomissements, la diarrhée, l'irritation et tout autre comportement ou symptôme inhabituel, sont notés afin d'évaluer la DL50 [137].

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'étude ethnobotanique

3.1.1. Résultats de la première enquête

Les informations obtenues suite à la première enquête effectuée auprès des spécialistes en phytothérapie, sont rassemblées dans le tableau 3.1 (App C)

Nous avons également établi une fiche technique qui comprend :

Nom vernaculaire français	Aristolochie longue
Nom vernaculaire arabe	Elzarawend eltawil
Nom vernaculaire local	Bouzdoum
Nom vernaculaire berbère	Ajrarkhi
Nom scientifique	<i>Aristolochia longa</i> L.
Famille de la plante	Aristolochiacée
Localisation de la plante	Lieux humides et ombrés
Culture	Plante spontanée
Parties utilisées	Rhizome et feuilles
Période de récolte	Mai, Septembre

La première enquête nous a permis de collecter des informations sur le nom vernaculaire de l'aristolochie, sa localisation, sa culture, les parties végétales utilisées et ses divers emplois en médecine traditionnelle.

3.1.2. Résultats de la deuxième enquête

L'enquête a concerné un échantillonnage de 116 personnes. Elle a abouti aux résultats illustrés par les figures de 3.1 à 3.9

* Question n° 01 : Connaissez- vous la phytothérapie ?

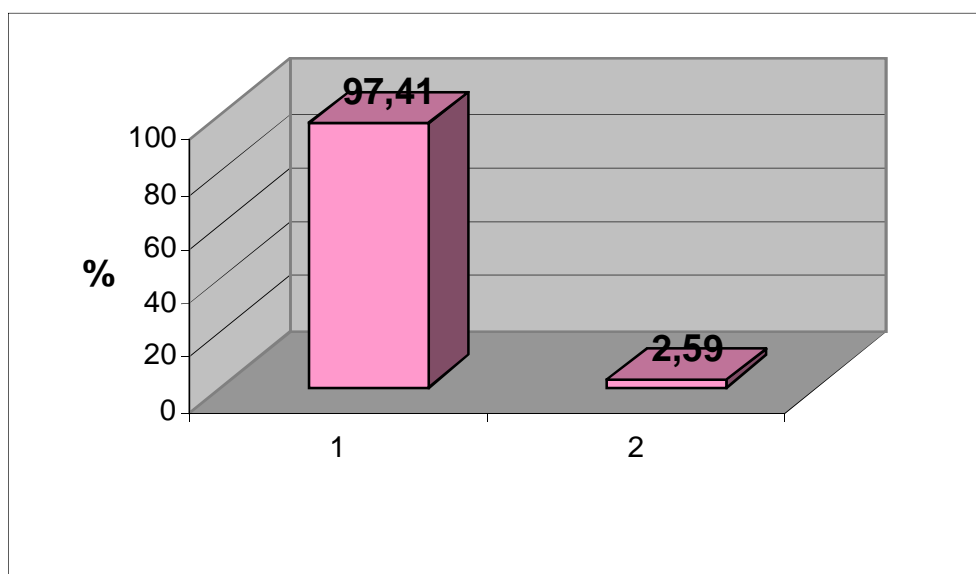


Figure 3.1 : Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie

Avec : 1 = Connaisseurs de la phytothérapie

2 = Non connaisseurs de la phytothérapie

Selon la figure 3.1 parmi les 116 personnes interrogées, 97.41% ont répondu par oui, et 2.59% par non. Donc la phytothérapie est majoritairement connue par cette catégorie de la population Algérienne.

× Question n°02 : Comment la connaissez-vous ?

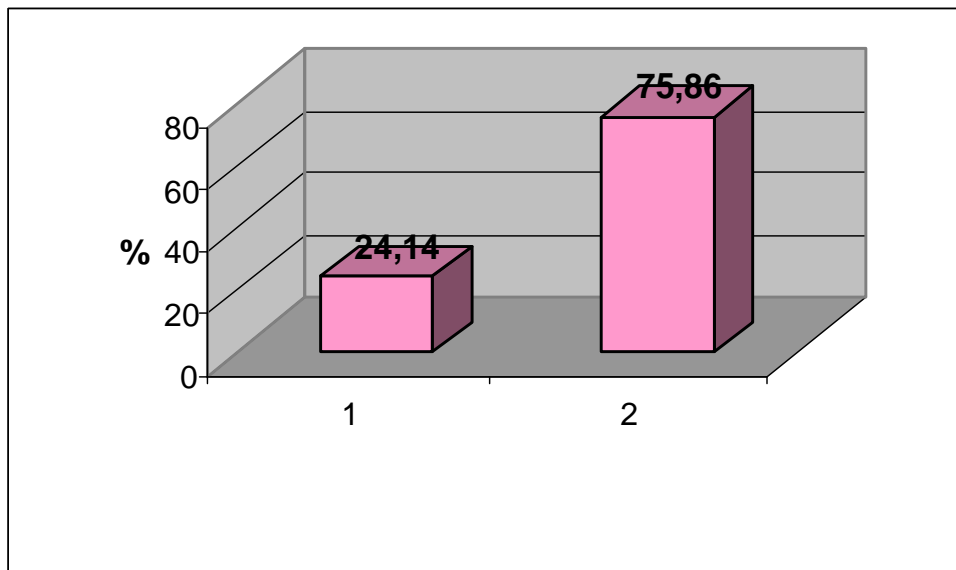


Figure 3.2 : Pourcentage des utilisateurs de la phytothérapie

Avec : 1 = Entendu parler de la phytothérapie

2 = Soigner par phytothérapie

D'après la figure 3.2, sur les 97.41% des personnes ayant dit oui, 24.14% ont entendu parler de la phytothérapie, mais ne l'ont jamais utilisée. Tandis que les 75.86% restant, utilisent les plantes médicinales pour se soigner.

Nous pouvons constater que beaucoup d'entre ces personnes croient en la fiabilité de la phytothérapie comme un moyen de guérison ou médecine alternative.

× Question n° 03 : Connaissez- vous l'aristoloche ?

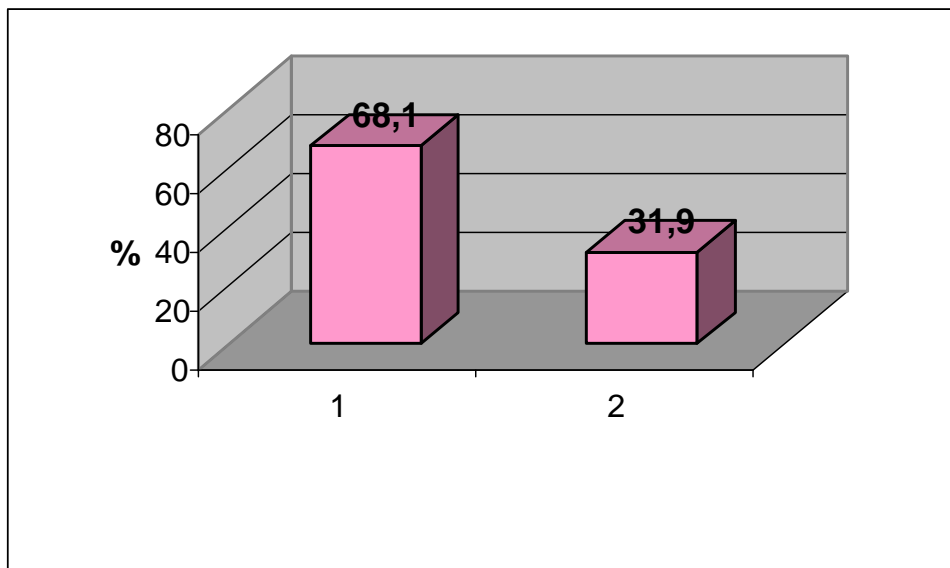


Figure 3.3 : Pourcentage des connaisseurs de l'Aristolochie

Avec : 1 = Connaisseurs de l'Aristolochie

2 = Non connaisseurs de l'Aristolochie

A travers les réponses reçues (figure3.3), nous constatons que 68.10% du groupe connaissent la plante et 31.90% ne la connaissent pas.

× Question n° 04 : Comment la connaissez-vous ?

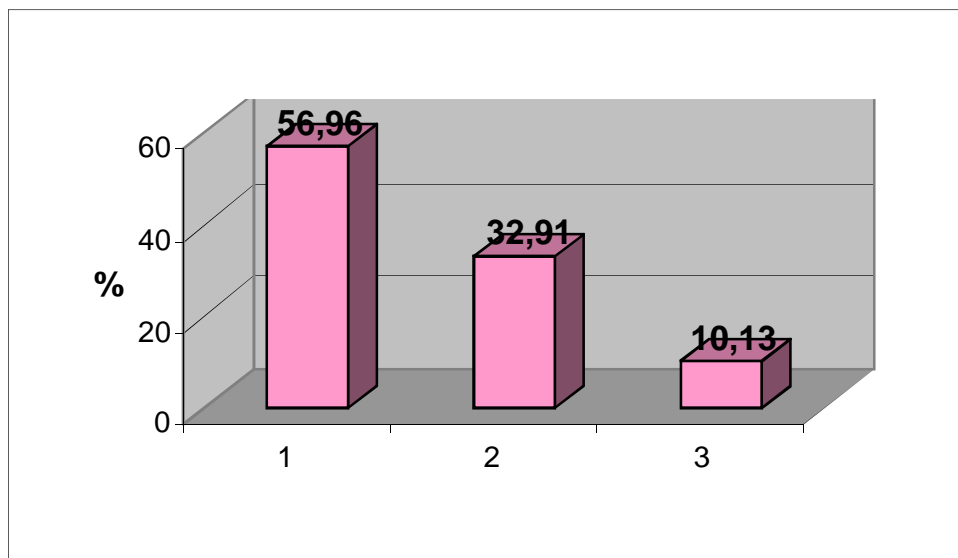


Figure 3.4: Pourcentage des sources de connaissances

Avec : 1 = Utilisée par une personne de l'entourage

2 = Utilisée par soi-même

3 = Entendu parler

Sur les 68.10% connaissant l'Aristolochie :

- 56.96% la connaissent grâce à leur entourage,
- 32.91% connaissent la plante pour l'avoir utilisée personnellement,
- 10.13% des personnes ont en seulement entendu parler.

A l'issu de cette enquête et selon la figure 3.4, nous pouvons déduire que la majorité des personnes interrogées connaissent l'Aristolochie, soit pour l'avoir utilisé, soit par leur entourage.

× Question n° 05 : Pour quelles maladies est- elle utilisée ?

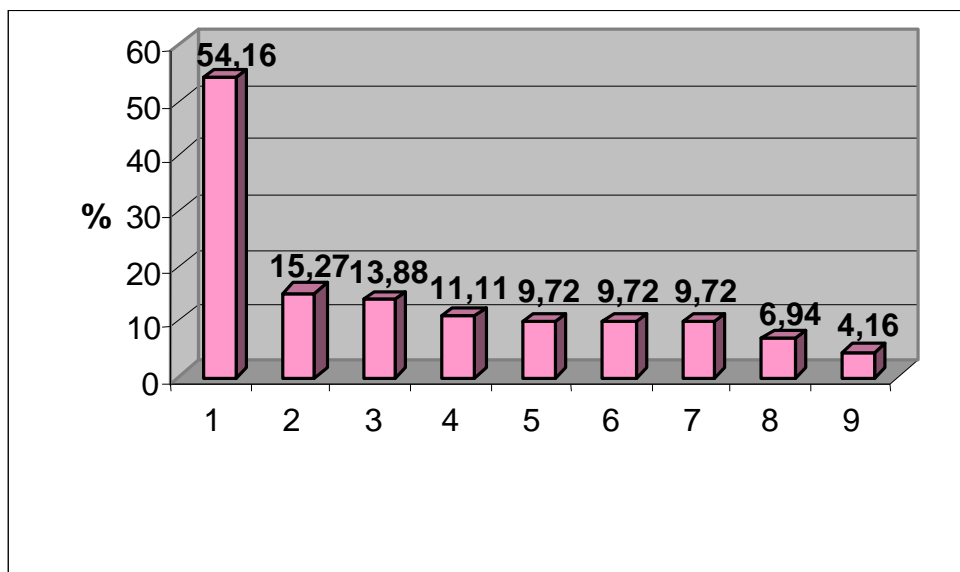


Figure 3.5 : Pourcentage des maladies traitées par l'Aristolochie.

Avec : 1 = Maladies cancéreuses

2 = Maladies de l'estomac

3 = Diabète

4 = Plaies internes et externes

5 = Anémie

6 = Infections cutanées

7 = Autres maladies

8 = Fissures du colon

9 = Infections du foie

D'après les sondages illustrés par la figure 3.5, nous avons constaté que l'Aristolochie est utilisée pour traiter les maladies cancéreuses (cancer du sein, col utérin, colon et la leucémie), le diabète, douleur d'estomac, fissure du colon, l'anémie, les plaies (interne et externe), les infections cutanées (acné), ainsi que d'autres maladies (le cholestérol, eczéma, la stérilité, l'infection du foie et l'ictère).

Ces résultats concordent avec ce qui a été rapporté par différents auteurs, comme Skalli et al.[2] ;Benchaabane et Abbad[9] Baba-aissa [8].

✘ Question n° 06 : Quelle est la partie utilisée de la plante ?

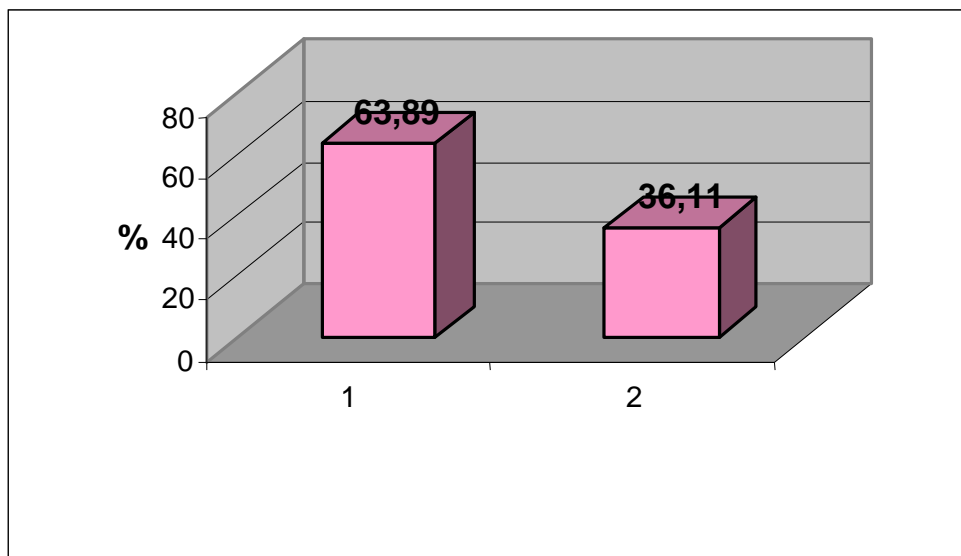


Figure 3.6 : Pourcentage des parties utilisées de la plante

Avec : 1 = Tubercule

2 = Feuilles

D'après la figure 3.6, nous avons 63.89% de personnes ayant utilisé le tubercule alors que 36.11% ont utilisé les feuilles. Ainsi, le tubercule de l'Aristoloché est plus utilisé que ses feuilles.

✘ Question n°07 : Son mode d'emploi ?

D'après les réponses que nous avons recueillies auprès des personnes interrogées, nous pouvons dire que les principaux modes d'emploi sont les suivants :

- Pour l'usage externe, les personnes utilisent le tubercule broyé en fine poudre ou les feuilles mélangées avec du miel ou de l'huile d'olive, afin de l'appliquer sous forme de compresses sur les parties atteintes.
- Pour l'usage interne, les personnes interrogées préparent des infusions à base de feuilles, comme ils peuvent aussi utiliser le tubercule réduit en poudre et mélangé avec du miel ou de l'huile d'olive ou encore avec des dattes.

La toxicité de l'Aristoloché à forte dose est connue par les personnes l'ayant utilisée.

* Question n° 08 : Le résultat est –il positif ?

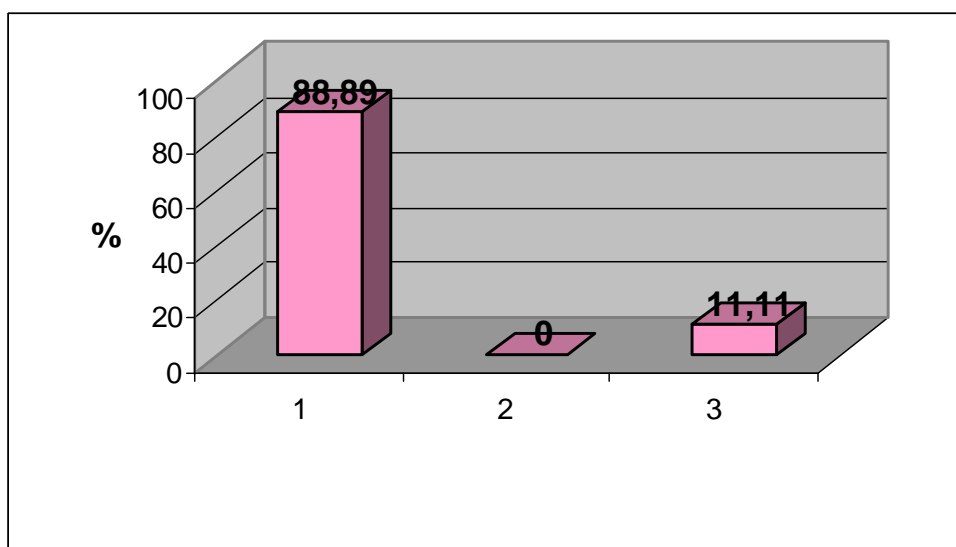


Figure 3.7 : Pourcentage des résultats d'utilisation de l'Aristoloché

Avec : 1 = Résultat positif

2 = Résultat négatif

3 = Résultat inconnu

D'après la figure 3.7, nous constatons que 88.99% des personnes ont répondu oui, alors que 11.11% ignorent le résultat de cette utilisation.

× Question n° 09 : Y'a-t-il des effets secondaires ?

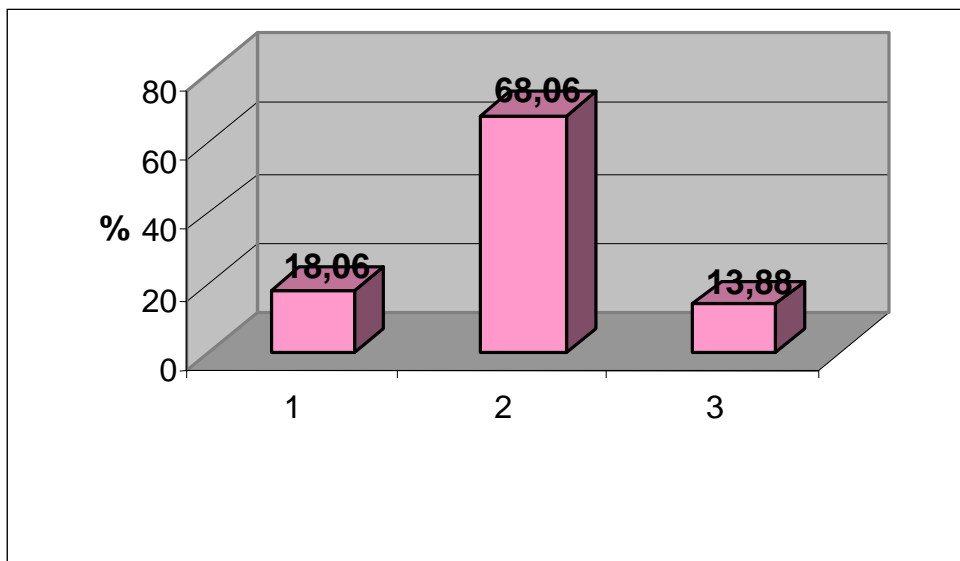


Figure 3.8 : Pourcentage des effets secondaires

Avec : 1 = Existe des effets secondaires

2 = Pas d'effets secondaires

3 = Ignore le résultat

D'après la figure 3.8, 13.88% des personnes interrogées ignorent si l'Aristoloché a des effets secondaires ou pas, 68.06% n'en ont signalés aucun, par contre 18.06% ont observé des effets secondaires après son utilisation.

Les effets secondaires recensés sont en général des vomissements et des hypoglycémies légères. Ces effets se manifestent surtout, suite à un surdosage.

* Question n° 10 : Préférez-vous un traitement médical ou un traitement naturel ?

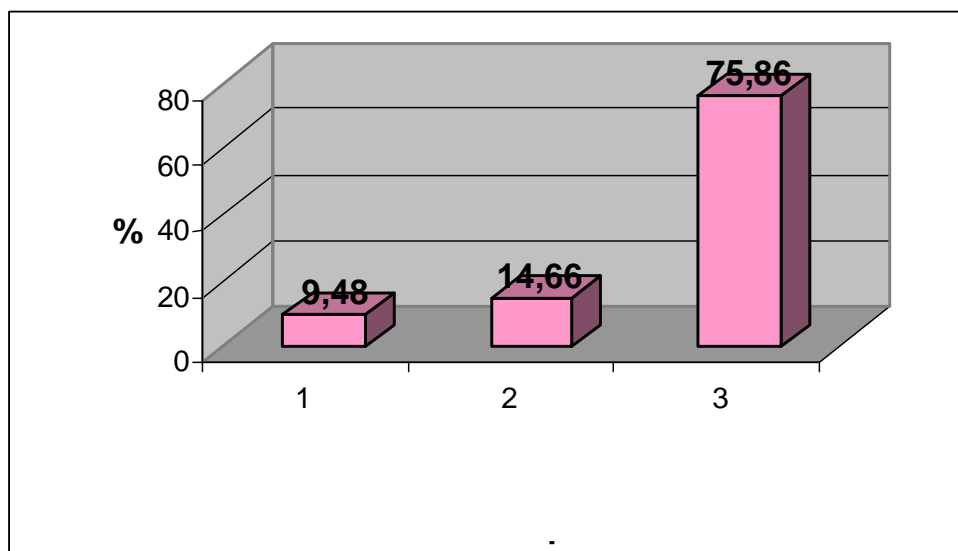


Figure 3.9 : Pourcentage des traitements adoptés par les personnes interrogées.

Avec : 1 = Traitement naturel

2 = Traitement médical

3 = Les deux traitements

De la figure 3.9, il ressort que 75.86% préfèrent les deux traitements à égalité, 14.66% préfèrent un traitement médical et 9.48% optent pour un traitement naturel.

L'étude ethnobotanique a été une source importante pour la collecte d'informations portant sur le degré de connaissance des spécialistes sur l'aristoloche, et son utilisation. Cette étude nous a permis également de situer approximativement la place occupée par *Aristolochia longa* L. en phytothérapie Algérienne. En effet, nous avons pu constater qu'*Aristolochia longa* L. est plus utilisée dans la Mitidja où les populations ont un grand savoir en matière de plantes médicinales.

3.2. Résultats de l'étude macroscopique et microscopique d'*Aristolochia longa* L.

3.2.1. Examen macroscopique de la fleur

L'étude macroscopique de la fleur révèle que *Aristolochia longa* L. contient 12 étamines couvertes par six mamelons (Figure 3.10), Les étamines adhèrent au sommet de l'ovaire où elles sont réparties deux par deux (Figure 3.11). L'ovaire est infère à six carpelles soudés et à placentation axiale (Figure 3.12).

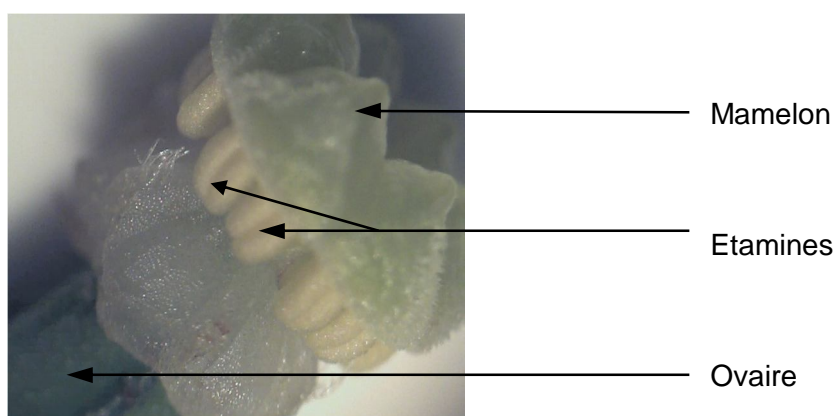


Figure 3.10 : Position des étamines par rapport à l'ovaire (loupe binoculaire G : 20x)

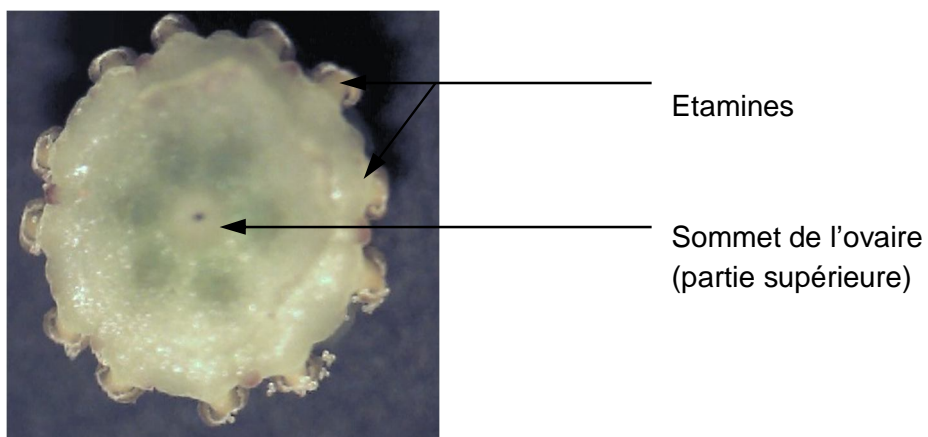


Figure 3.11 : Coupe transversale dans la partie supérieure de l'ovaire (loupe Binoculaire G : 20x)

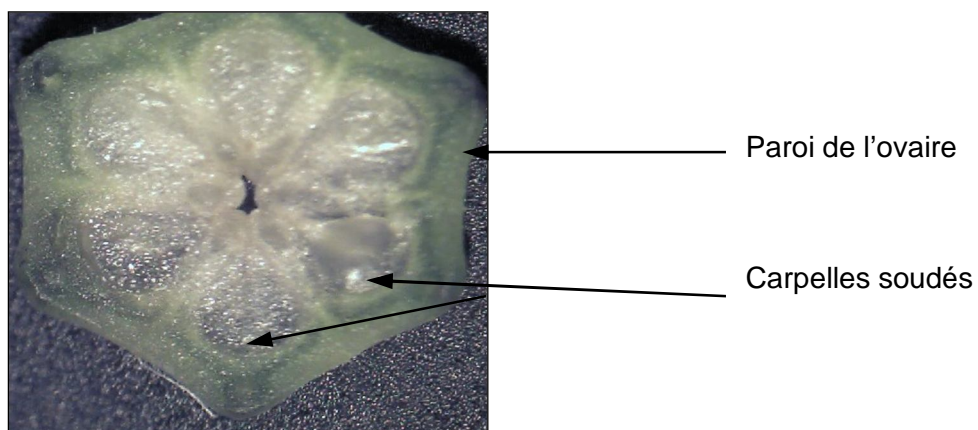


Figure 3.12: Coupe transversale au niveau de l'ovaire (loupe binoculaire G :20x)

Le grain de pollen d'*Aristolochia longa* L. est arrondi et présente une surface lisse (Figure 3.13). Notre résultat est comparable à celui de MULDER [31].

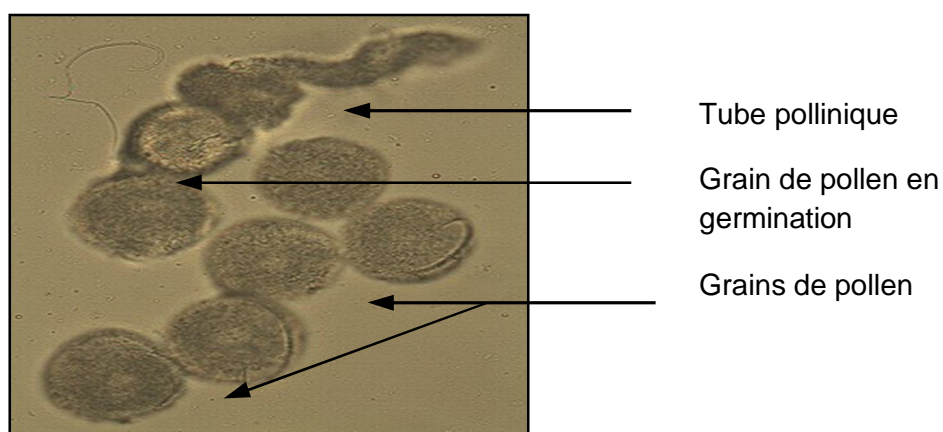
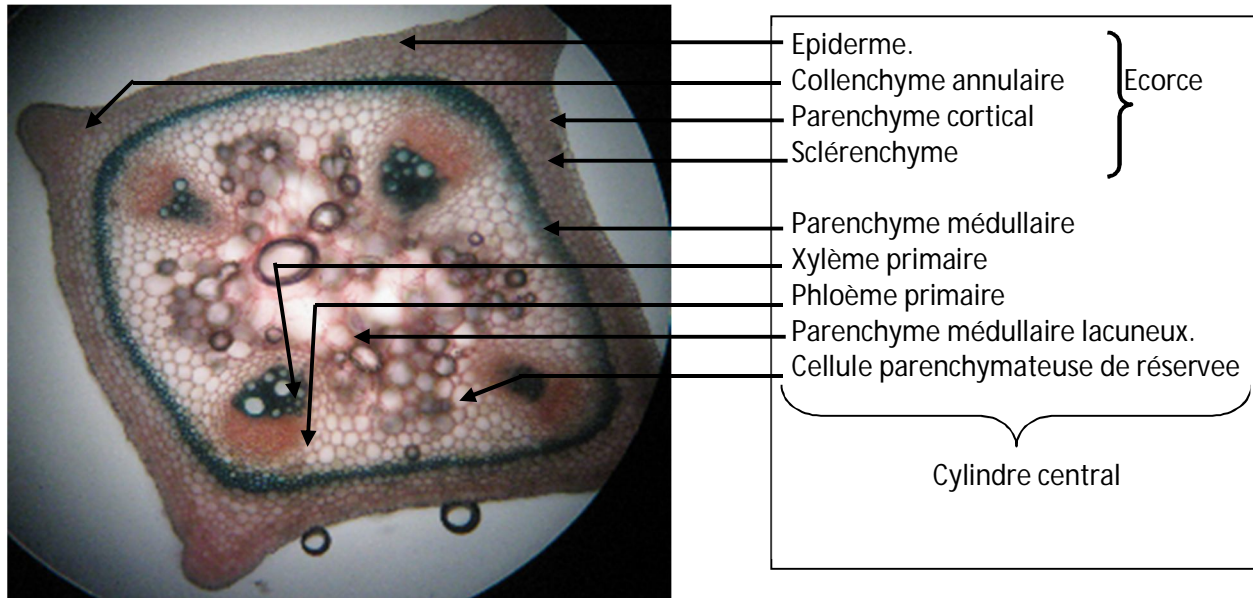


Figure 3.13 : Grains de pollen de *Aristolochia longa* L. (G : x 40)

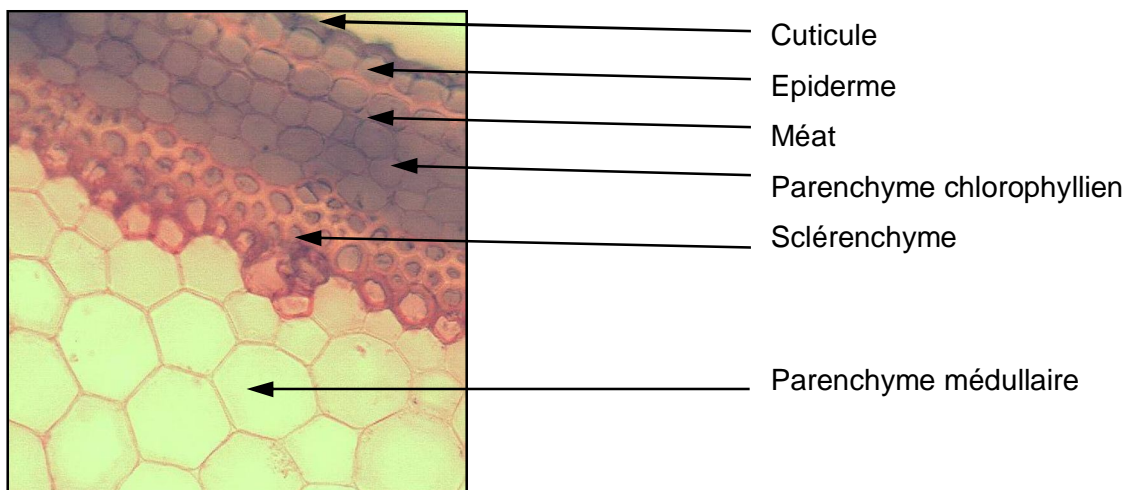
3.2.2. Examen microscopique de la tige

L'examen microscopique montre que la tige est quadrangulaire (Figure 3.14.A). L'épiderme est la couche la plus externe. Au niveau des angles des tiges nous observons un collenchyme angulaire (figure 3.14.C). Le parenchyme chlorophyllien, est formé de trois à quatre assises cellulaires (Figure 3.14.B), il est suivi d'un anneau continu de sclérenchyme. Au centre se trouve un parenchyme médullaire dont les angles sont occupés par les faisceaux cribro- vasculaires (figure 3.14.A). Ces faisceaux ont une forme en V.

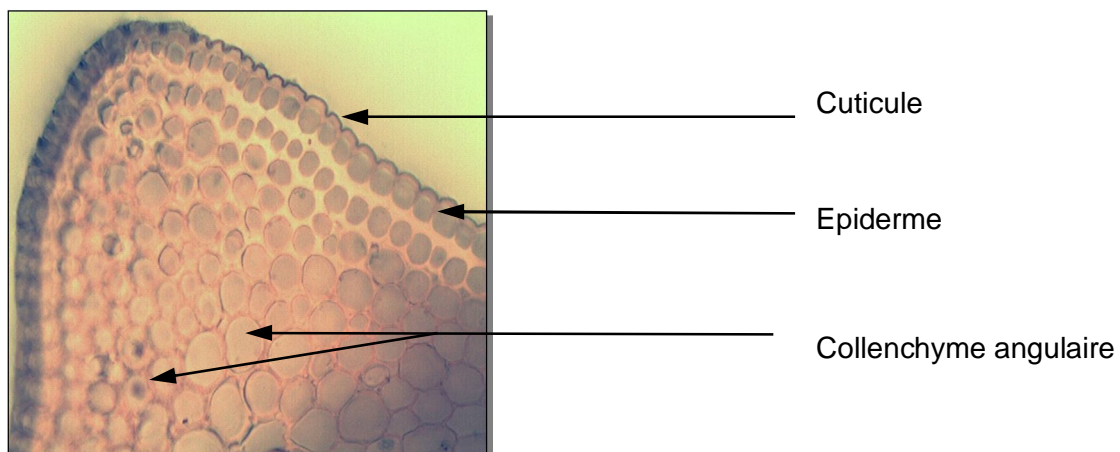
Ils sont à différenciation centrifuge. Le protoxylème est dirigé vers le centre de la tige alors que le métaxylème est dirigé vers la périphérie, il est surmonté par le phloème (figure 3.14.D).



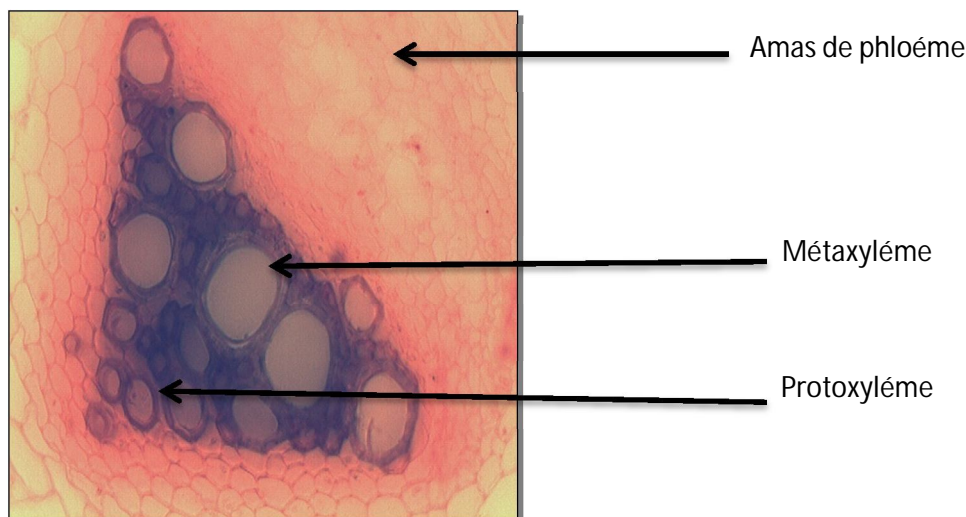
A. Organisation générale d'une jeune tige d'*Aristolochia longa* L.



B : Les tissus composant 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 3.14 : Coupe transversale de la tige (A, B, C et D).

L'étude microscopique de la tige de *Aristolochia longa* L. est quadrangulaire en comparaison à celle de *Aristolochia clematidis* qui est arrondie (CALZONI [139] et dont l'anatomie est totalement différente de *Aristolochia longa* L.

D'après CALZONI [139] la section de la tige d'*Aristolochia clematidis* est 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 d'*Aristolochia longa* L.

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

3.2.3. Examen microscopique de la feuille

L'examen microscopique d'une coupe transversale de la feuille d' *Aristolochia longa* L. présente une symétrie bilatérale (Figure 3.15.A). Nous observons au niveau de la face adaxiale : un épiderme de la phase extérieur, composé de cellule à paroi épaisse et cutinisée, un parenchyme chlorophyllien au niveau des deux faces de la feuille (Figure 3.15 B) formé de deux à trois assises cellulaires, suivi d'un parenchyme à méats de réserve.

Au niveau de la face abaxiale, nous observons un épiderme composé de cellules à paroi moins épaisse, il contient des poils pluricellulaires ou poils tecteurs (Figure 3.16).

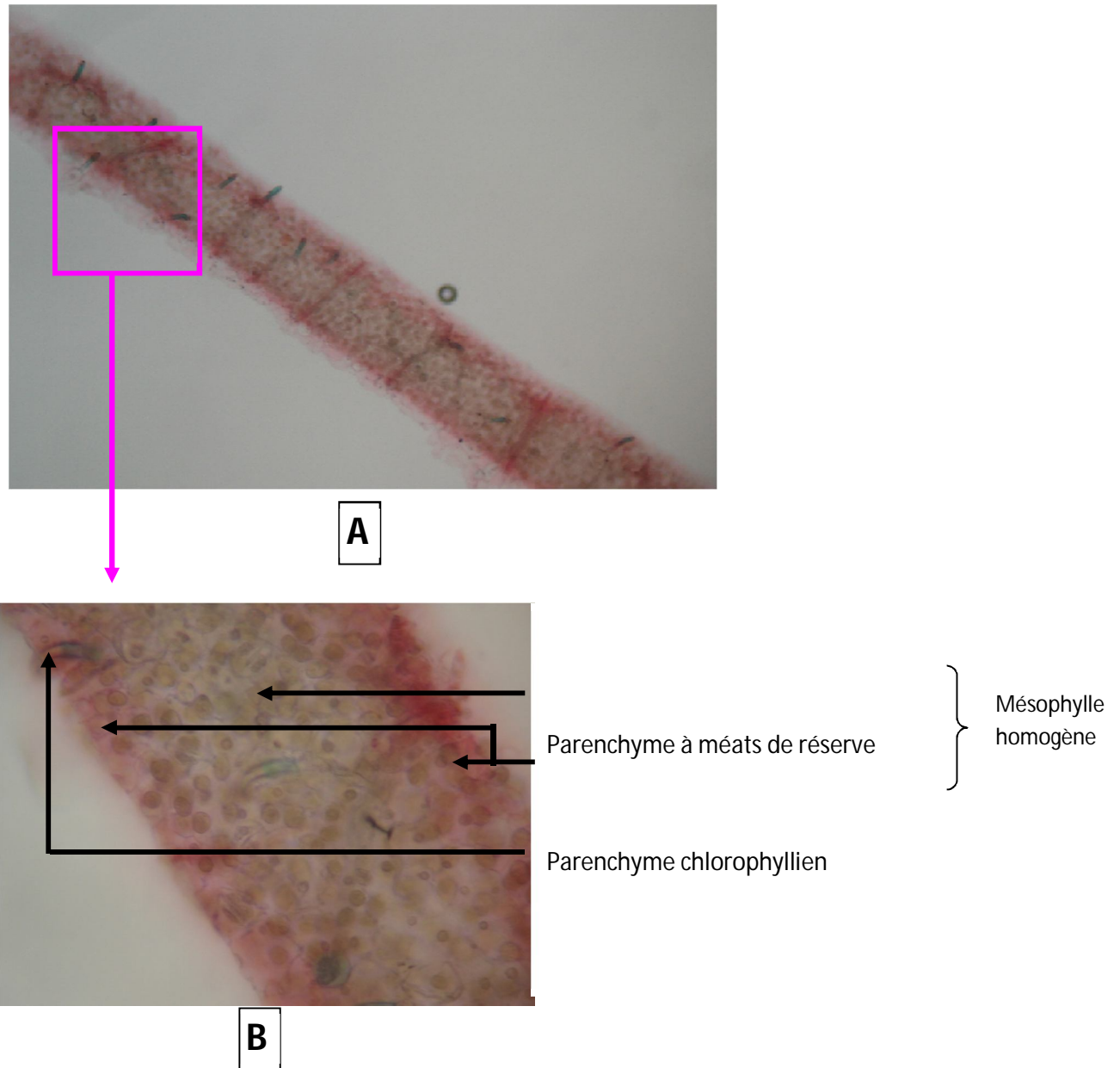


Figure 3.15: Coupe transversale au niveau du limbe de la feuille d'*Aristolochia longa* L. (G 10 x 10 (A) et 10 x 40 (B)).

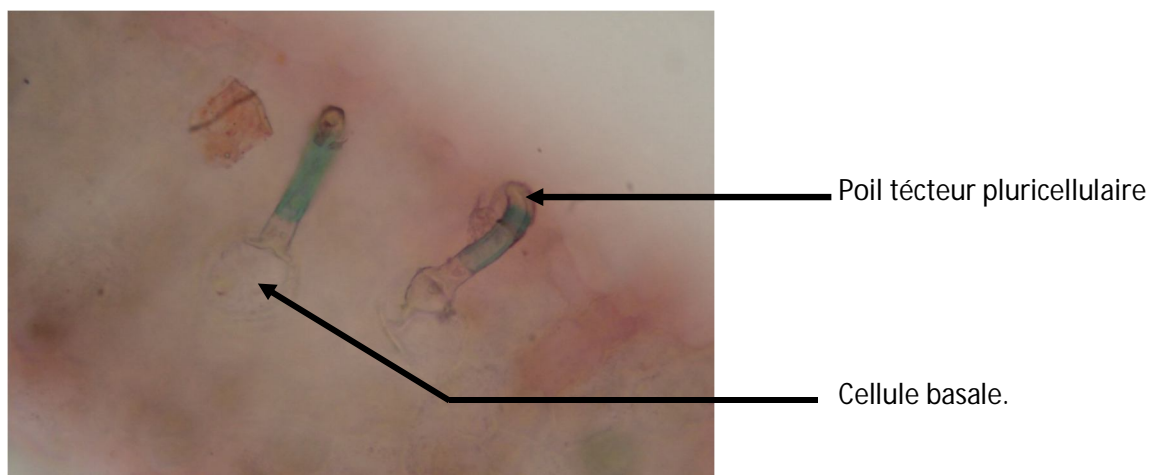


Figure 3.16 : Poils tecteurs de la feuille d'*Aristolochia longa* L. (G x 40).

Les résultats de l'étude macroscopique et microscopique de la plante nous orientent, ainsi, vers une analyse phytochimique afin de connaître la composition chimique et révéler les principes actifs d'*Aristolochia longa* L.

3.3. Résultats de l'étude phytochimique

Les résultats des essais physicochimiques se présentent comme suit :

3.3.1. Détermination de la teneur en eau et en matière minérale

3.3.1.1. Teneur en eau

Le résultat du dosage de la teneur en eau du tubercule et des feuilles est regroupé dans le tableau 3.1 (détail en Appendice C).

Tableau 3. 1: Résultat de la teneur en eau

	Feuilles	Tubercules
Pesée initiale	27 .080±0.7 .7832	71.0794±44.9339
Pesée finale	08.2199± 02.3626	21.0474±13.3034
Pourcentage	69.6460±00.0008	70.3882±00.0029

Les résultats du tableau 3.1 montrent que les tubercules formés de tissus lignifiés d'*Aristolochia longa* L. sont légèrement plus riches en eau en comparaison aux feuilles.

Selon Paris et al. [136] l'eau représente en générale 60 à 80% de la matière fraîche des feuilles et 40 à 50% dans les tissus lignifiés. Ainsi, les teneurs observées chez *Aristolochia longa* L. sont comparables à celles mentionnées par Paris et al. [136]. Nous pouvons constater 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.

3.3.1.2. Dosage des cendres

Les résultats du tableau 3.2 révèlent que les cendres représentent 2,1353% de la matière sèche des tubercules.

Tableau 3.2 : Teneur en cendres des tubercules.

Pesée de la poudre	Pesée des cendres	Pourcentage
01.0172±00.0225	00.0173±00.1458	02.1354±00.002

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 le tableau 3.3 et figure 3.17 pour les cations, et pour les anions dans le tableau 3.4 et figure 3.18.

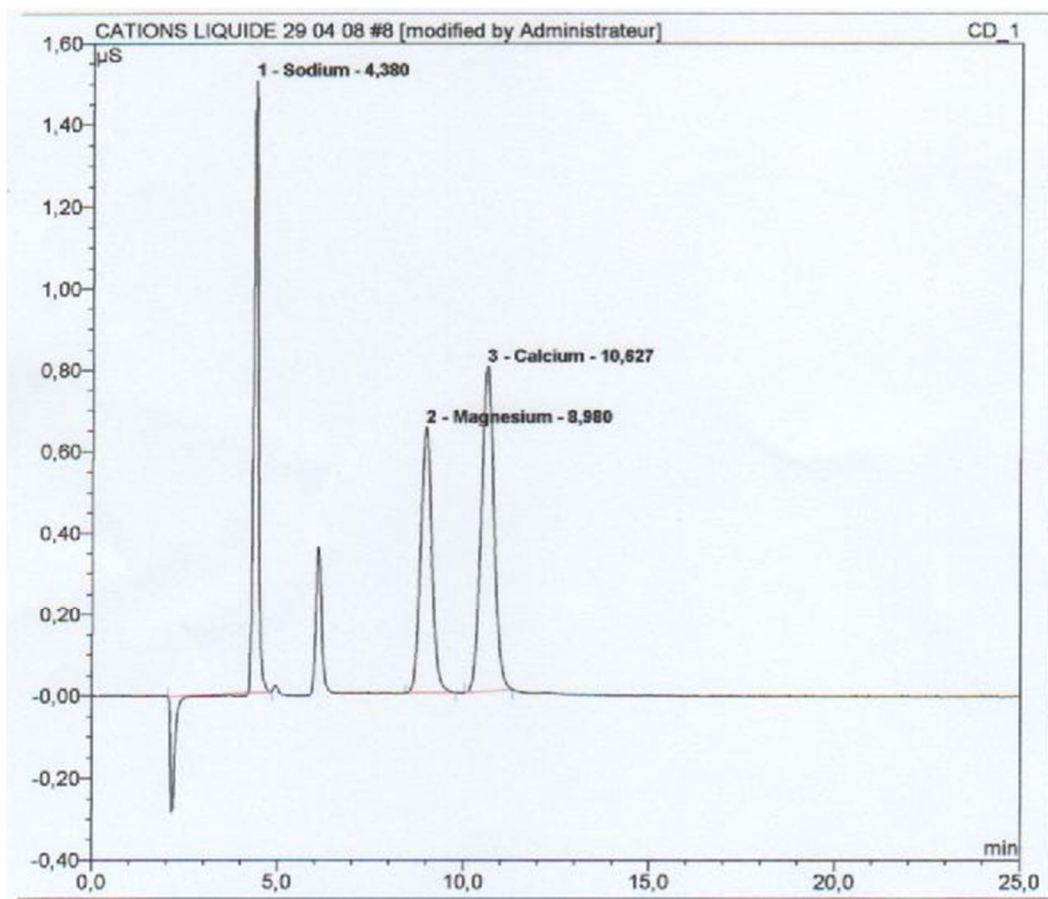


Figure 3.17 : Chromatogramme des cations dans les cendres

Tableau 3.3: Cations détectés dans les cendres par chromatographie ionique

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

L'analyse de la matière minérale dans les cendres par chromatographie ionique révèle trois minéraux : sodium, magnésium et calcium (Figure3.17). Le calcium est le cation majoritaire (tableau 3.3).

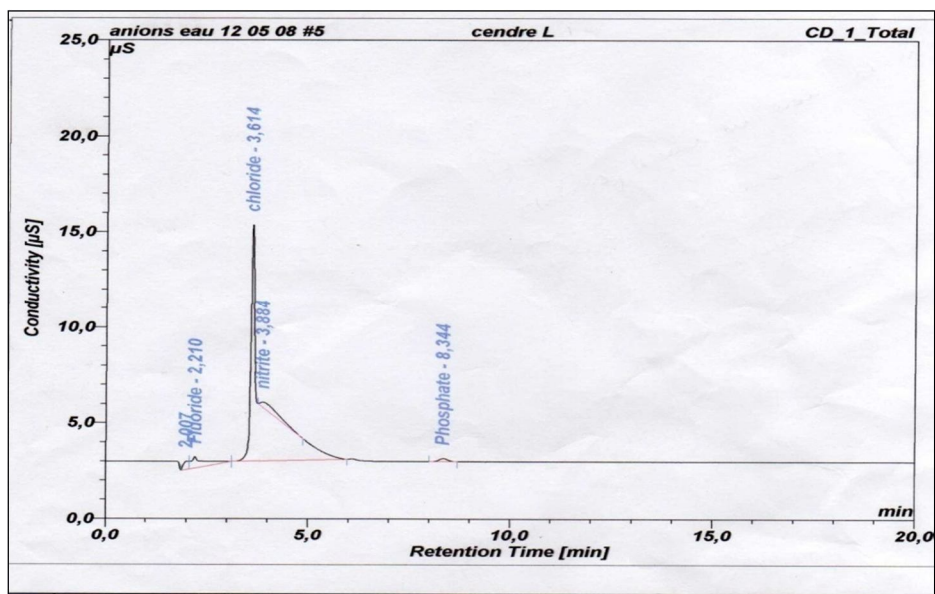


Figure 3.18 : Chromatogramme des anions dans les cendres

Tableau 3.4: Anions détectés dans les cendres par chromatographie ionique

	Fluoride	Chloride	Nitrite	Phosphate
Concentration (mg/ml)	92.5259	3375.7727	1647.0835	83.3747

L'analyse des anions révèle la présence de phosphate, de chlorure, de fluorure et de nitrite (Figure 3.18). 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 du dosage des cendres par 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 (tableau 3.5) car, elle comprend le potassium et le fer. Néanmoins, le cuivre représente une concentration très faible. Nous remarquons aussi que le cadmium et le plomb sont absents dans la fraction minérale de la plante.

3.3.1.3. 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±0.1104
Pesée des cendres (en mg)	0.0173±0.1458
Pourcentage des cendres	2.1354± 0.0002
Volume de titration (en ml)	10.9667±0.6574
Pourcentage de l'azote	5.4833±0.0236
Pourcentage des protéines	34.2667±0.1461

Nous avons remarqué que la teneur en azote total chez *Aristolochia longa* L (tableau 3.6) est plus élevée que chez le riz, l'hévéa (d'où on extrait un latex transformé en caoutchouc) et le maïs, étudiés par PINTA(121).

L'étude de la matière minérale d'*Aristolochia longa* L. révèle que les cendres représentent 02,1333% de la matière sèche des tubercules. Ce pourcentage montre qu'*Aristolochia longa* L. est riche en matière minérale par rapport au blé [122]. Dans ce dernier la matière minérale représente 01.19%.

Cette proportion en cendres paraît faible pour être responsable de la propriété diurétique d'*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, magnésium, fer et le calcium qui ont été détectés, le calcium est majoritaire.

D'après FLUK [45], les sels de calcium participent à l'élaboration du système osseux, de 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. [70] ; GADHI et al. [71] 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 également que les nitrites sont les anions majoritaires. La dominance de ces anions peut avoir une relation avec la toxicité connue de cette plante. Les nitrites consommés par l'homme peuvent être transformés en nitrosamines dans l'estomac où il y a formation de l'acide nitreux (NO_2H) [141]. Ce dernier agirait sur les amines secondaires et tertiaires pour former des nitrosamines cancérigènes [141][142].

Par son pouvoir oxydant, le nitrite à grande dose devient toxique pour l'homme puisqu'il est apte à oxyder l'hémoglobine sanguine [141].

Les ions nitrites réagissent avec l'hémoglobine et forment un complexe avec l'hème. Les ions nitrites 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 [142].

3.3.2. Caractérisation de quelques métabolites secondaires

3.3.2.1. Dégraissage de la poudre végétale

L'extraction à l'aide du Soxhlet, des composés apolaires des tubercules et des feuilles d'*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±0.0261	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. Il est à noter aussi que la concrète apolaire des tubercules et des feuilles a une odeur caractéristique de la plante.

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.

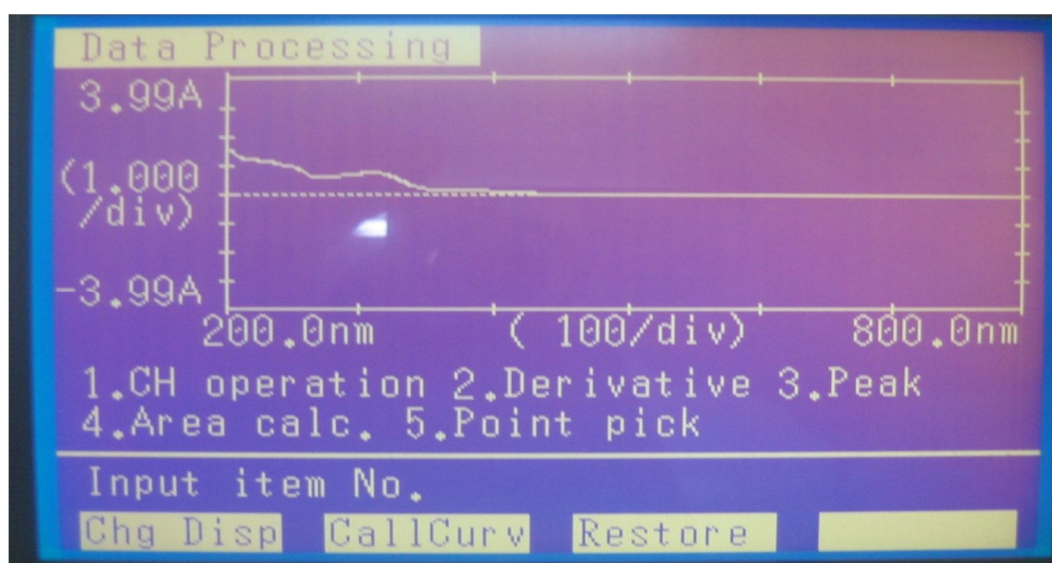


Figure 3.19: Balayage par spectrophotométrie UV- visible de la concrète apolaire des tubercules.

Tableau 3.8: Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS 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 3.19, 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) [80], donc l'acide aristolochique est le métabolite secondaire majoritaire dans les tubercules.

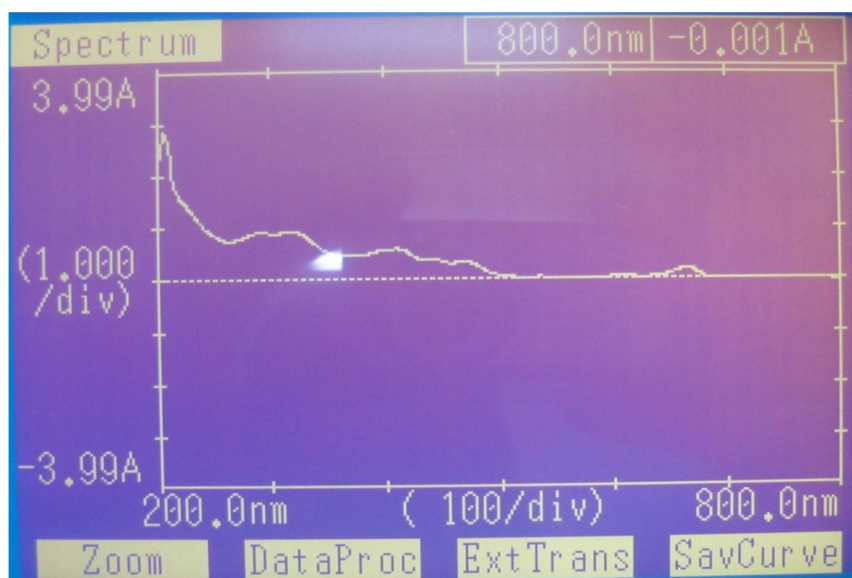


Figure 3.20: Balayage par spectrophotomètre UV-VIS de la concrète apolaire des feuilles

Tableau 3.9 : Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS 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 400nm et 498 nm). Il y a une absorption dans le domaine de l'acide aristolochique et ses dérivés (entre 290nm et 300nm) (Figure 3.20).

3.3.2.2. Extraction des métabolites secondaires

Dans les feuilles et dans les tubercules, L'extraction par Soxhlet de la concrète polaire alcoolique, 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	10.0034±00.0045	10.0002±00.0002
Pesée de la concrète	01.1775±00.00071	00.8638±00.0005
Pourcentage	17.7443±00.0005	08.6379±00.0047

Les métabolites secondaires représentent respectivement dans les tubercules et dans les feuilles 17.7443% et 08.6379% de la matière sèche (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. Quant aux feuilles, leur concrète est de couleur verte avec une odeur qui caractérise *Aristolochia longa* L.

Comme pour les concrètes apolaires, nous avons réalisé une analyse par spectrophotométrie ultraviolet– visible pour détecter quelques groupements fonctionnels dans ces concrètes (polaires). Nous avons cherché, en particulier, les longueurs d'onde de l'acide aristolochique et ses dérivés.

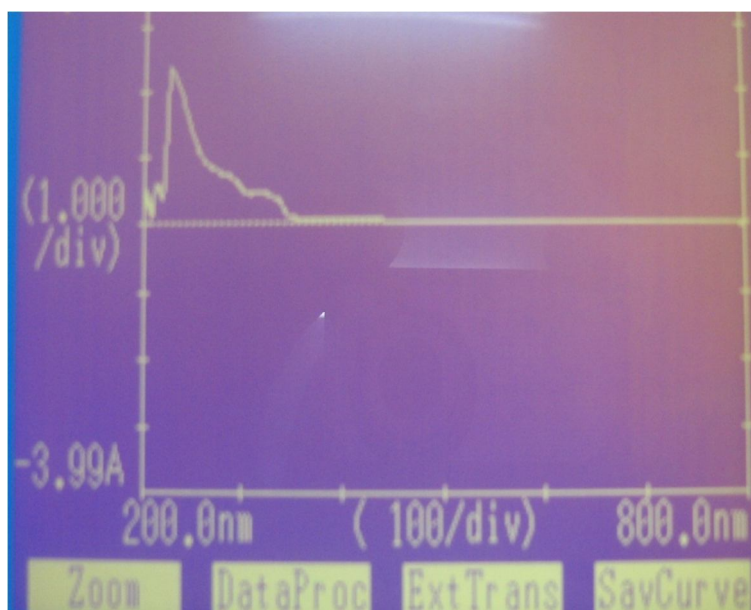


Figure3.21 : Balayage par spectrophotométrie UV- visible de la concrète Polaire des tubercules

Tableau 3.11: Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS 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 3.21). 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.

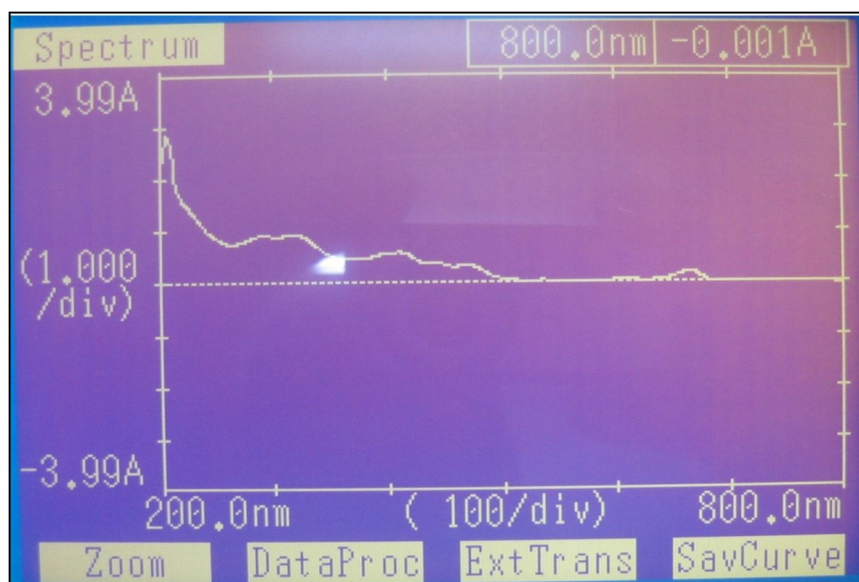


Figure 3.22: Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des feuilles

Tableau 3.12 : Résultat du balayage par spectrophotomètre UV-VIS 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 3.22 montrent que la concrète présente trois domaines d'absorption :

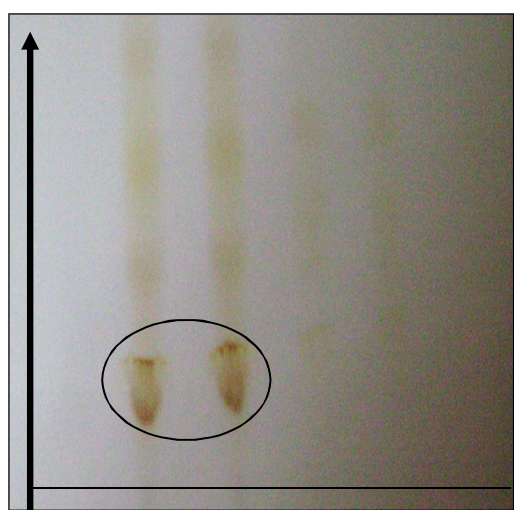
- Selon LAFONT [143] le domaine d'absorption qui se situe entre 600 nm et 664 nm correspond aux chlorophylles.

- Alors que le domaine de 400nm à 480nm est caractéristique des caroténoïdes et dérivés [143].
- Les longueurs d'ondes situées entre 228 nm et 376 nm sont propres à l'acide aristolochique et ses dérivés selon YUAN et al. [83]. Le domaine de 291nm à 300nm est propre aux composés benzéniques [143].

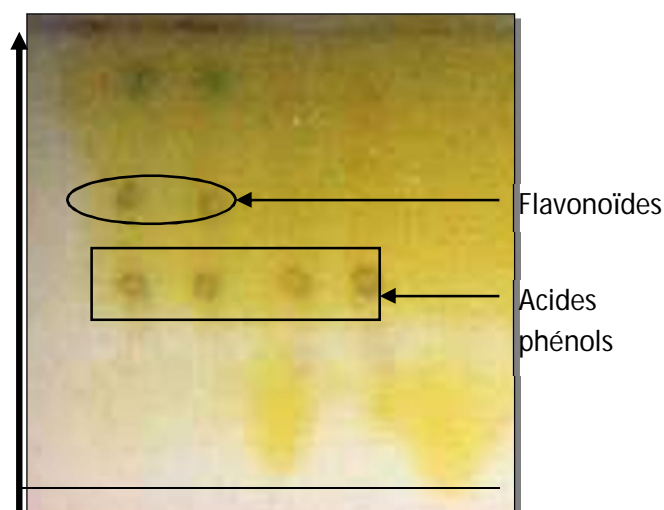
L'analyse des concrètes, apolaire et polaire, des tubercules et des feuilles de *Aristolochia longa* L. révèle que les tubercules sont plus riches en acide aristolochique comparés aux feuilles. Les concrètes de ces dernières sont particulièrement riches en chlorophylle.

3.3.2.3. Révélation des métabolites secondaires après séparation par chromatographie sur couche mince

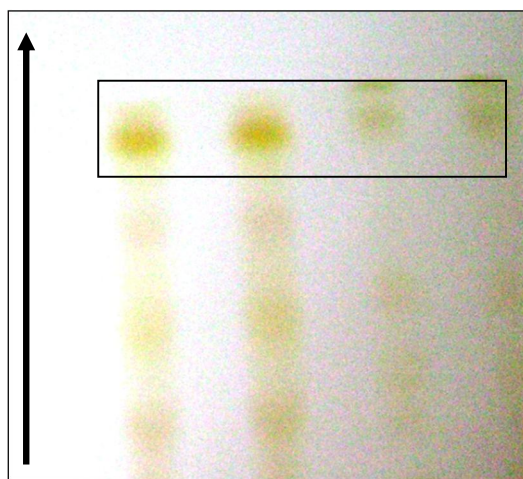
Par chromatographie sur couche mince nous avons mis en évidence la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des acides phénols en plus des quinones (Figure 3.23).



a/ révélation des alcaloïdes



b/ révélation des flavonoïdes et des acides phénols



c/ révélation des quinones

Figure 3.23: Séparation des métabolites secondaires par chromatographie sur couche mince

Les métabolites secondaires, séparés par chromatographie sur couche mince, ont été révélés (Figure 3.23) et les R_f ont été calculés pour chaque métabolite. Le résultat de la caractérisation de ces métabolites apparaît dans le tableau 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 3.23 b) et des quinones (Figure 3.23c) dans les feuilles et dans les tubercules (tableau 3.13). Les alcaloïdes ont été caractérisés seulement au niveau des tubercules (Figure 3.23a et tableau 3.13), alors que les flavonoïdes et les flavones ne se trouvent que dans les feuilles (Figure 3.23b et tableau 3.13).

Le tableau 3.14 regroupe les métabolites secondaires caractérisés et leur *Rf* correspondant.

Tableau 3.14 : Facteur de rétention(*Rf*) des métabolites secondaires caractérisés

	alcaloïdes	Acides phénols	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	-

3.3.2.3.1. Caractérisation des saponines

Nous avons remarqué 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 d'*Aristolochia longa* L. contiennent peu de saponines.

3.3.2.3.2. 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 d'*Aristolochia longa* L. contiennent des tanins catéchiques.

Nous avons donc réalisé une étude complète de la composition des tubercules d'*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) [120].

Les résultats observés lors des différentes étapes de l'étude de la composition biochimique des tubercules, apparaissent dans la figure 3.24. Ces résultats donnent une idée globale sur la composition des tubercules d'*Aristolochia longa* L.

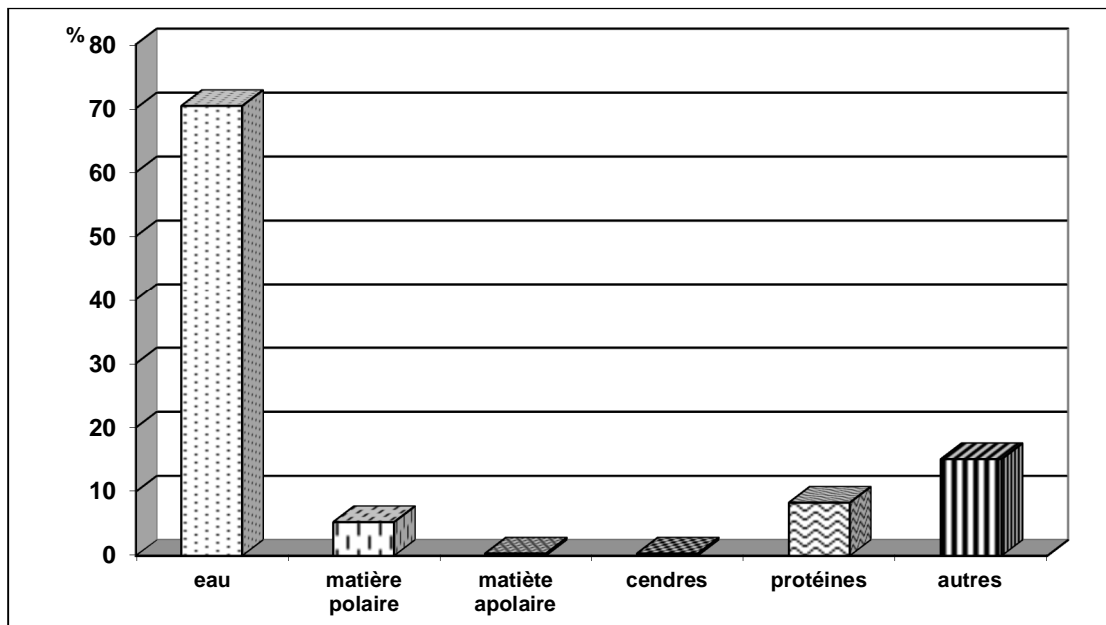


Figure 3.24 : Composition des tubercules

La caractérisation de quelques métabolites secondaires d'*Aristolochia longa* L. révèle qu'elle est riche en ces substances. Nous avons pu, dans ce travail, révéler les flavonoïdes, 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 du tubercule seulement, alors que les flavonoïdes et les flavones ne sont présents que dans les feuilles.

La présence des flavonoïdes dans les feuilles seulement est due à leur fonction. En effet, ils jouent le rôle de protection des organes végétaux contre les rayons ultraviolets [49].

La présence des alcaloïdes dans les tubercules révèle que ces organes sont toxiques. Les alcaloïdes sont classés par Fournier et al. [40] parmi les poisons. Ces substances peuvent affecter de manière importante le fonctionnement du système nerveux et provoquer des tremblements, des battements cardiaques faibles, le coma et la mort par arrêt respiratoire [40].

3.3.3. Teneur et types des acides aristolochiques

L'extraction des acides aristolochiques, s'est faite en deux périodes différentes, pour la récolte de 2007 :

- En période de floraison dans les feuilles et dans les tubercules
- Après maturation des graines, seulement dans les tubercules

Concernant la récolte de 2008, l'extraction des acides aristolochiques au niveau des feuilles, des tubercules et des fruits ne s'est faite que pour une seule période qui est la floraison.

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± 00,0002	69,7667±00,0943	04,9333±00,1247
Pourcentage	00,0250±00,0002	00,0698±00,0001	00,0099±00,0014

L'acide aristolochique représente respectivement 0,0099% et 0,025% de la matière sèche 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).

Les acides aristolochiques purifiés et les extraits alcooliques des tubercules et des feuilles ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance pour identifier les acides aristolochiques présents dans *Aristolochia longa* L.

3.3.3.1. Résultats de la chromatographie à haute performance (HPLC)

Les résultats suivants concernent les échantillons récoltés en 2007.

3.3.3.1.1. Période de floraison

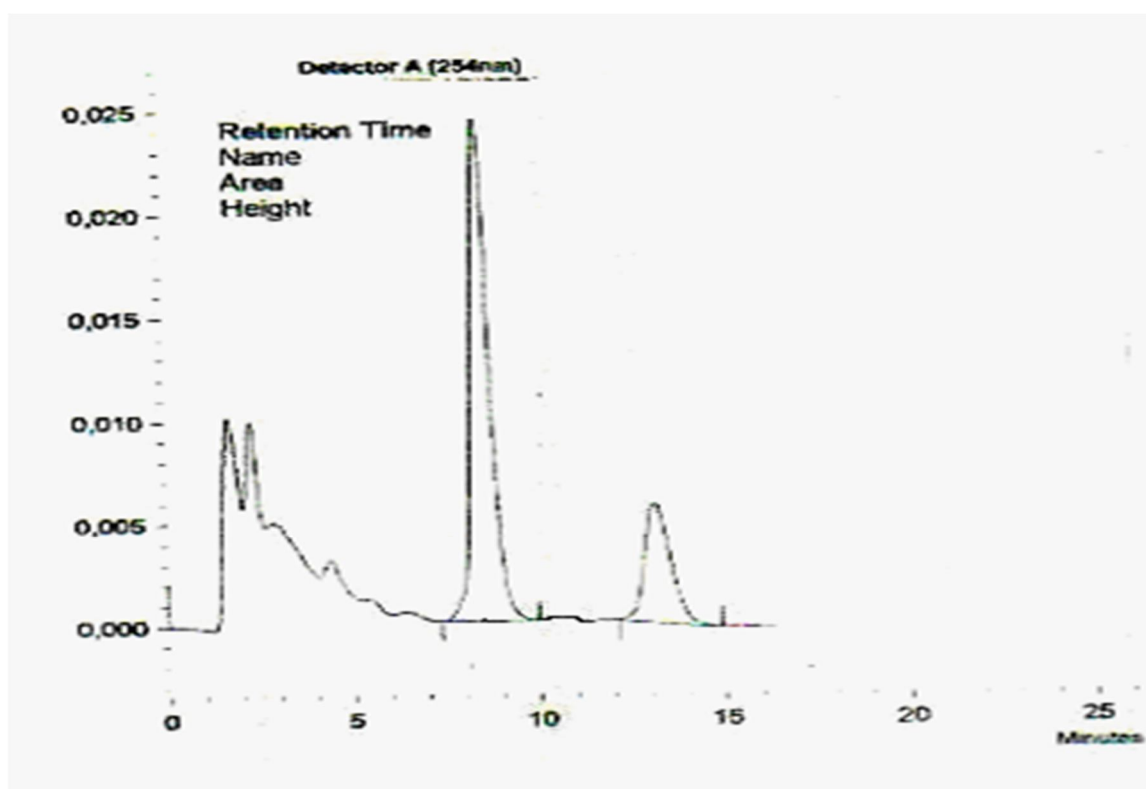


Figure 3.25 : Analyse du standard par HPLC

Tableau 3.16 : Résultats de l'analyse du standard:

	Pic 1	Pic 2
Temps de rétention (en min)	12 à 13	7 à 8
%	24.15	75.85

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 3.25).

Selon les résultats de la figure 3.25, le temps de rétention de l'acide aristolochique I se situe entre 12min et 13min, alors que celui de l'acide aristolochique II se situe entre 7min et 8min.

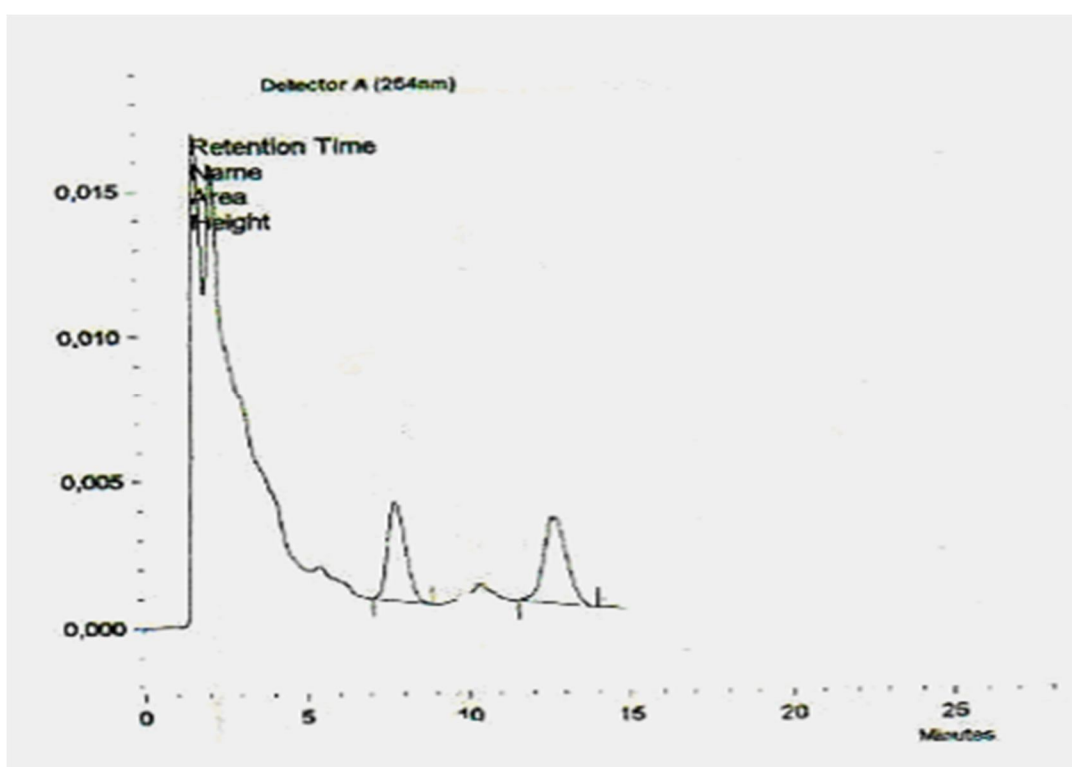


Figure 3.26: Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC

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

	Pic 1	Pic 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 3.26). 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. Durant 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.

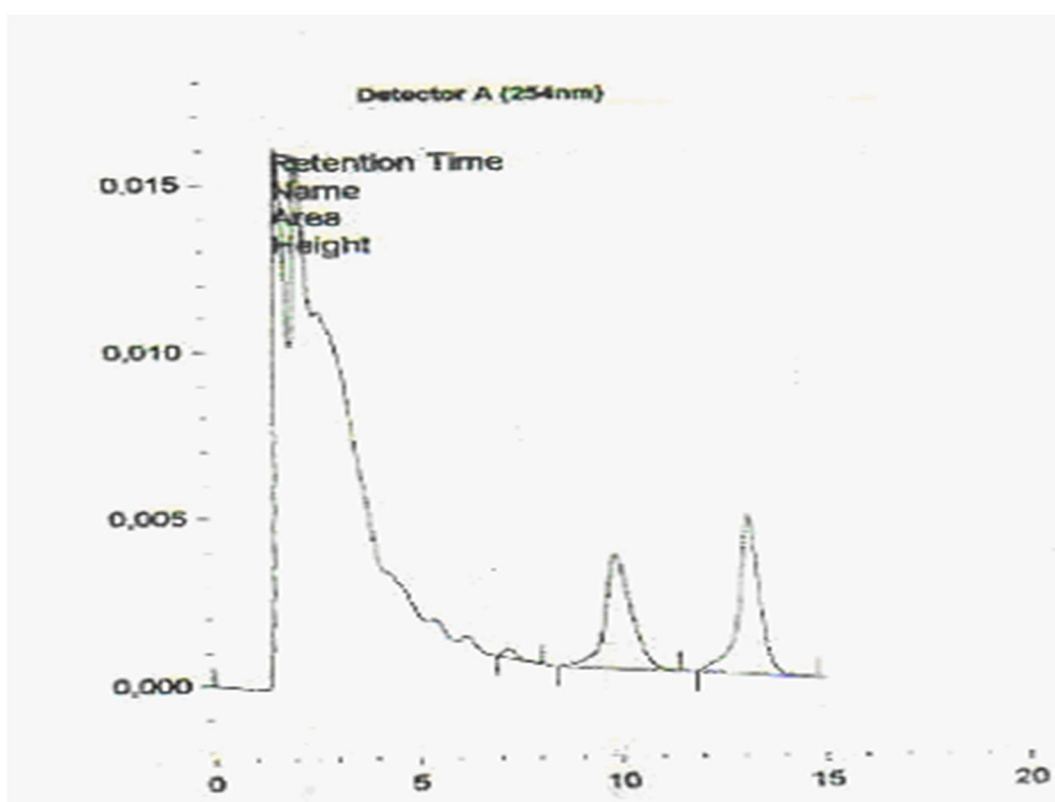


Figure 3.27 : Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC

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

	Pic 1	Pic 2	Pic 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 3.27). La comparaison des temps de rétention des pics de ce chromatogramme avec ceux du chromatogramme du standard permet d'identifier l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique 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 9,95min. Nous n'avons pas pu identifier cette molécule.
- Le pic n° 3, présente un temps de rétention de 13,20 mn qui correspond à celui de l'acide aristolochique I.

Nos résultats montrent que les tubercules d'*Aristolochia longa* L. contiennent les acides aristolochiques I et II.

Nous remarquons que l'acide aristolochique I présente des teneurs appréciables aussi bien dans les tubercules que dans les feuilles. Il représente 51,54% des pics détectés. Néanmoins, la teneur en acide aristolochique II est plus faible dans les tubercules en comparaison avec 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%.

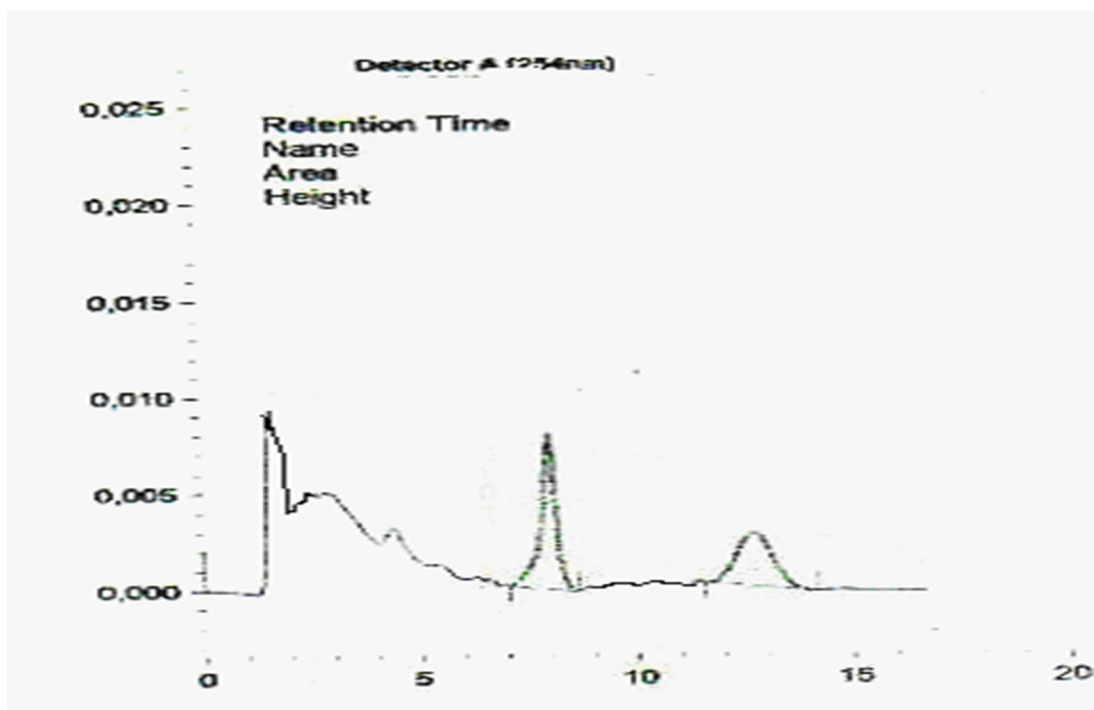


Figure 3.28 Analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles par HPLC

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

	Pic 1	Pic 2
Temps de rétention (en min)	7,45	13,36
%	46,21	53,79

Les résultats du tableau 3.19 et la figure 3.28, montrent que l'acide aristolochique purifié à partir des feuilles contient les acides aristolochiques I et II. Ce qui confirme que les feuilles des plantes en période de pleine floraison contiennent deux types d'acide aristolochique I et II, dont le AA-I est majoritaire (Figure 3.28)

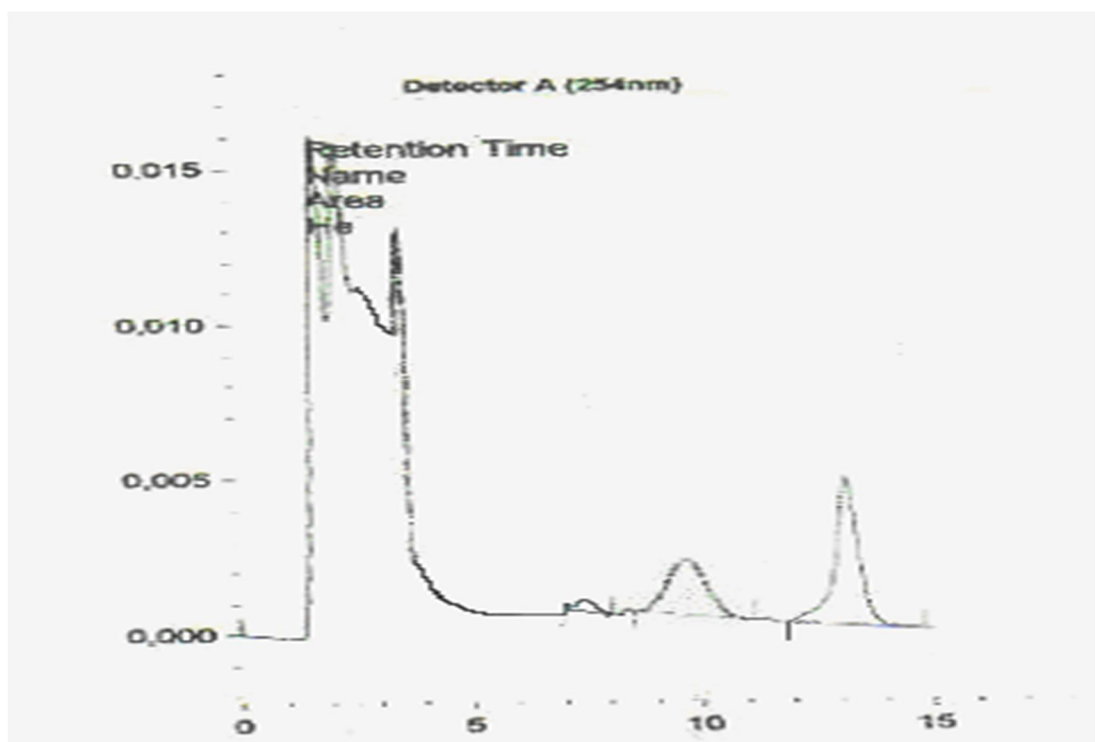


Figure 3.29 : Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC

Tableau 3.20 : Analyse par HPLC de l'acide aristolochique purifié à partir des tubercules

	Pic 1	Pic 2	Pic 3
Temps de rétention (en min)	7,11	9,95	13,35
%	1,87	46,59	15,54

L'acide aristolochique purifié, à partir des tubercules, donne le même résultat que l'extrait alcoolique de ces organes. Le chromatogramme de l'acide aristolochique purifié à partir des tubercules montre trois pics (Figure 3.29).

- Le pic n°1 avec 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). Ce dernier correspond à une molécule que nous n'avons pas pu identifier. Toutefois, nous avons caractérisé ce pic dans l'extrait alcoolique des tubercules. Ce dernier peut éventuellement correspondre à un sel d'acide aristolochique ou un dérivé.
- Le pic n°3 présente un temps de rétention de 13,35 min et il correspond à l'acide aristolochique I (Tableau 3.20).

Selon DEPASCUAL et al. [56.b] et KUMAR et al. [59] *Aristolochia longa* L. contient de l'acide aristolochique III et de l'acide aristolochique IV dans les tubercules. Ces deux types d'acides aristolochiques n'ont pu être observés dans les feuilles. Nous supposons alors que ces deux acides ne sont pas présents dans les feuilles ou bien que leur concentration est très faible pendant la période de floraison.

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

- Les feuilles et les tubercules contiennent les acides aristolochiques I et II.
- Dans les tubercules comme dans les feuilles (figure 3.28), l'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique majoritaire.
-

- Les tubercules contiennent probablement un troisième type qui peut correspondre éventuellement à l'acide aristolochique III ou IV pendant la période de pleine floraison (Figure 3.29).

3.3.3.1.2. Après maturité des graines

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

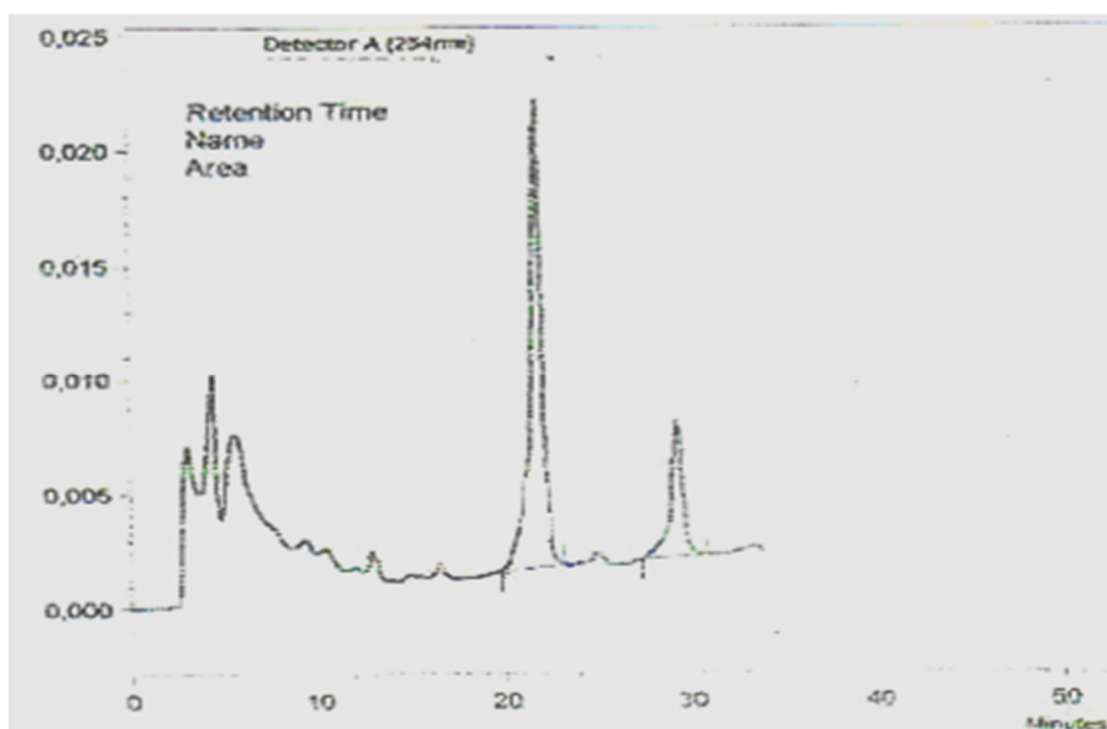


Figure 3.30 : Analyse du standard par HPLC

Tableau 3.21 : Résultat de l'analyse du standard

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

Le standard montre deux pics (Figure 3.30) :

- 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.

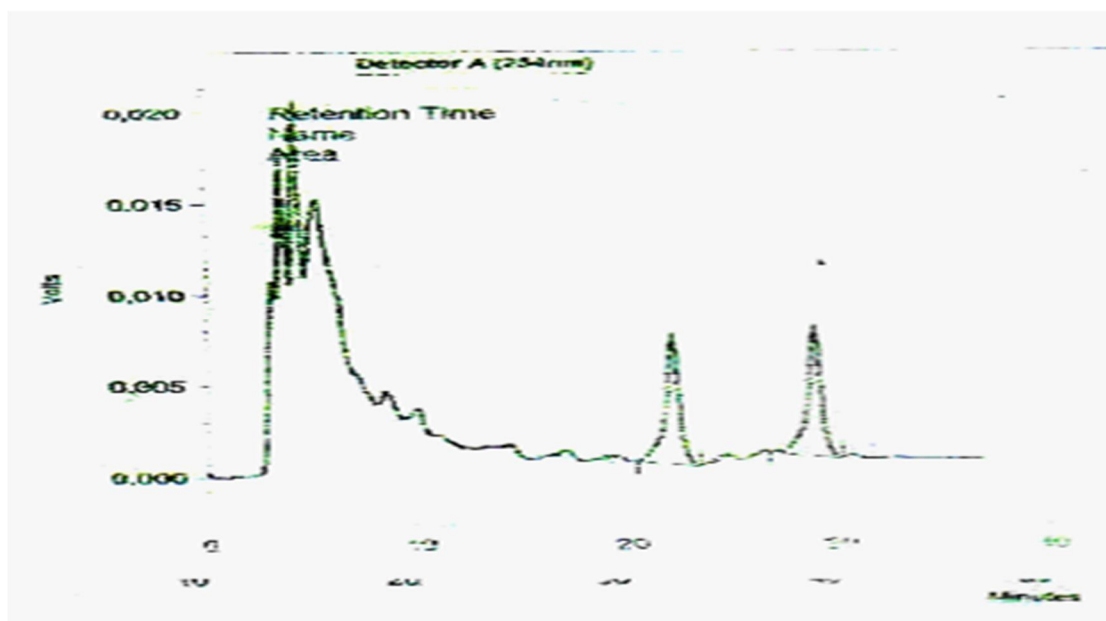


Figure 3.31 : Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC

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

	Pic 1	Pic 2
Tr (en min)	22.12	29,12
%	45.72	54,28

Le chromatogramme de l'extrait méthanolique des feuilles montre deux pics (Figure 3.31). 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. Ainsi, 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, néanmoins, nous observons une légère dominance de l'acide aristolochique I. Ce résultat est identique à celui observé dans les feuilles chez les plantes d'*Aristolochia longa* L. en période de Floraison.

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

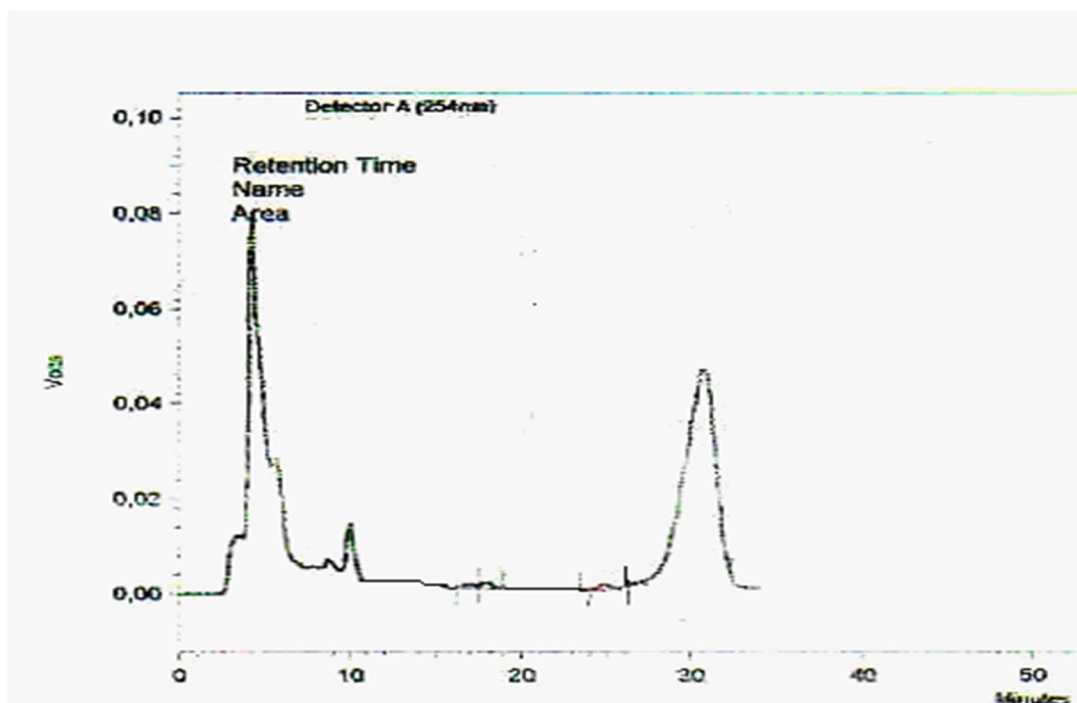


Figure 3.32: Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC

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

	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4	Pic 5
Temps de rétention (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 3.32). 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 la teneur en acide aristolochique II diminue. Il ne représente que 0.11 % des pics caractérisés.

Les pics n°1, n°2 et n°4 peuvent correspondre à d'autres types d'acide aristolochique, ou à d'autres métabolites secondaires présents dans cette concrète. 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).

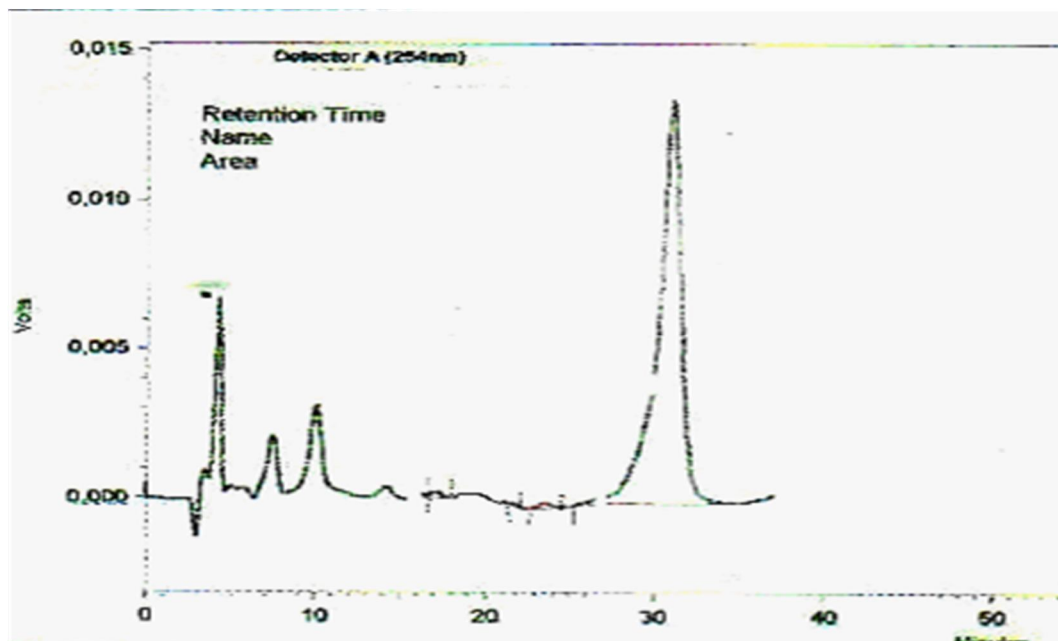


Figure 3.33 : Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC

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 (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 3.33). La comparaison des temps de rétention de ces pics 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 (Figure3.33).

Le pic n°1 et le pic n°2 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 3.34.

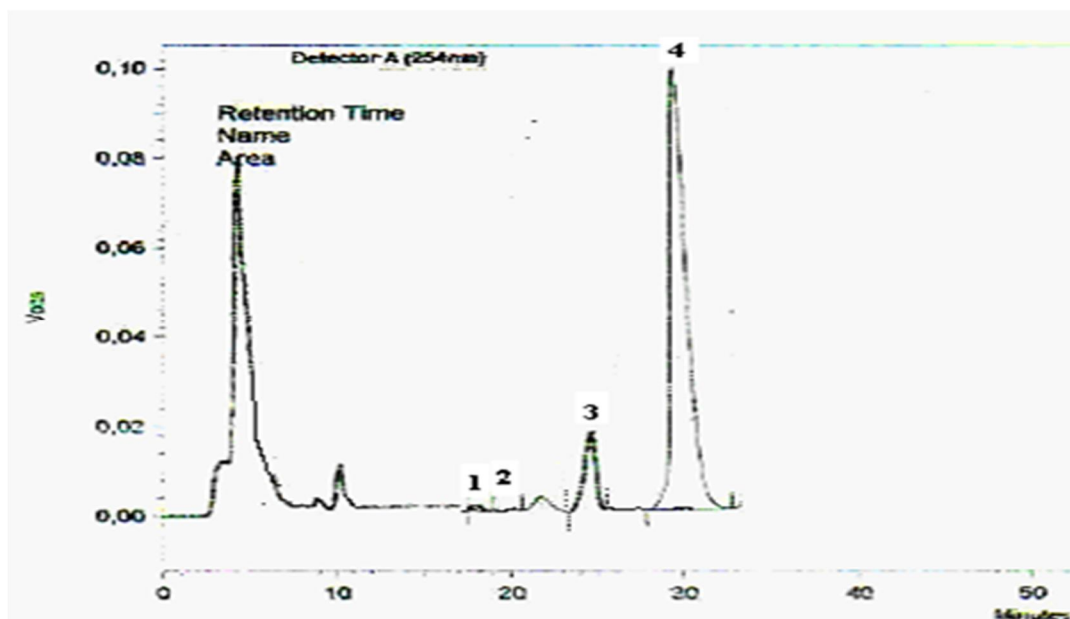


Figure 3.34 : Analyse du mélange des deux acides aristolochiques purifiés des tubercules.

Tableau 3.25 : Résultats du test de confirmation

	Pic1	Pic2	Pic3	Pic4
Temps de rétention (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 3.34 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 tubercules 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.

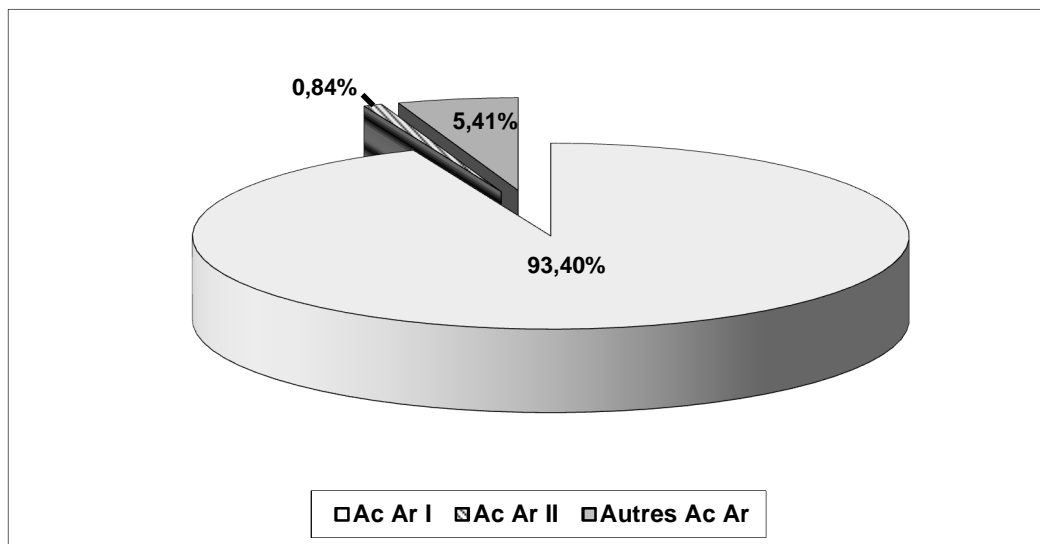


Figure 3.35 : Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines

Nous remarquons, d'après les résultats de la figure 3.35 (Tableau des calculs App C), 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.

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.

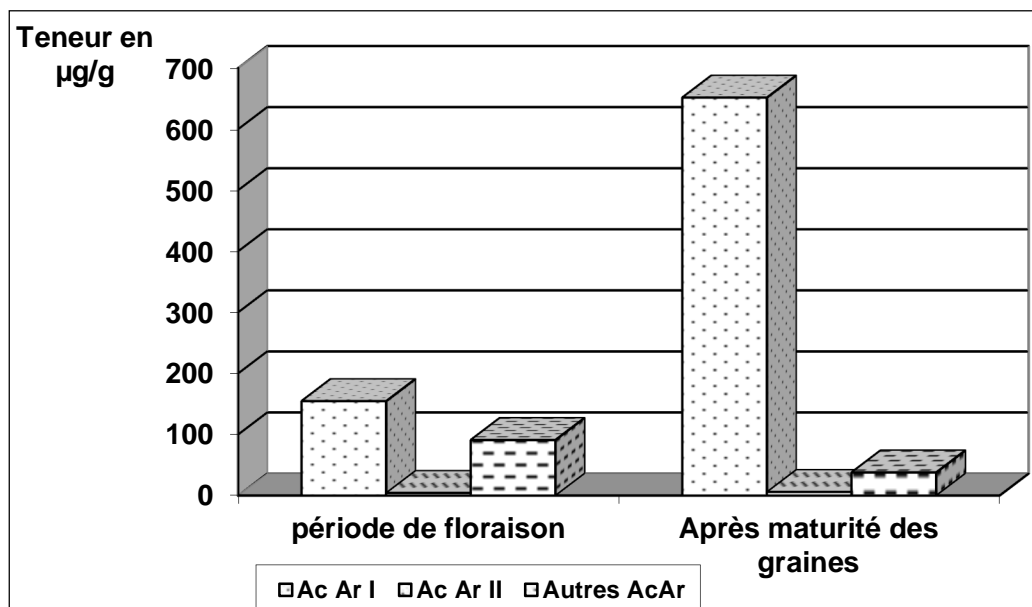


Figure 3.36 : Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche des tubercules.

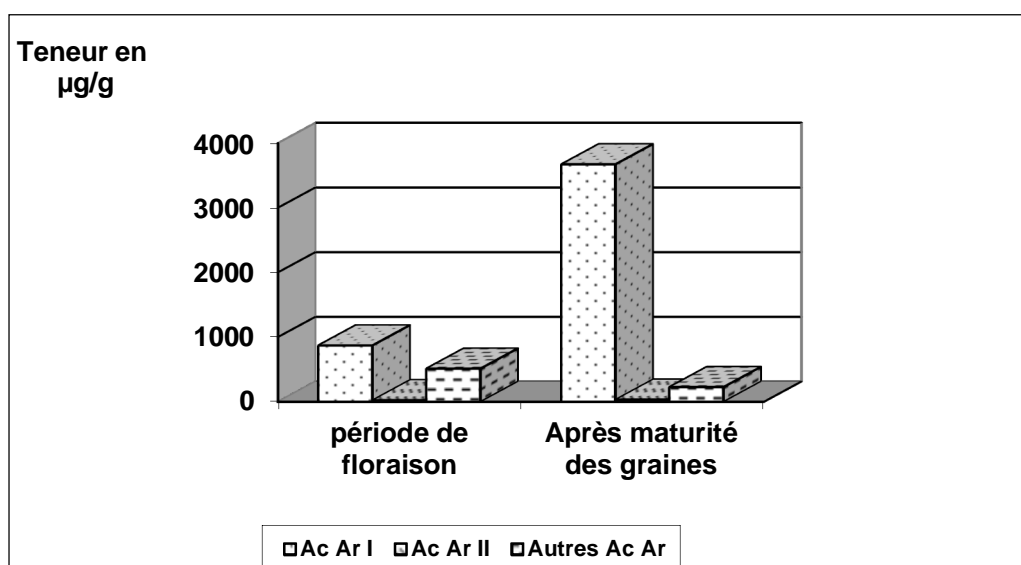


Figure 3.37 : Teneur en acide aristolochique dans la concrète alcoolique des tubercules.

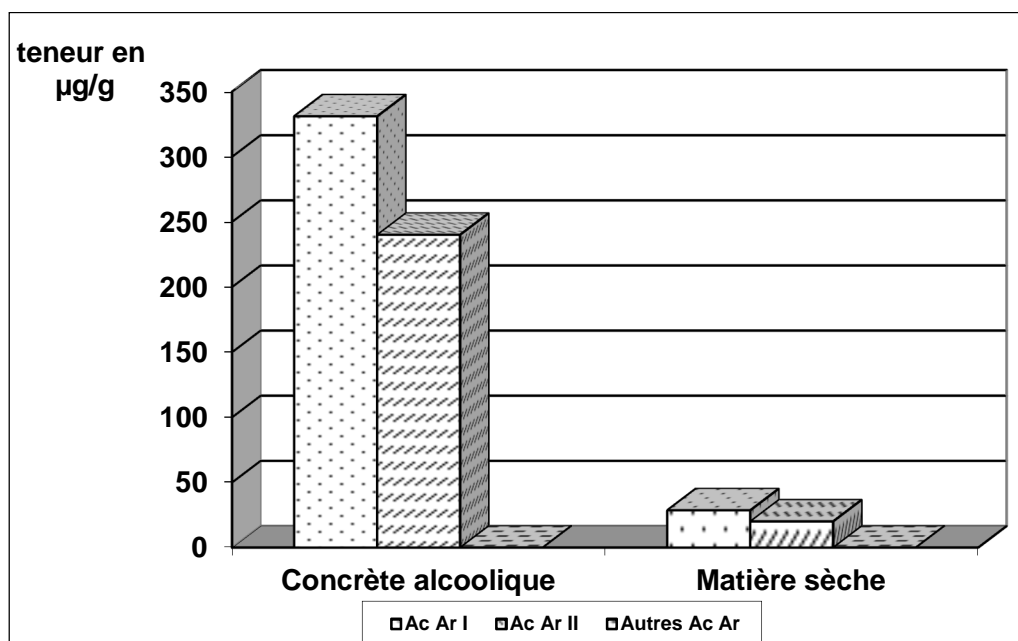


Figure 3.38 : Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche et la concrète alcoolique des feuilles en période de floraison.

D'après les figures 3.36, 3.37 et 3.38, 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 3.36 et Figure 3.37).
- L'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique dominant dans les feuilles et dans les tubercules pendant les deux périodes (Figure 3.36, Figure 3.37 et Figure 3.38).
- La teneur des feuilles en acide aristolochique est plus faible que celle des tubercules (Figure 3.36, Figure 3.37 et Figure 3.38).

La purification de l'acide aristolochique, à partir des feuilles et des tubercules, nous a permis de déterminer sa teneur au niveau de cette espèce. Les calculs nous amènent à déduire le pourcentage en matière sèche de ce principal principe actif dans les feuilles et les tubercules pendant deux périodes différentes (en pleine 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 de feuilles et des tubercules en période de pleine floraison. La teneur des tubercules en acide aristolochique augmente après la maturité des graines. En cette période ce métabolite représente 0,0698% de la matière sèche des tubercules.

L'étude, par CARRERAS [128], sur la teneur en acide aristolochique d'*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 d'*Aristolochia acutifolia* selon le résultat de PALMERIA JUNIOR et al. [144]

Selon CARRERAS (124), PALMERIA JUNIOR et al. [144] et en prenant en considération nos résultats, nous observons que la teneur en acide aristolochique des feuilles est plus élevée chez *Aristolochia longa* L.(0.0099%) par rapport à *Aristolochia acutifolia*.(0.0009%).

La teneur en acide aristolochique des feuilles d'*Aristolochia longa* L. est environ 11 fois plus élevée que chez *Aristolochia acutifolia*.

En outre, la teneur en acide aristolochique des tubercules d'*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 beatica*.

Les résultats de la teneur en différents acides aristolochiques dans un gramme de matière sèche nous permettent de comparer la teneur d'*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 0.1545mg/g dans les tubercules en période de floraison et de 0.6156mg/g après maturité des graines. La comparaison de nos résultats avec ceux de WEI et al [145], de ZHOU et al.[69] et de LEE et al.[146] nous permet de constater que la teneur en acide aristolochique I chez *Aristolochia longa* L., en période de floraison, est proche de celle de l'*Aristolochia menshuriensis* (0,14 mg / g) mais plus faible en comparaison avec *Fructus aristolochiae* (0,27 mg /g). Au contraire, en période de mise en réserve, les deux espèces *Radix aristolochiae* et *Fructus aristolochiae*, présentent des teneurs légèrement plus élevées respectivement de 0,61 mg / g et de 0,27 mg.

- La teneur en acide aristolochique II, chez *Aristolochia longa* L est de 0,0042 mg/g et 0,0084 mg/g respectivement en période de floraison et en période de mise en réserve. Ce résultat montre que cette espèce contient une quantité plus importante que *Radix aristolochiae* et *Fructus aristolochiae* pendant ces deux périodes. Alors que chez *Aristolochia menshuriensis* et après maturité des graines les teneurs sont comparables.

En période de mise en réserve, les tubercules d'*Aristolochia longa* L. sont très riches en acide aristolochique, particulièrement en acide aristolochique I. ce qui nous permet de dire que *Aristolochia longa* L. est plus toxique que *Radix aristolochiae*, *Fructus aristolochiae* et *Aristolochia menshuriensis*. Ce résultat vient confirmer ceux obtenus par Cherif et al.[129] lesquels ont calculé la concentration des acides aristolochiques I et II au niveau des tubercules en période de mise en réserve où l'AA I = 117.618µg/ml soit 0.117mg/ml, et l'AA II = 38.984µg/ml (0.038mg/ml).

Durant les deux périodes, les teneurs en acide aristolochique I (0.98 mg / g) et en acide aristolochique II, sont plus élevées ZHOU et al [69] ; LEE et al. [146] chez *Aristolochia debilis* en comparaison avec *Aristolochia longa* L.

Les teneurs en acide aristolochique I et en acide aristolochique II sont comparables chez *Aristolochia longa* L. et *Aristolochia manshuriensis* durant la période de floraison.

Selon LEE et al. [146], la teneur en acide aristolochique I d'*Aristolochia longa* L., en période de floraison, est plus faible que chez *Aristolochia fungchi*. Cette teneur augmente après la maturité des graines. Nous constatons aussi qu'*Aristolochia longa* L. est plus toxique qu'*Aristolochia contorta*.

La comparaison de nos résultats avec ceux de HASHIMOTO et al. [12] révèle que *Aristolochia debilis* et *Aristolochia manshuriensis* sont plus riches que *Aristolochia longa* L. en acide aristolochique I et en acide aristolochique II.

Nous remarquons aussi qu'*Aristolochia longa* L. est plus toxique que les espèces *Asarum* étudiées par HASHIMOTO et al.[12]. Les résultats de ces travaux montrent que *Asarum sieboldii*, *Asarum himalaicum*, et *Asarum forbessi* ne contiennent ni l'acide aristolochique I ni l'acide aristolochique II. Toutefois, *Asarum splendens* ne contient que des traces de ces deux acides.

L'analyse de l'extrait alcoolique, des tubercules et des feuilles par chromatographie liquide à haute performance révèle qu'*Aristolochia longa* L. contient les acides aristolochiques I et II dans les feuilles et les tubercules pendant les deux périodes étudiées.

En pleine floraison

- dans les feuilles les acides aristolochiques I et II ont des rapports proches et avec une légère dominance de l'acide aristolochique I.
- dans le tubercule nous avons révélé la présence d'un troisième type d'acide aristolochique en plus de l'acide aristolochique I et II en période de pleine floraison. Ce troisième acide peut correspondre à l'acide aristolochique III ou IV.

En période de mise en réserve

Après maturité des graines, nous avons caractérisé, en plus des acides aristolochiques I et II, trois autres pics dans l'extrait alcoolique de tubercules. Et un quatrième pic dans l'acide aristolochique purifié en plus des pics révélés en période de pleine floraison. Nous avons remarqué que l'acide aristolochique I prédomine les autres types d'acide aristolochique caractérisés. Nous comparons la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II de la concrète alcoolique d'*Aristolochia longa* L. avec les résultats des travaux de YUAN et al [84.b] 1 et 2 et de JONG et al (147), nous constatons que :

Les espèces *Asarum* étudiées par JONG et al.[147] ne contiennent que l'acide aristolochique I , tandis que *Aristolochia longa* L. contient l'aristolochique I et l'acide aristolochique II.

Après maturité des graines, les tubercules d'*Aristolochia longa* L. présentent une teneur en acide aristolochique I et acide aristolochique II plus importante que toutes les espèces étudiées par Jong et al.[147]. Chez *Aristolochia crispulatum* ces teneurs sont les plus faibles.

3.3.3.2. Détermination par HPLC des acides aristolochiques de la récolte de 2008

Pour la récolte de juin 2008, les échantillons (tubercules et feuilles) ont subi préalablement un balayage par spectrophotométrie UV-VIS afin de pouvoir vérifier la présence de quelques constituants dans l'extrait alcoolique.

Les spectres sont illustrés par les figures 3.39 et 3.40.

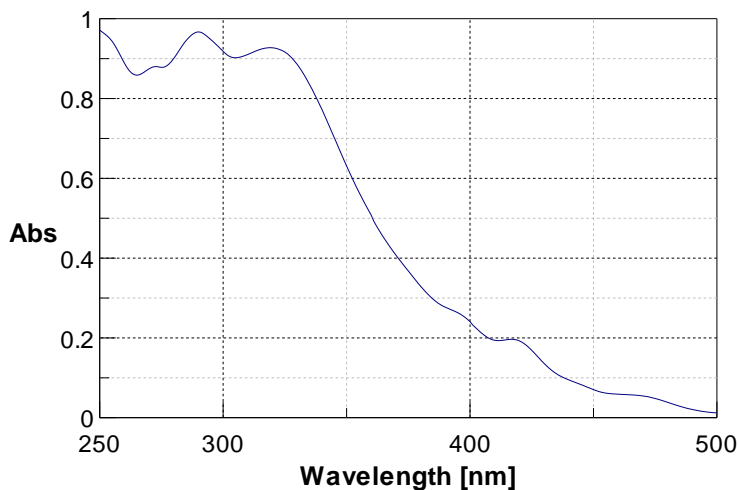


Figure 3.39 : Spectre UV- Vis de la concrète alcoolique des feuilles

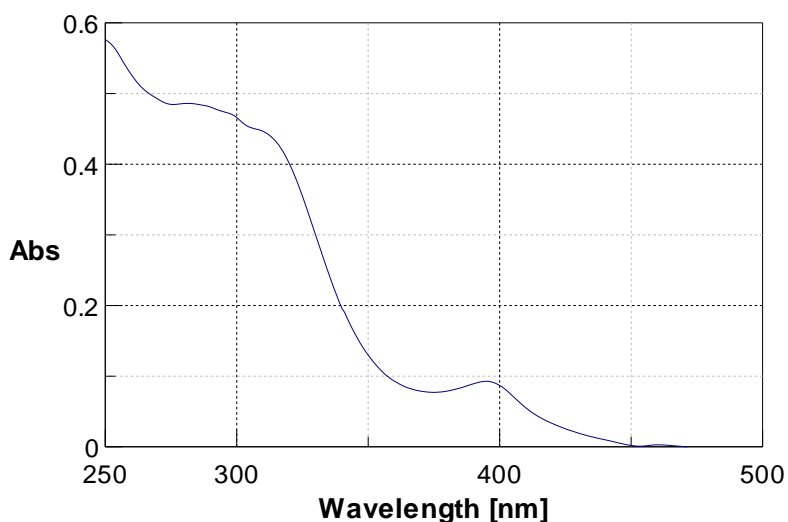


Figure 3.40 : Spectre de la concrète alcoolique des tubercules.

Ces spectres révèlent que nos échantillons contiennent, en effet, des composés phénoliques qui absorbent à des longueurs d'ondes de $\lambda = 280$ nm et $\lambda = 340$ nm.

D'après Yuan et al. [84.b] ce domaine d'absorption correspond à celui de l'acide aristolochique et dérivés.

En outre, ces résultats confirment ceux obtenus précédemment (3.3.2.) lors de la récolte de 2007.

3.3.3.2.1. Résultats de l'analyse chromatographique

Le chromatogramme du standard (Figure 3.41) présente 2 pics, celui d'AA-I et AA-II, qui sont apparus à partir de la 40^{ème} minute (Tableau 3.26).

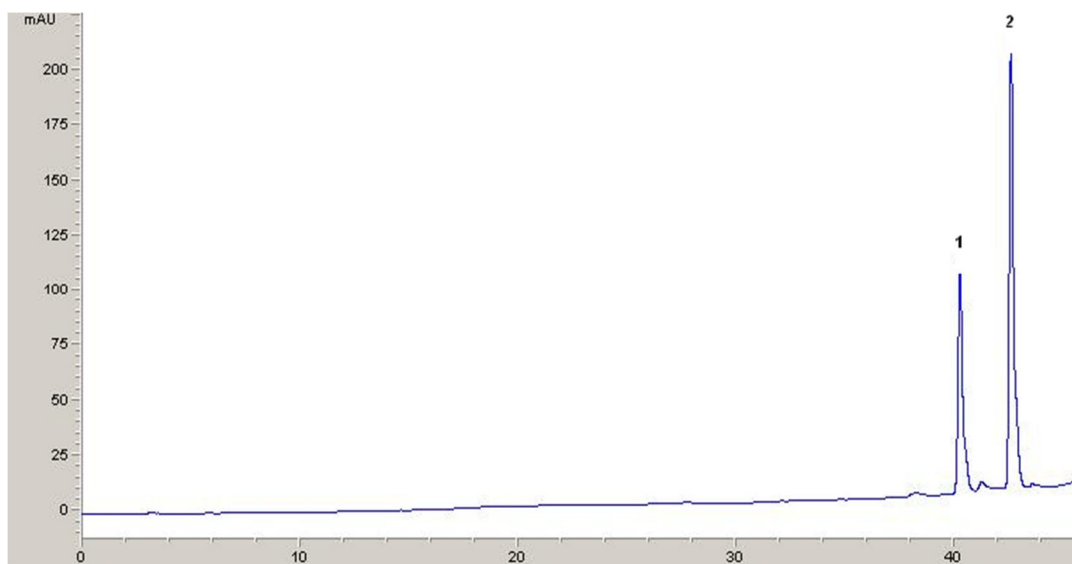


Figure 3.41 : Analyse du standard

Tableau 3.26: Résultats de l'analyse du standard.

Pic	Composés phénoliques	Temps de rétention (min)	Surface du pic
1	Acide aristolochique II	40,23	1611,54
2	Acide aristolochique I	42,57	3146,28

Analyse de la poudre végétale :

Cette analyse concerne les poudres des échantillons séchés de feuilles, de tubercules et des fruits d'*Aristolochia Longa* L.

D'après la figure 3.42, nous constatons l'absence ou une faible présence de AA-II et la présence de AA-I en une teneur appréciable.

Les deux acides aristolochiques apparaissent à partir de la 40^{ème} minute.

La figure 3.43 illustre le résultat obtenu à partir de la poudre des fruits, nous remarquons la présence de plusieurs pics dont ceux de AA-I et AA-II. Nous constatons la présence de AA-I avec une très faible concentration mais aussi de l'AA-II à l'état de traces. Cette faible présence des deux acides aristolochiques pourrait être due au fait que l'accumulation maximale des principes actifs chez *Aristolochia Longa* L au niveau des fruits se fait au-delà de juin.

A partir de la figure 3.44 qui concerne l'analyse de la poudre des tubercules, on remarque que les deux acides aristolochiques sont présents. Ils apparaissent également à partir de la 40^{ème} minute (AA-I =40.327 AA-II= 42.633) avec un pic de AA-I plus important donc une concentration probablement plus importante que celle de AA-II (Tableau 3.27).

En ce qui concerne l'échantillon provenant de Roumanie (figure 3.45), nous remarquons la présence des deux acides aristolochiques qui apparaissent à des temps de rétention respectifs de : AA-II = 40.390 et AA-I = 42.724, où AA-I est plus important que AA-II. La teneur de ces alcaloïdes ne montre pas une différence appréciable entre *Aristolochia longa* L. récoltées en Algérie et *Aristolochia clematitis* de Roumanie.

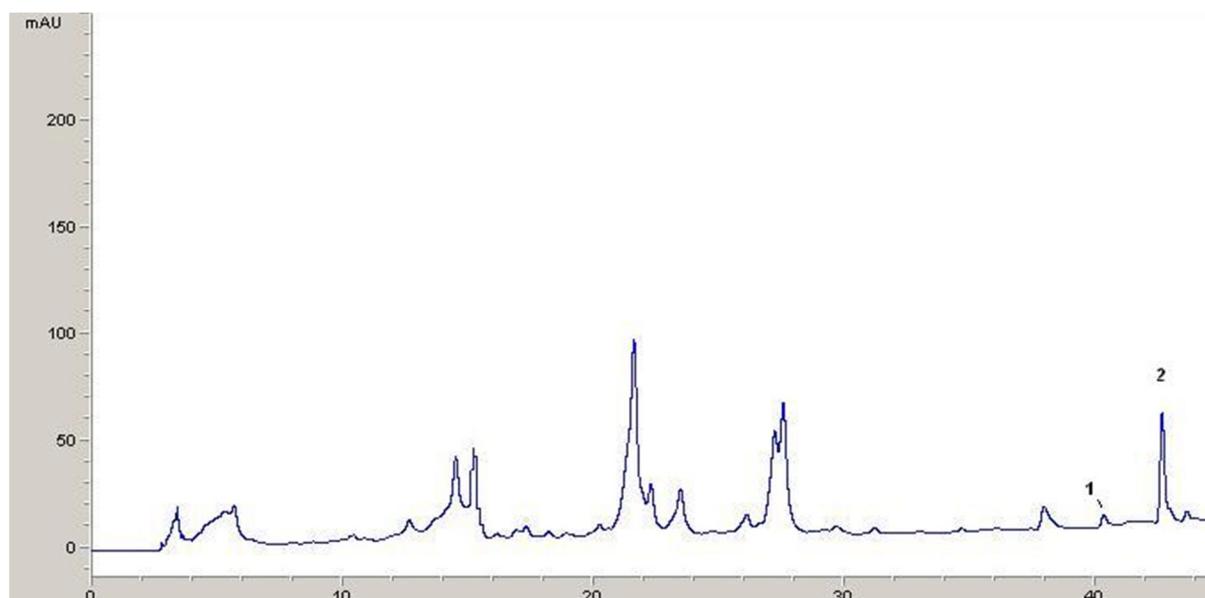
En outre, les résultats de l'analyse des poudres végétales révèlent que :

- La présence des deux acides aristolochiques fluctue selon la partie végétale avec une concentration plus importante au niveau des tubercules,
- L'acide aristolochique AA-I est le composé majoritaire au niveau de tous les échantillons.

Cela concorde avec les travaux de Lee et *al.* [146] qui ont mentionné que l'AAI est majoritaire chez *Aristolochia fangchi*. Et que le profil des acides aristolochiques dépend des espèces d'*Aristolochia*.

Tableau 3.27 : Résultats de l'analyse des échantillons séchés (poudres)

Pic	Organe végétal	Temps de rétention (min)	Aire du pic	Rapport A-I/A-II
1	Feuilles	AA-II=40.295 AA-I= 42.617	AA-II 130,59 AA-I 982,14	R=7.52
2	Fruits	AA-II=Absent ou traces AA-I= 4.802	AA-II 123,09 AA-I 519,01	R=4.21
3	Tubercules	AA-II=40.327 AA-I= 42.633	AA-II 179,33 AA-I 896,67	R=5.00

Figure 3.42: Chromatogramme de la poudre des feuilles d'*Aristolochia longa* L.

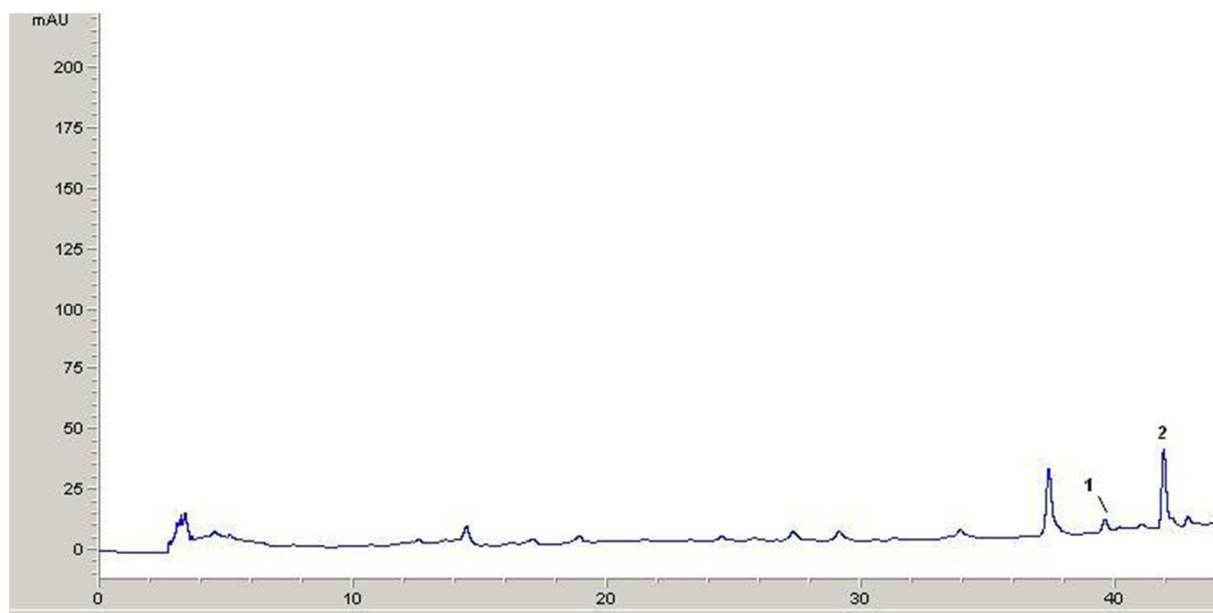


Figure 3.43 : Chromatogramme de la poudre des fruits d'*Aristolochia longa* L.

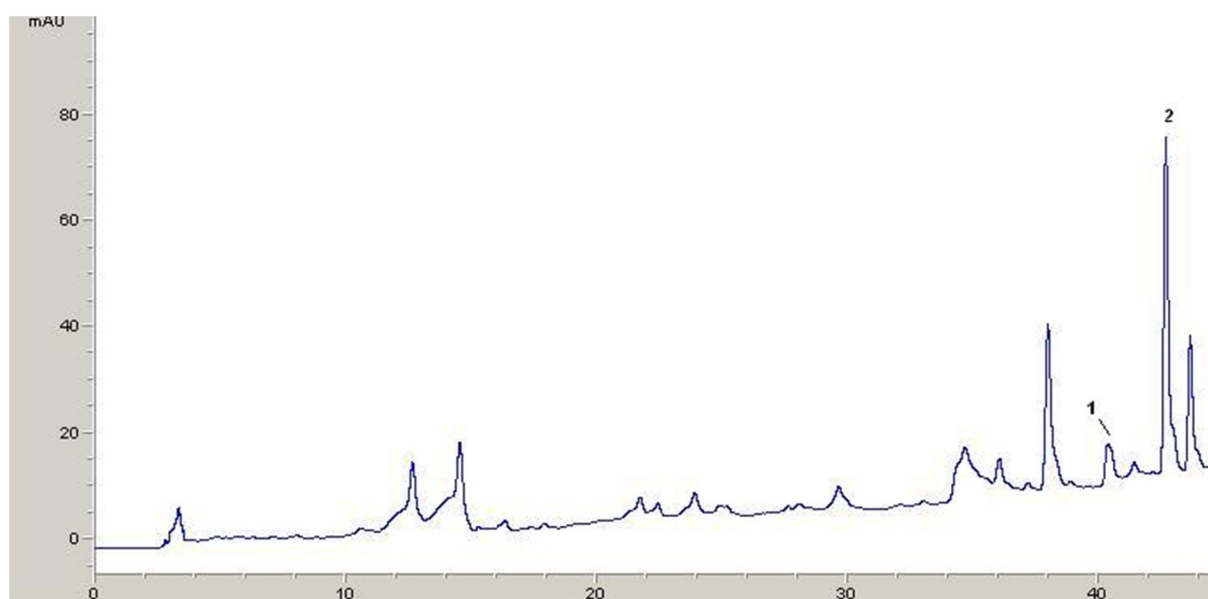


Figure 3.44 : Chromatogramme de la poudre des tubercules d'*Aristolochia longa* L.

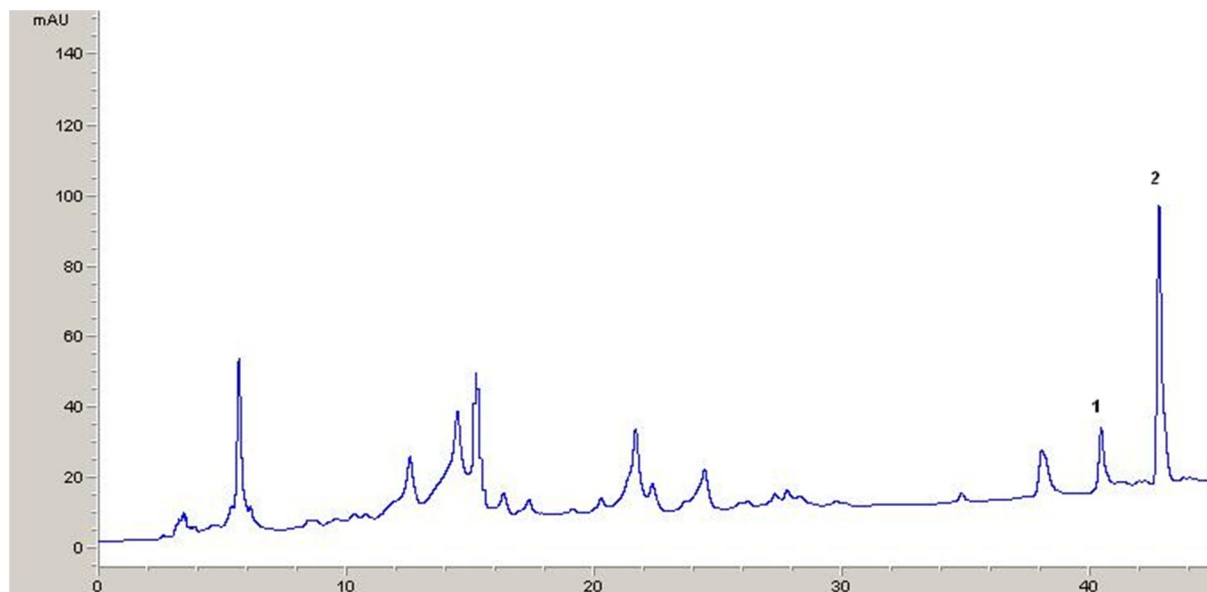


Figure 3.45 : Chromatogramme de la poudre des feuilles d'*Aristolochia clematitis* (Roumanie)

3.3.3.2.2. Analyse de la concrète d'*Aristolochia Longa* L.

Cette analyse a concerné deux parties de la plante à savoir, les tubercules et les feuilles.

Les figures 3.46, 3.47 et 3.48 illustrent les résultats obtenus. Nous remarquons la présence des deux acides aristolochiques AA-I et AA-II avec apparition à partir de la 40^{ème} minute de l'AA-II ensuite celle de l'AA-I.

Les pics des deux acides aristolochiques sont très importants mettant en évidence leur forte teneur. Cette dernière est probablement en rapport avec les multiples siphonages que subit une concrète la rendant concentrée en multiples métabolites secondaires, par contre dans le premier cas, les poudres végétales (3.3.4.3.1.1) sont diluées à chaque fois.

De même, nous retenons que le AA-II est plus important au niveau des feuilles, par contre l'acide aristolochique AA-I est plutôt concentré au niveau des racines.

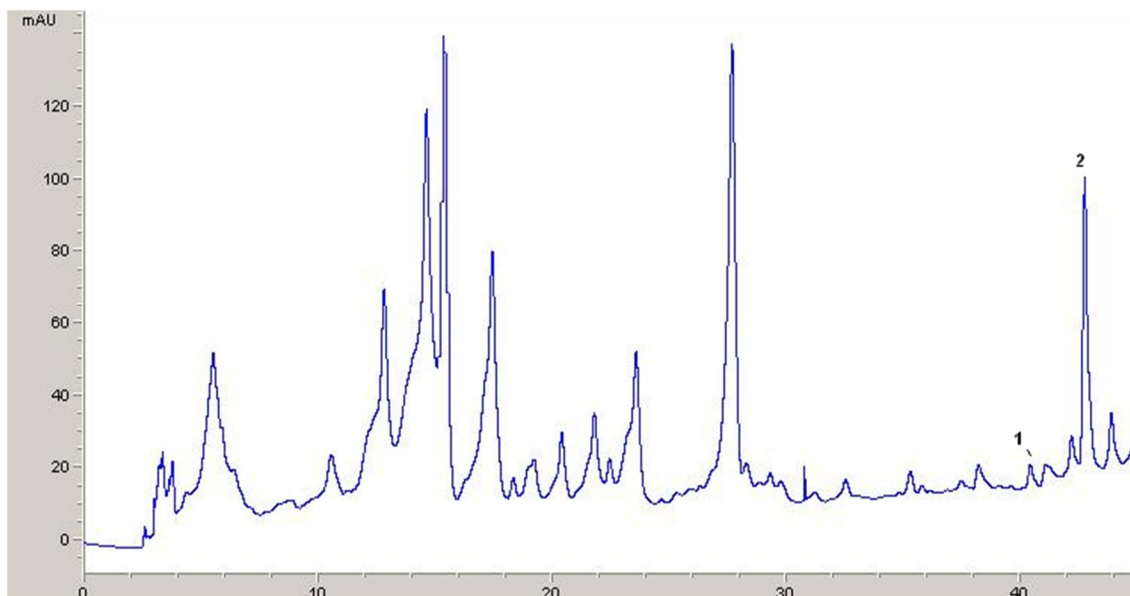


Figure 3.46 : Chromatogramme de la concrète des feuilles

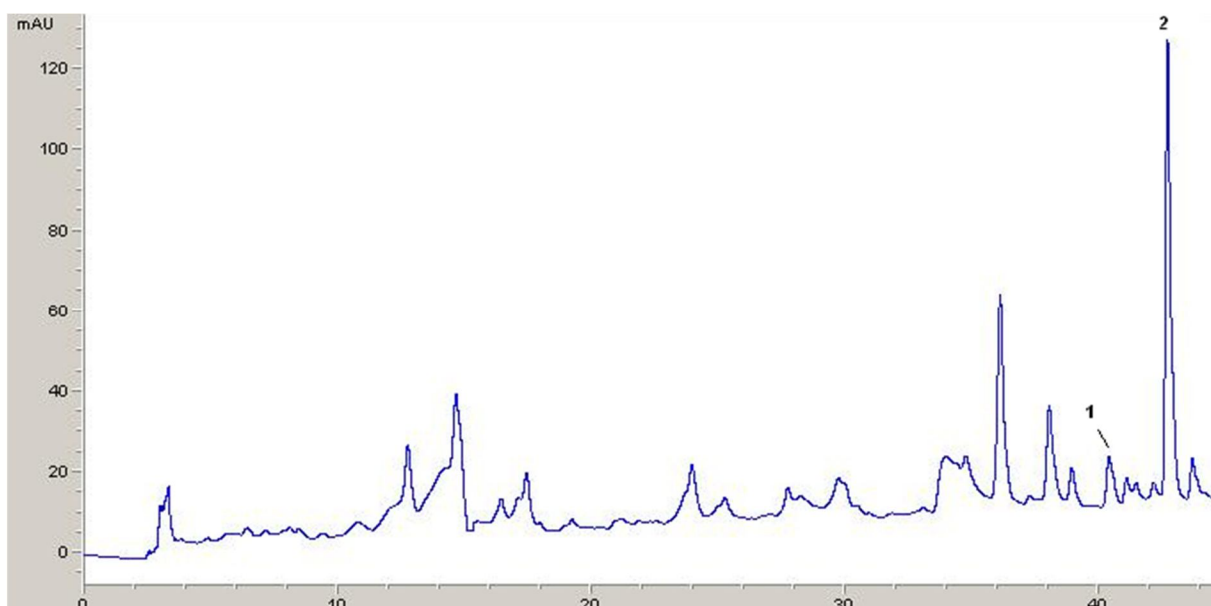


Figure 3.47 : Chromatogramme de la concrète des tubercules

Tableau 3.27 : Résultats de l'analyse des différentes concrètes

Pic	Origine de la concrète	Temps de rétention (min)	Aire du pic	Rapport A-I/A-II
1	Concrète des feuilles	AA-II=40.376 AA-I= 42.692	AA-II 784.99 AA-I 2254.05	R=2.87
2	Concrète des tubercules	AA-II=40.350 AA-I= 42.658	AA-II 665.91 AA-I 3844.39	R=5.77

La reprise des analyses par HPLC sur les poudres séchées des tubercules, feuilles fruits et concrètes, ne font que confirmés les résultats obtenus lors des essais de 2007, à savoir une grande concentration en acides aristolochiques I et II.

Ces résultats expliquent en partie, certaines informations collectées au cours de l'enquête ethnobotanique. En effet, les tubercules sont très utilisés par les différentes personnes interrogées, préférentiellement vers la fin de l'été (après maturité des graines) ou en automne. Ceci est en rapport avec l'accumulation des principes actifs.

3.3.4. Résultats de la caractérisation et identification des composés de l'huile essentielle par CG/MS

Nous avons procédé à l'analyse de l'huile essentielle d'*Aristolochia longa* L. par Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse afin de connaître une éventuelle composition chimique de l'huile essentielle.

3.3.4.1. Analyse de l'huile essentielle des feuilles sèches

L'analyse du chromatogramme CG/MS des feuilles sèches d'*Aristolochia longa* L. (Figure 3.49) permet de distinguer un ensemble de pics dont trois sont majoritaires. Le premier pic important correspond au spectre relatif du Diisocylfталate connu sous le nom de : DOP (Figure 3.50). Le deuxième pic correspond au spectre de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)- (Figure 3.51). Cependant le troisième pic est un dérivé phénolique dont le spectre correspond au Deenaxe (Figure 3.52).

Les acides Oléique et Stéarique correspondent respectivement au quatrième et cinquième pic (Tableau 3.28).

Il semblerait que l'huile essentielle des feuilles contienne une bonne proportion de composés phénoliques et quelques acides gras.

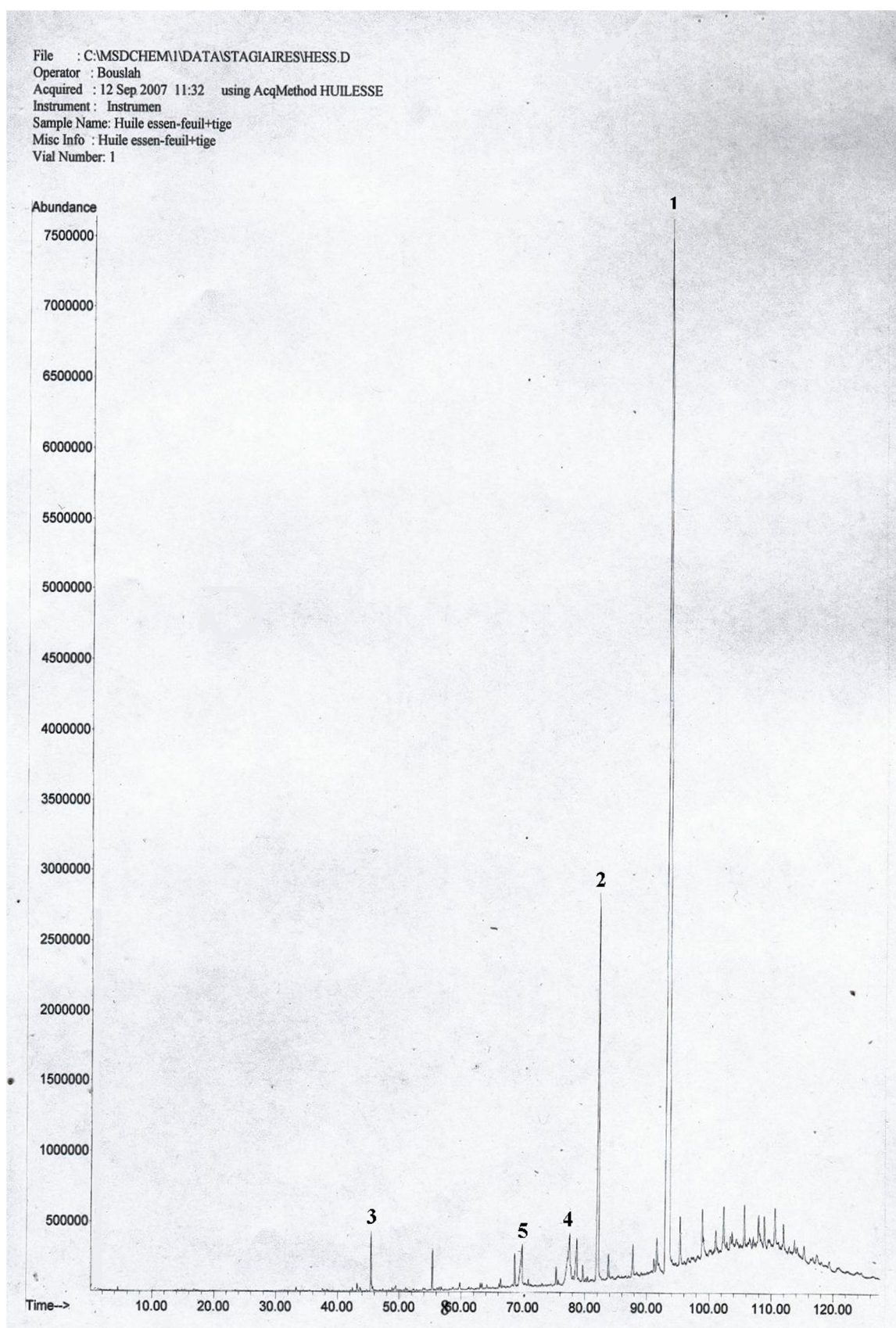


Fig 3.49 : Chromatogramme de la CG/MS de l'huile essentielle des feuilles sèches d'*Aristolochia longa* L.

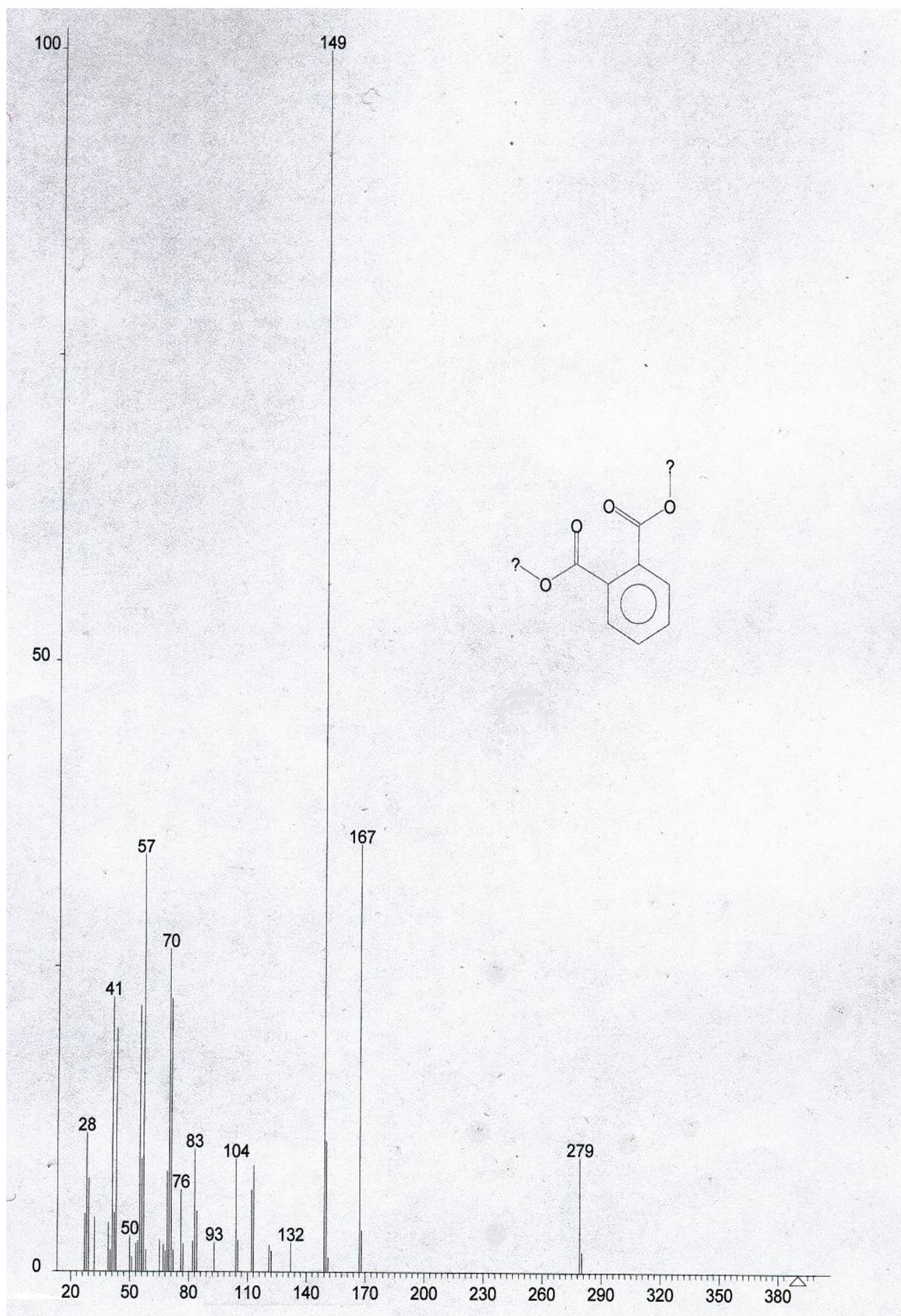


Figure 3.50 : Spectre de masse de Diisooctylfthalate

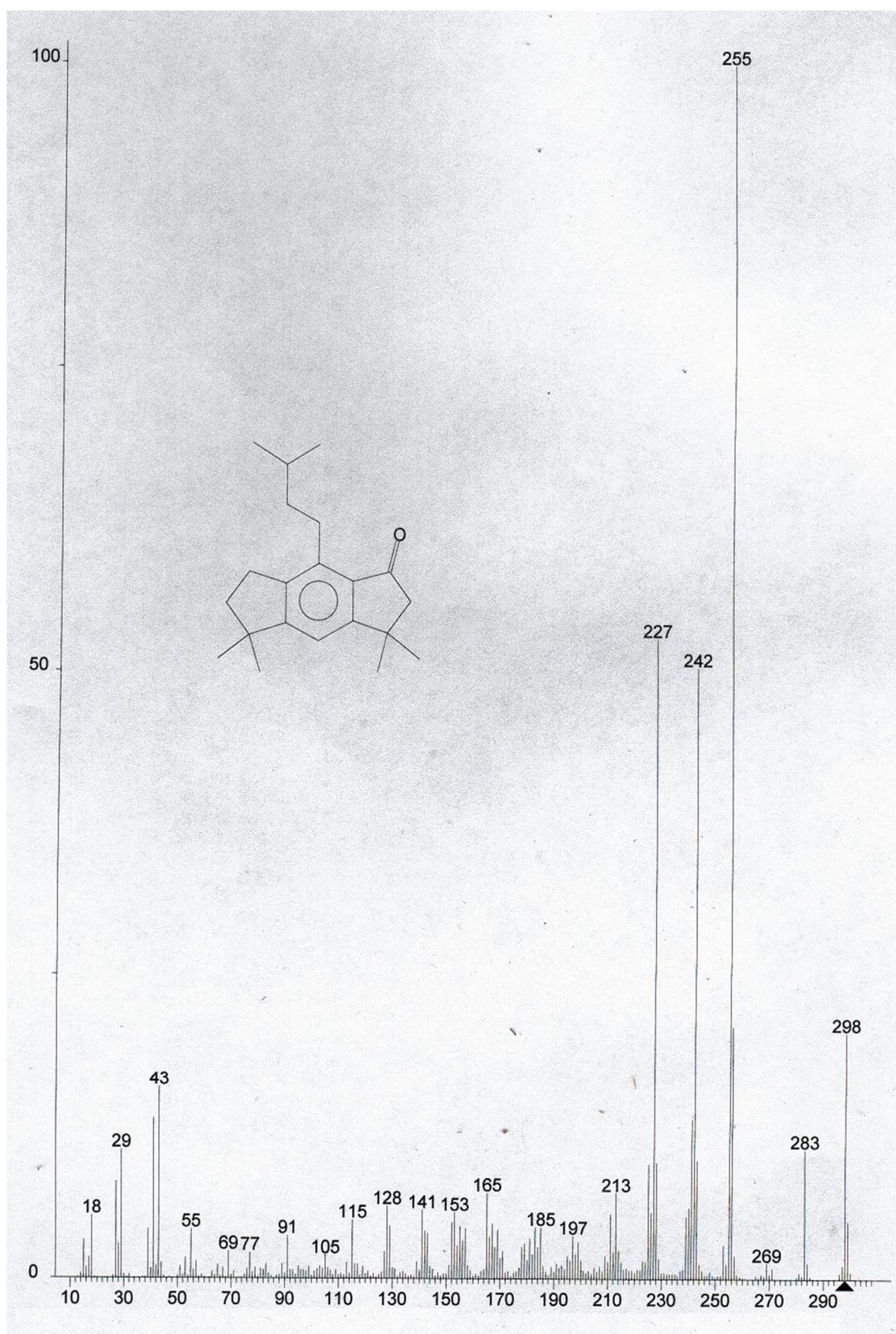


Figure 3.51 : Spectre de masse de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-

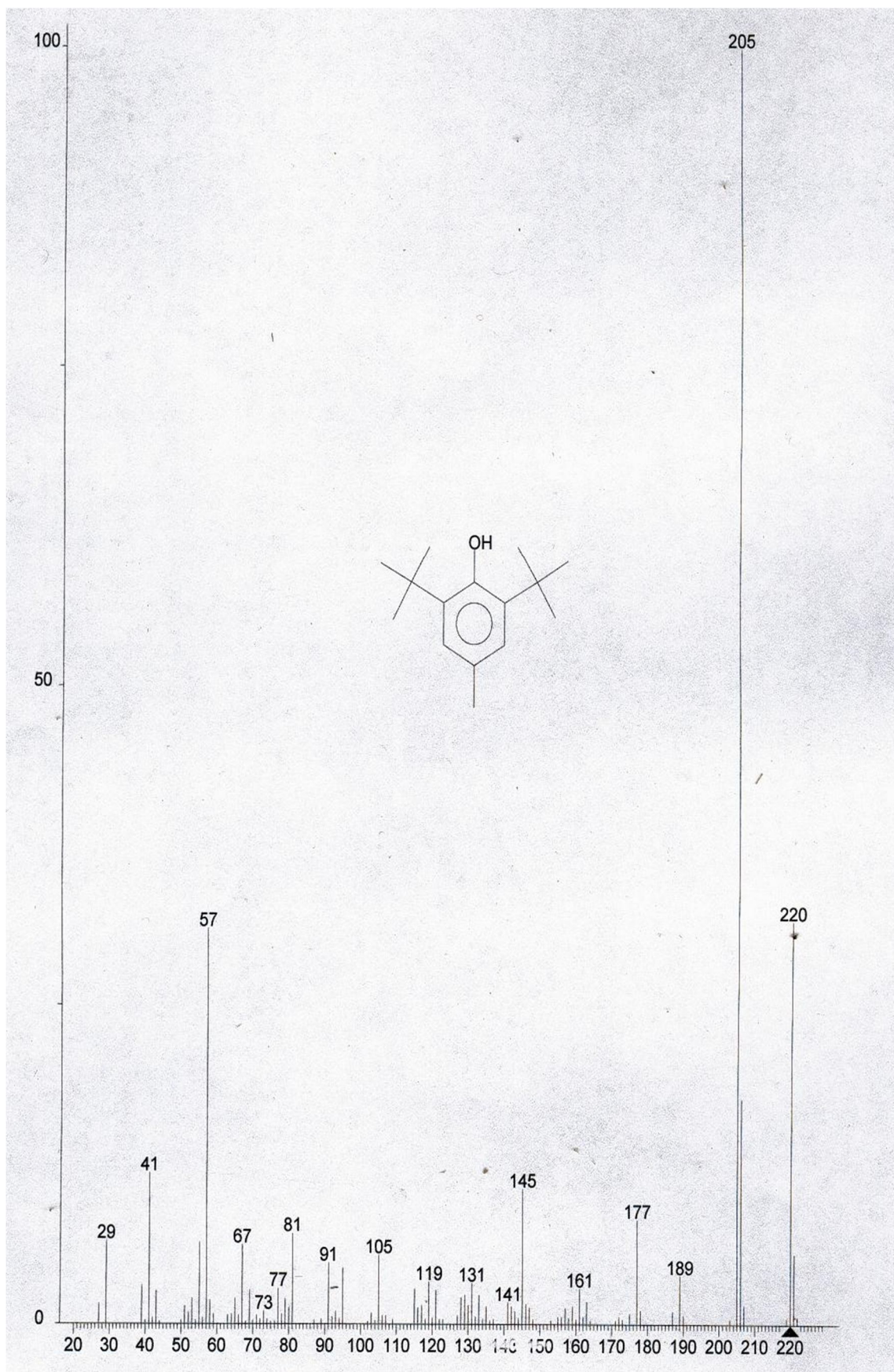


Figure 3.52 : Spectre de masse de Deenax

3.3.4.2. Analyse de l'huile essentielle des tubercules secs.

La prospection du chromatogramme CG/MS des tubercules secs d'*Aristolochia longa* L. (Figure 3.53) permet de distinguer la présence d'un seul pic important (le premier pic). Il correspond au spectre du Lycopene, 1,2-dihydro-1-hydroxy- (Figure 3.54), avec d'autres pics de moindre importance. Le deuxième pic correspondant au spectre de masse de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)- (Figure 3.55) qui est le seul composé commun déjà cité dans l'interprétation de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles sèches d'*Aristolochia longa* L. (3.3.5.1). Cependant sa teneur dans les feuilles est plus importante que dans les tubercules. Le troisième pic correspond au spectre de masse 2-[4-methyl-6-(2, 6,6-trimethylcyclohex-1-enyl) hexa-1, 3,5-trienyl] cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde (Figure 3.56).

Le quatrième pic correspond au spectre de masse de Carda-4,20(22)-dienolide, 3-[(6-deoxy-3-O-methyl-. Alpha.-D-allopyranosyl)oxy]-1, 14-dihydroxy-, (1. beta., 3 beta), dont la structure est complexe (Figure 3.57).

Le cinquième pic correspondant au spectre de masse de la Lycopene, 1,2-dihydro-1-hydroxy- (Figure 3.58), qui peut être un isomère de la Rhodopin du premier pic, et enfin le sixième pic correspondant au spectre de masse du 4, 6, 8, 10-Tetradecapentaenoique, 9a-(acetox)-1a, 1b, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a-decahydro-4a, 7b-dihydroxy-3- ester (Figure 3.59).

Les structures des composés de l'huile essentielle des feuilles et des tubercules d'*Aristolochia longa* L. sont mentionnées dans les tableaux 3.28 et 3.29.

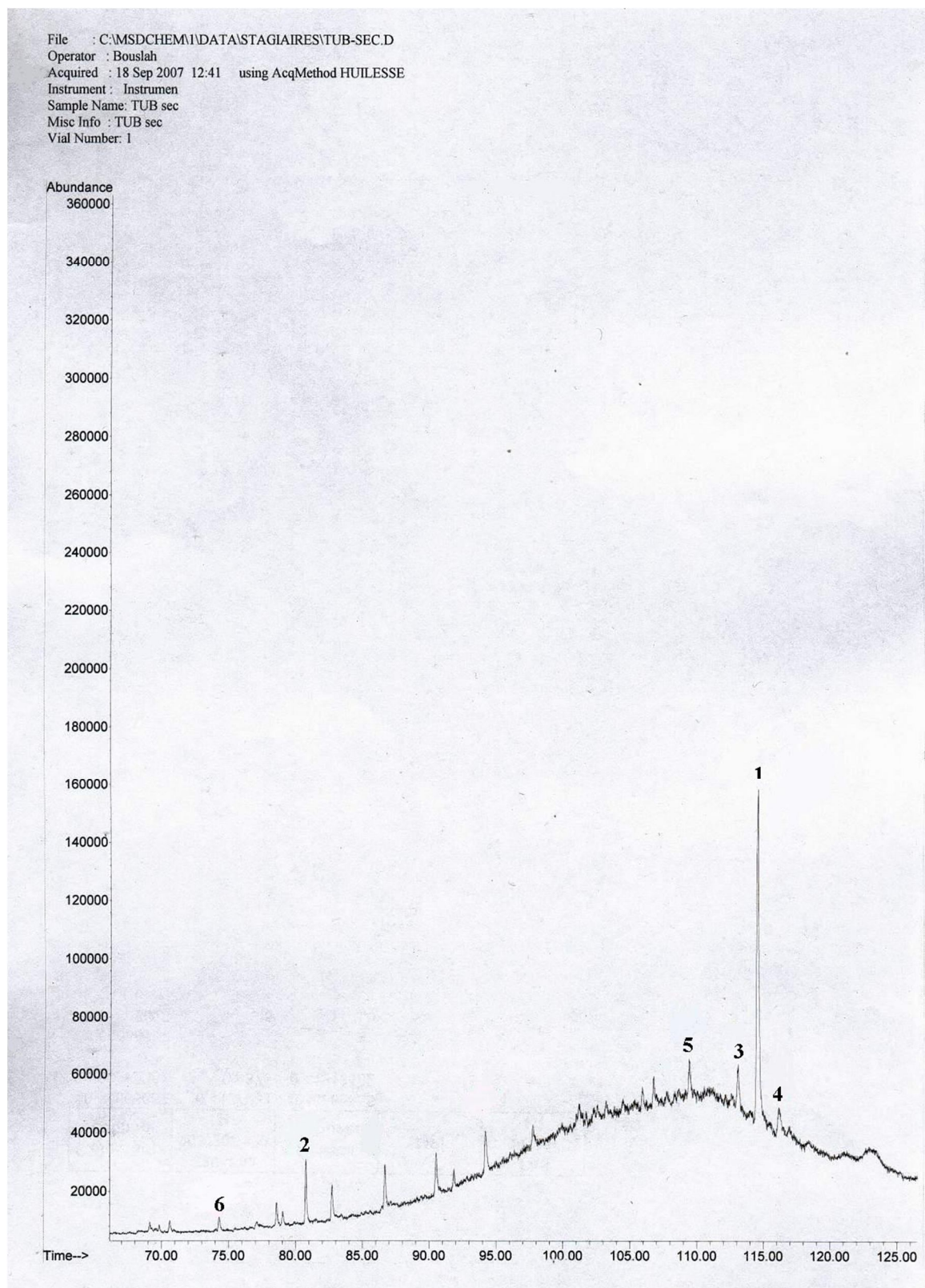


Figure 3.53 : Chromatogramme de la CG/MS de l'huile essentielle des tubercules secs d'*Aristolochia longa* L.

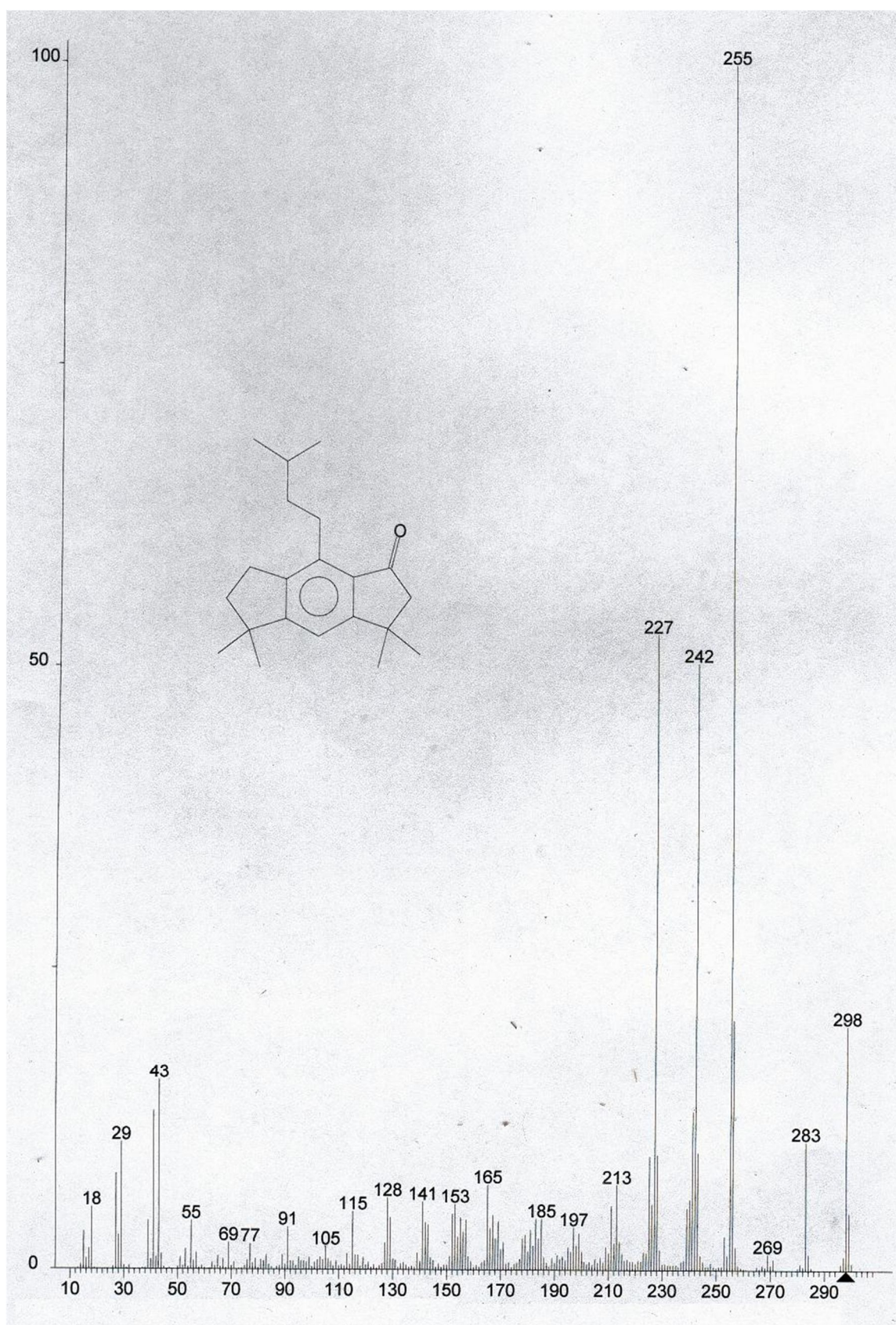


Figure 3.55: Spectre de masse de s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-

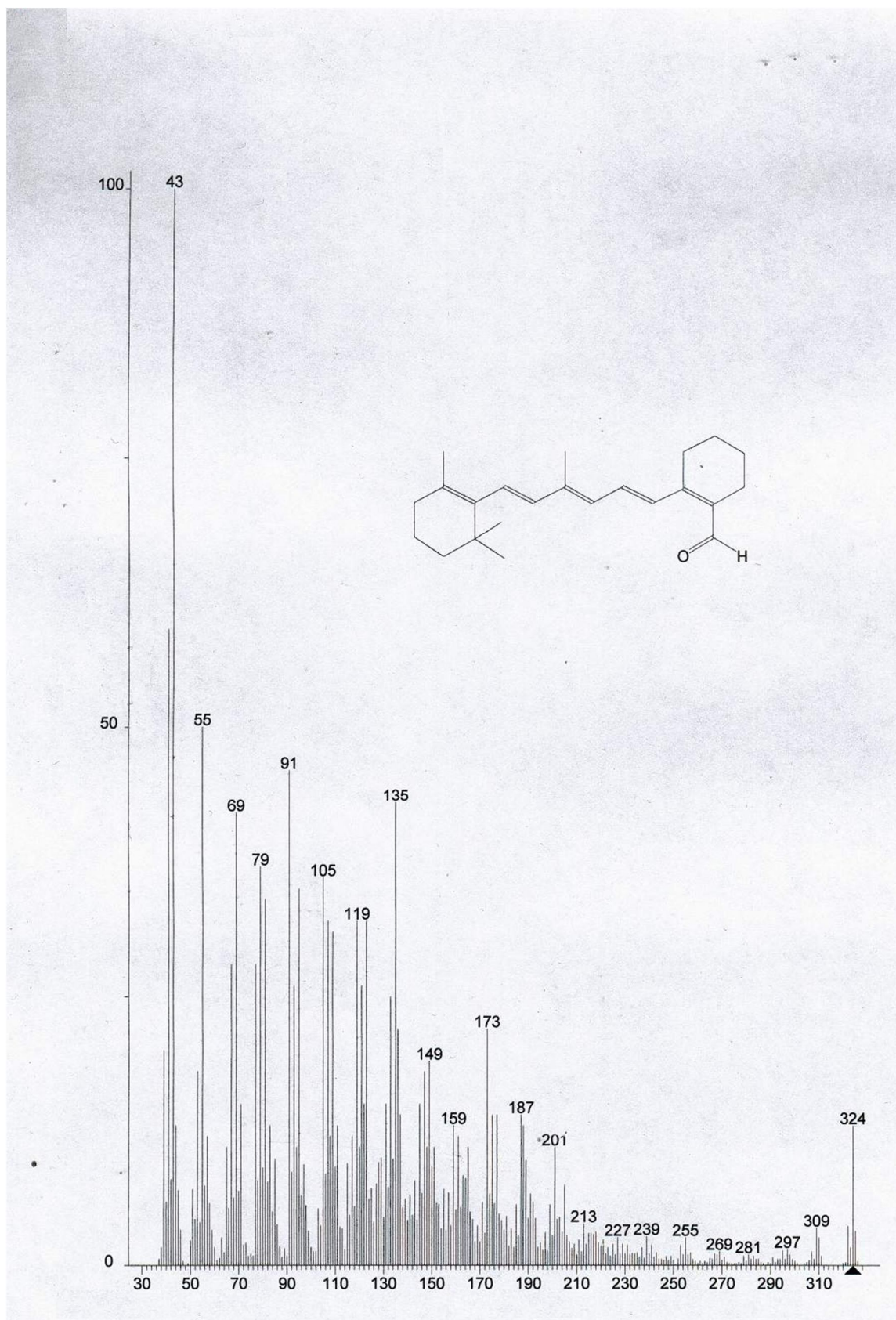


Figure 3.56 : Spectre de masse de 2-[4-méthyl-6-(2, 6,6-triméthylcyclohex-1-enyl) hexa-1, 3,5-trienyl] cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde

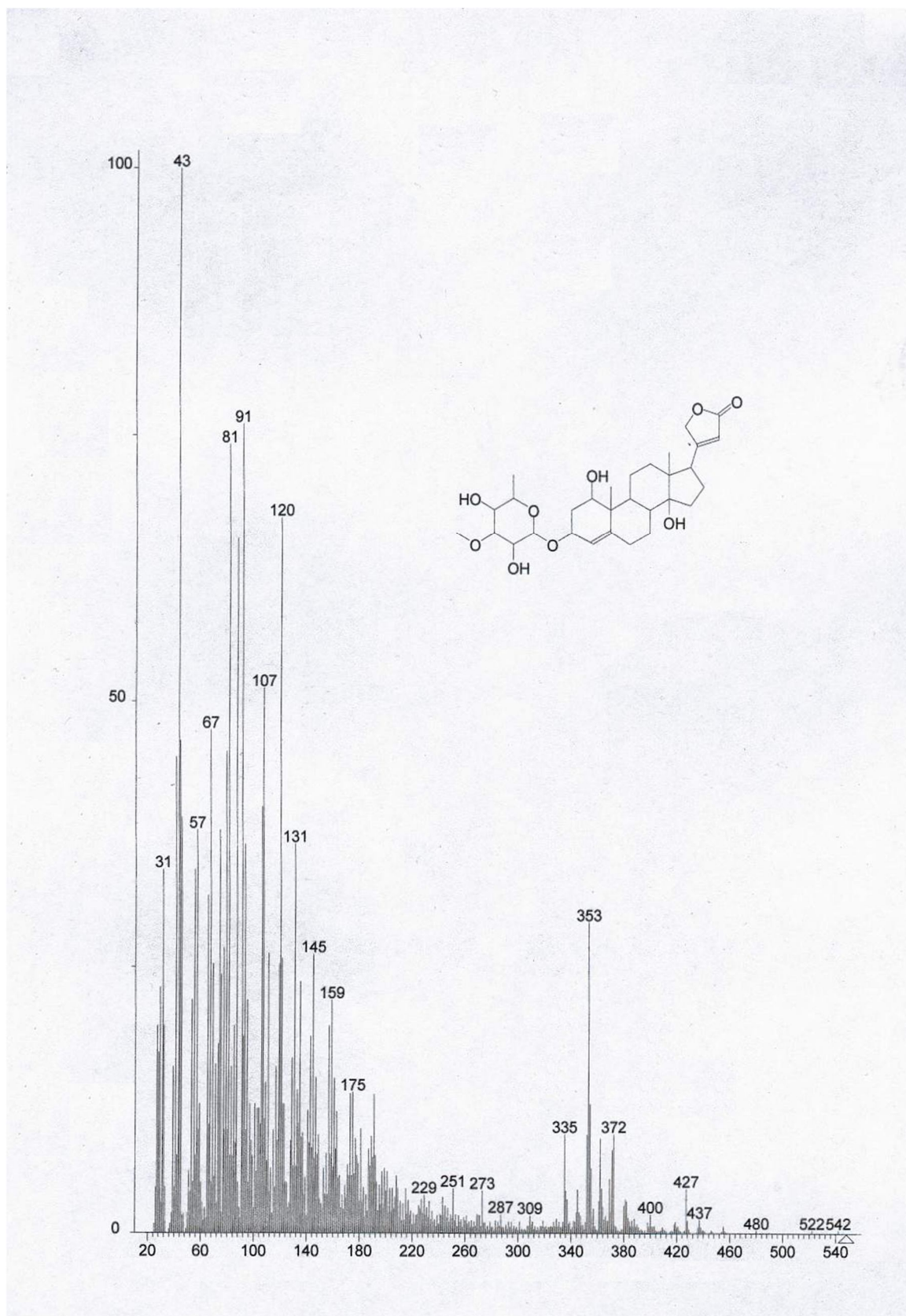


Figure 3.57 : Spectre de masse de Carda-4,20(22)-dienolide, 3-[(6-deoxy-3-O-methyl-. Alpha.-D-allopyranosyl)oxy]-1, 14-dihydroxy-, (1. beta., 3 beta)

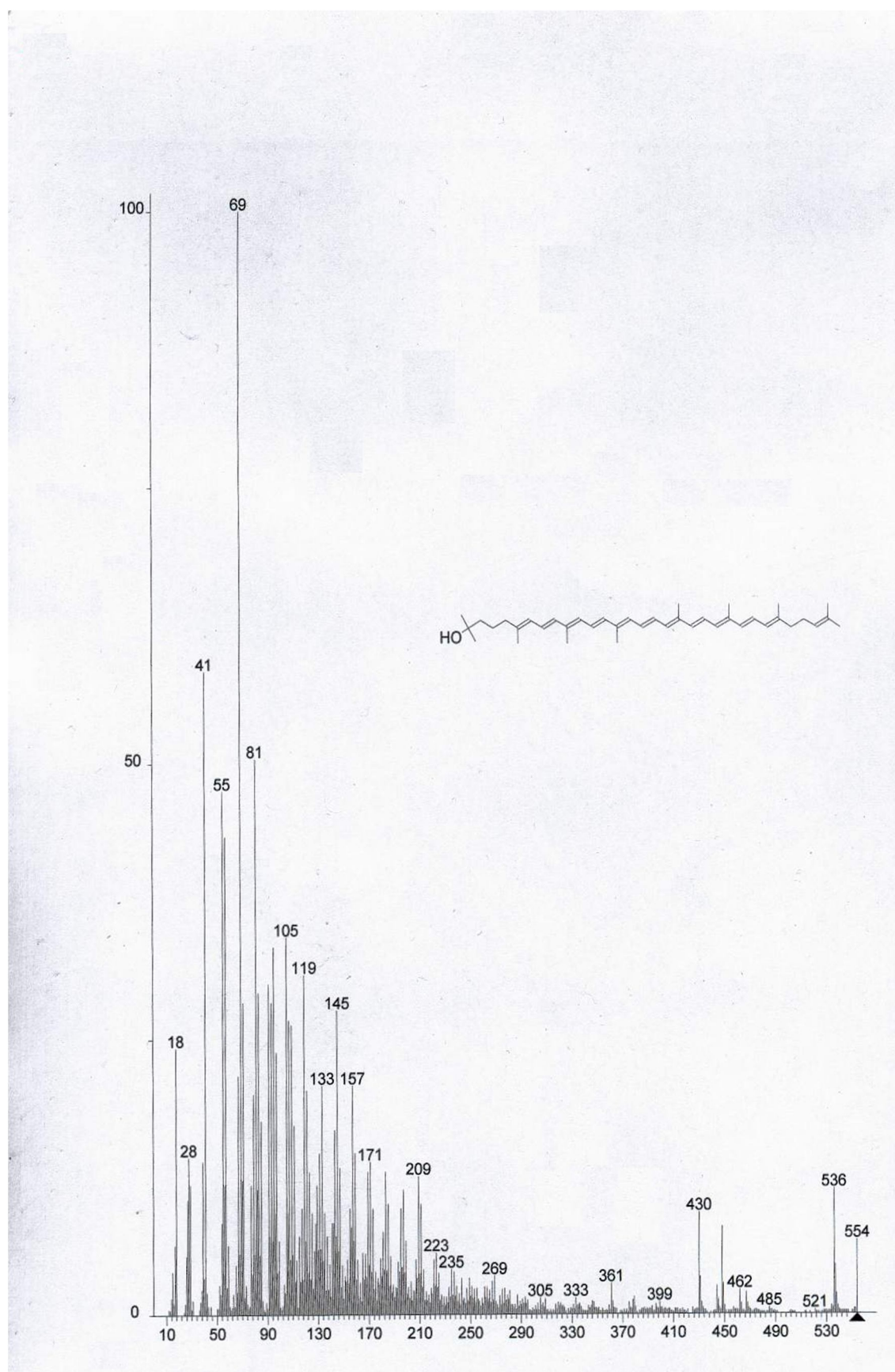


Figure 3.58 : Spectre de masse de la Lycopene, 1,2-dihydro-1-hydroxy-

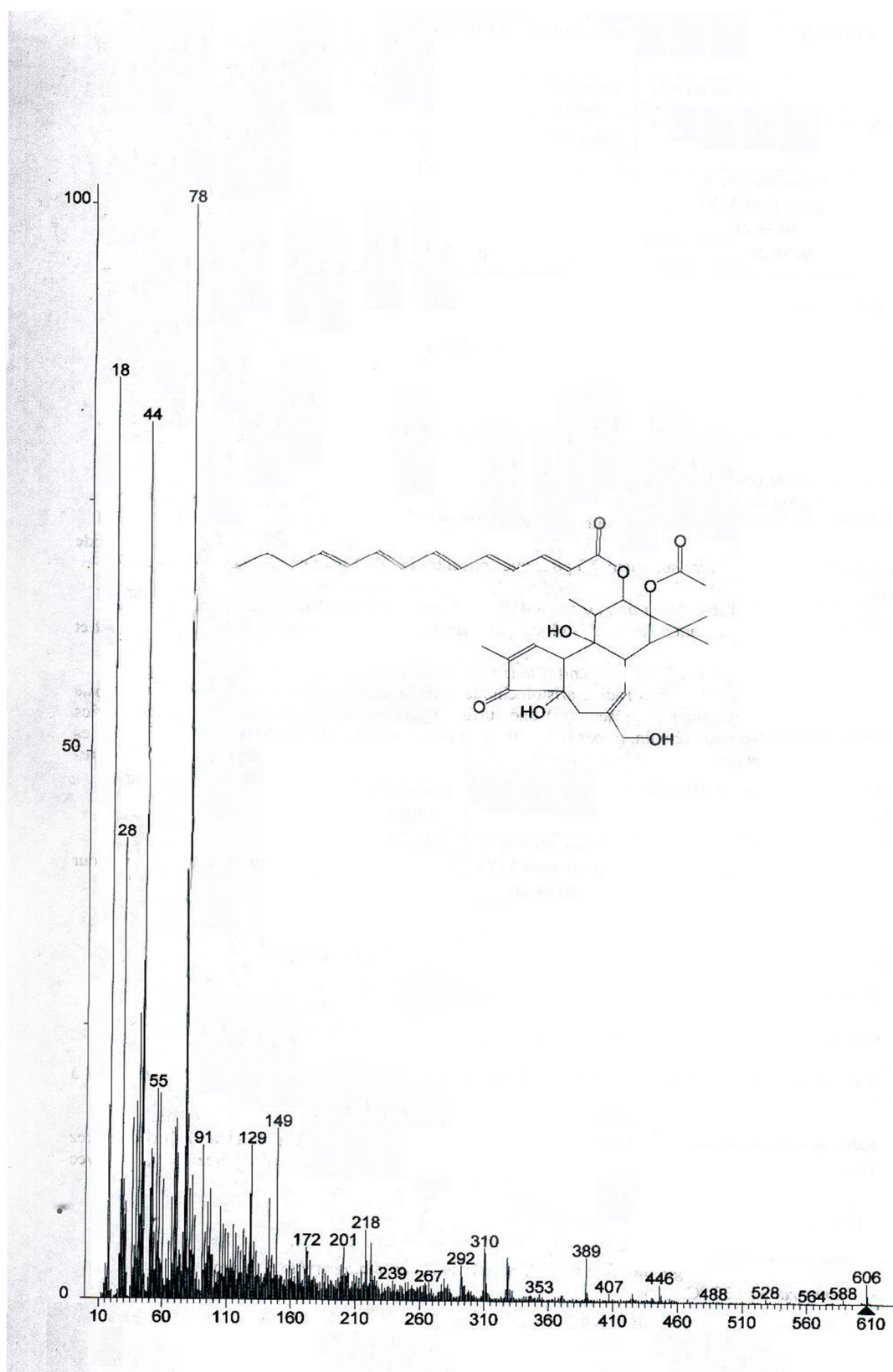
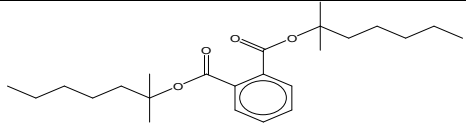
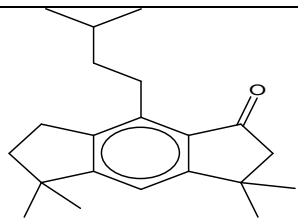
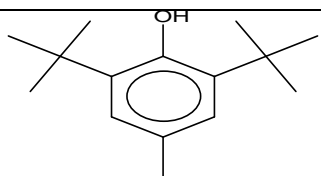
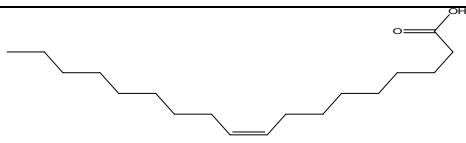
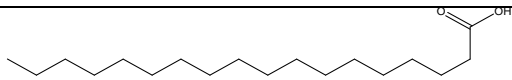


Figure 3.59 : Spectre de masse de 2, 4, 6, 8,10-Tetradecapentaénoïque, 9a-(acétoxy)-1a, 1b, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a-décahydro-4a, 7b-dihydroxy-3- ester

Composés majoritaires	Le pic de base	Temps de rétention	Masse molaire	Formule brute des Composés	Structure chimique
Diisooctylfthalate	149	93 min	390 g·mol ⁻¹	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	
s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-	255	81 min	298 g·mol ⁻¹	C ₂₁ H ₃₀ O	
Deenaxe	205	45 min	220 g·mol ⁻¹	C ₁₅ H ₂₄ O	
Acide Oleique	41	79 min	282 g·mol ⁻¹	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	
Acide Stéarique	43	70 min	284 g·mol ⁻¹	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	

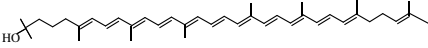
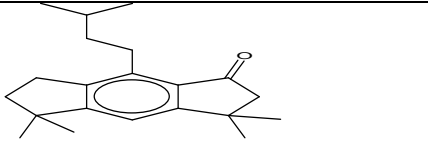
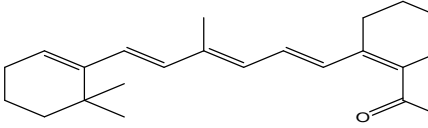
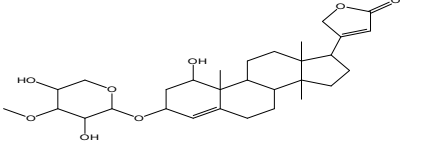
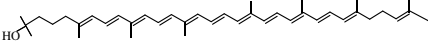
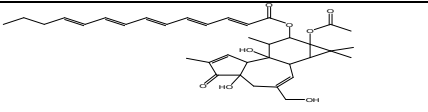
Composés majoritaires	Le pic de base	Temps de rétention	Masse molaire	Formule brute des Composés	Structure chimique
Lycopene, 1, 2-dihydro-1-hydroxy-	69	115 min	554 g·mol ⁻¹	C ₄₀ H ₅₈ O	
s-Indacen-1-(2H)-one, 3, 5, 6,7-tetrahydro-3, 3, 5,5-tetramethyl-8-(3-methylbutyl)-	255	81 min	298 g·mol ⁻¹	C ₂₁ H ₃₀ O	
2-[4-methyl-6-(2, 6, 6-trimethylcyclohex-1-enyl) hexa-1, 3, 5-trienyl] cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde.	43	113 min	324 g·mol ⁻¹	C ₂₃ H ₃₂ O	
Carda-4,20(22)-dienolide, 3-[(6-deoxy-3-O-methyl-. Alpha.-D-allopyranosyl)oxy]-1, 14-dihydroxy-, (1. beta., 3 beta)	43	116 min	548 g·mol ⁻¹	C ₃₀ H ₄₄ O ₉	
Lycopene, 1, 2-dihydro-1-hydroxy-	69	115 min	554 g·mol ⁻¹	C ₄₀ H ₅₈ O	
2, 4, 6, 8, 10- Tetradecapentaenoique, 9a-(acetoxy)-1a, 1b, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a-decahydro-4a, 7b-dihydroxy-3-ester.	78	75 min	606 g·mol ⁻¹	C ₃₆ H ₄₆ O ₈	

Tableau 3.29 : Composés majoritaires de l'huile essentielle des tubercules d'Aristolochia Longa

A partir des résultats observés, il apparaît que l'huile essentielle des feuilles contient un pourcentage important de fractions d'acides de dérivés lipidiques tel que l'acide stéarique, et oleique, faisant partie du groupe des acides gras appelés « acides gras volatils » [148] entre autres l'acide palmitique ou l'acide myristique . L'huile essentielle des feuilles, contient aussi des diterpènes et sesquiterpènes.

Par conséquent, nous supposons que le métabolisme secondaire des feuilles participe à la fructification d'*Aristolochia longa* L. Elle correspond à la période du mois de Mai. Quant à l'huile essentielle des tubercules, elle contient des diterpènes, des tetraterpènes et des triterpènes mais pas de sesquiterpènes.

Cornela et al.[149], ont trouvé que l'huile essentielle d'*Aristolochia gibertii* Hooker du Paraguay était constitué en majorité de sesquiterpènes (80%) et de monoterpènes (0.6%). De même, Francisco et al.[51] ont effectué une analyse chemométrique de l'huile essentielle des tubercules appartenant à 10 espèces d'Aristoloches originaires du Brésil. Il en ressort que l'huile essentielle est caractérisée par des monoterpènes et des sesquiterpènes.

Par ailleurs, De Pascual et al. [96] ; ont montré que l'huile essentielle extraite par l'hexane à partir des feuilles, des tiges et des tubercules d'*Aristolochia longa* L. contient des sesquiterpènes et de monoterpènes.

Nos résultats pourraient être expliqués par rapport à la méthode d'extraction utilisée et aux conditions pédo-climatiques de la région de provenance de la plante.

3.3.5. Résultats de la détermination du profil lipidique

Les résultats obtenus, portant sur la détermination de quelques acides gras présents au sein des échantillons analysés, sont illustrés par les figures 3.61 ; 3.62 et 3.63.

Ce travail concerne la fraction lipidique des concrètes extraites par Méthanol.

Il a été possible de vérifier par CCM, la présence des esters méthyliques des acides gras (Figure 3.60).

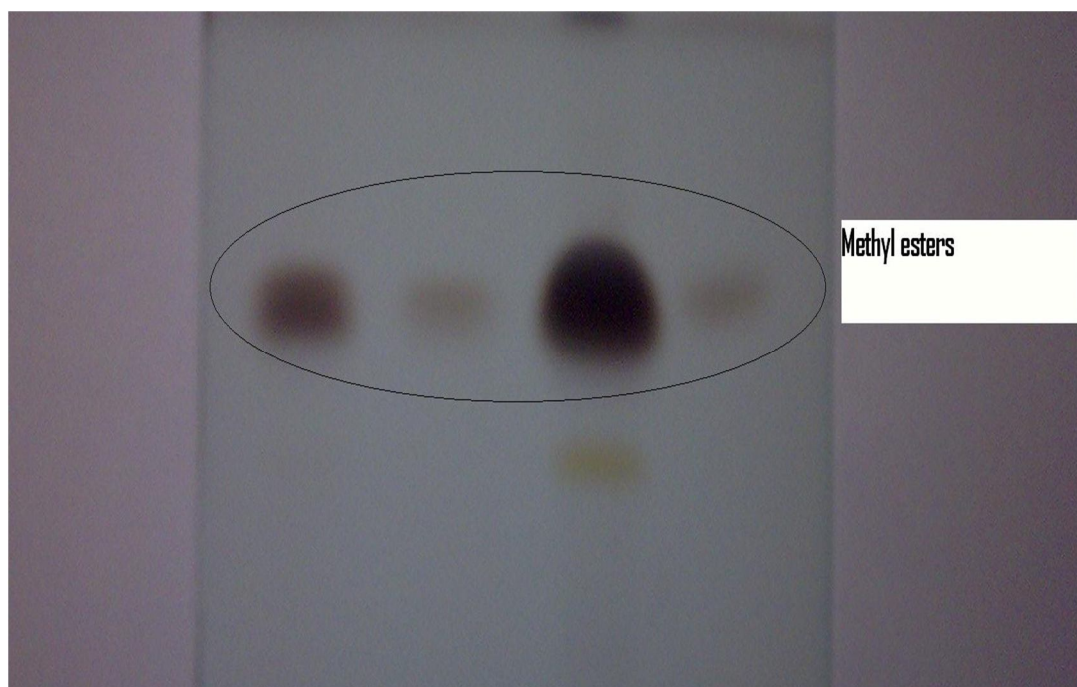


Figure 3.60 : Présence des esters méthyliques sur plaque de CCM.

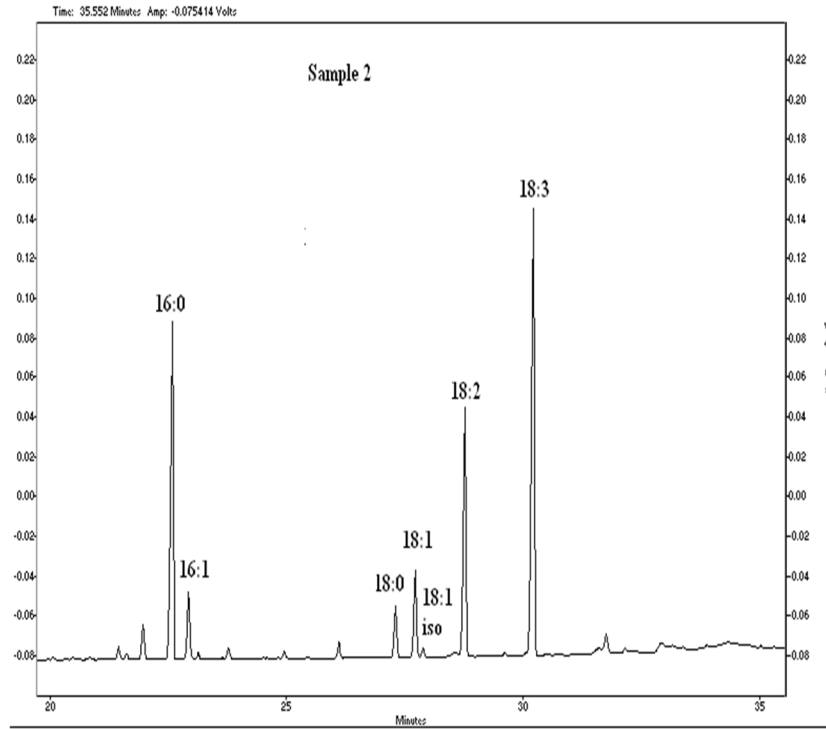


Figure 3.61 : Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des feuilles d'*Aristolochia longa* L.

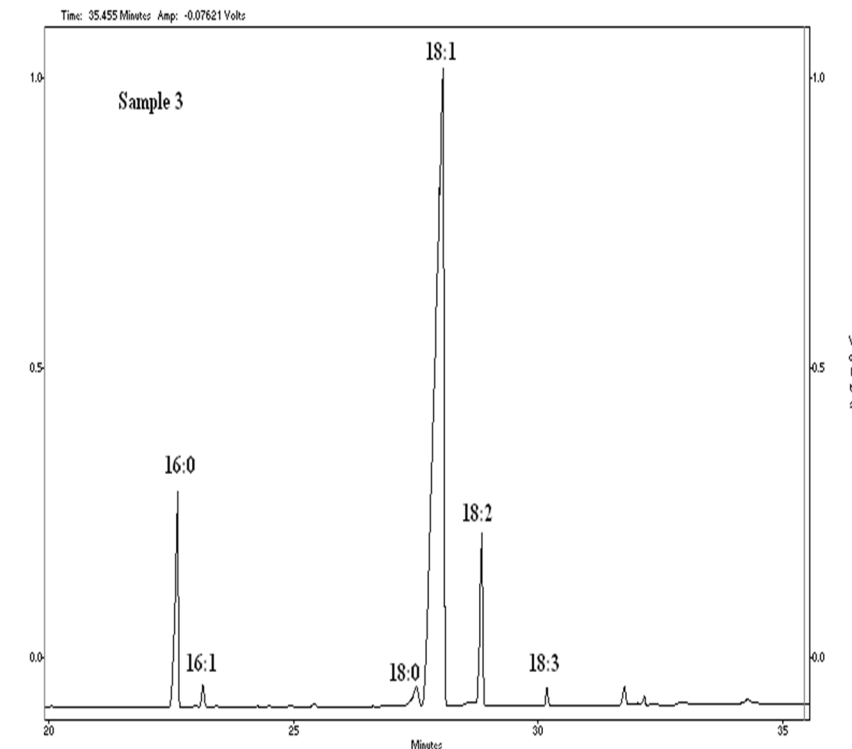


Figure 3.62 : Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des fruits d'*Aristolochia*

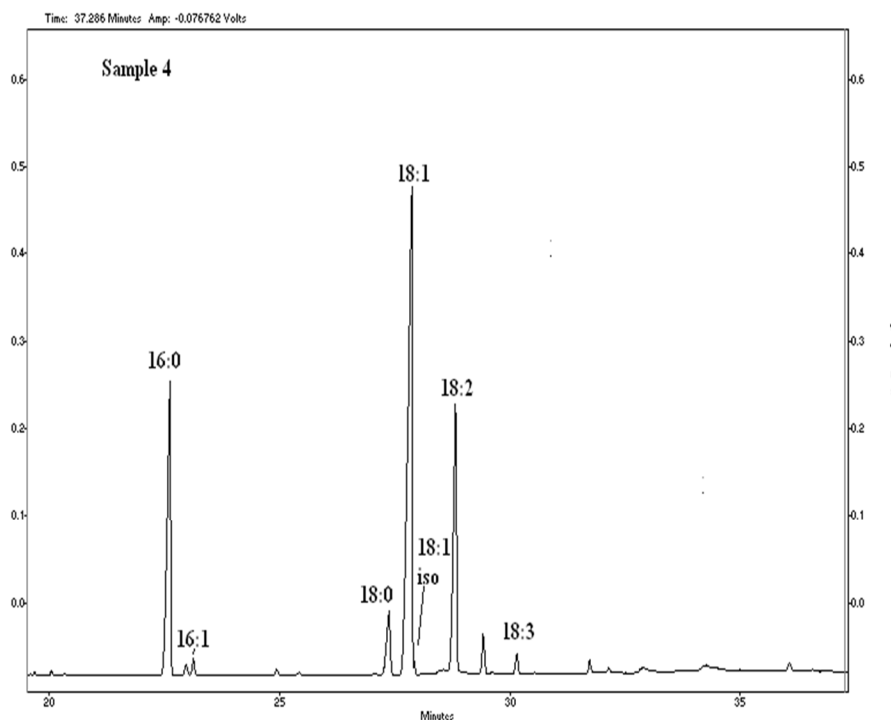


Figure 3.63: Acides gras présents dans l'extrait alcoolique des tubercules d'*Aristolochia longa* L.

Les résultats de l'analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG) des différents échantillons (tubercules, feuilles et fruits) mettent en évidence la présence de huit acides gras à des pourcentages différents. (Tableaux 3.30, 3.31 ; 3.32).

Nous remarquons, ainsi, que les feuilles sont riches en acide Linoléique (36.17%) (Omega 3) en acide palmitique (26.02) et en acide linoléique (18.14%) (Omega 6) (Tableau 3.30). Dans les fruits (Tableau 3.31), c'est l'acide oleique qui prédomine avec un pourcentage de 77.82, ensuite l'acide palmitique (10.94%), et l'acide linoléique (7.47%) cependant, le pourcentage de l'acide linoléique (0.63) est très faible par rapport à celui des feuilles.

En ce qui concerne les acides gras présents dans les tubercules (Tableau 3.32) nous remarquons que l'acide oleique se trouve à un pourcentage relativement élevé (48.61), ensuite l'acide palmitique (20.90%) et l'acide linoléique (18.54%)

Les travaux de De Pascual et *al.* [96] sur *Aristolochia longa* L. d'Espagne ont montré une teneur de 40% en acides gras libres dans la partie aérienne, dont 44% d'acide palmitique, 5% l'acide stéarique, 10% acide Oléique, 22% acide Linoléique et 19% acide Linoléinique. Dans la partie racinaire, les teneurs sont les suivantes : 22% en acide palmitique, 23% Oléique, 40% Linoléique et 13% Linoléinique.

Comparativement nos résultats concordent avec ceux obtenus par De Pascual et *al.* [96] et les pourcentages des acides gras sont assez proches.

Tableau 3.30 : Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des feuilles

No.	Acides gras	Abréviation	Pourcentage (%)
1.	Palmitique	16:0	26.02
2.	Palmitoléique	16:1	4.79
3.	Heptadecanoïque	17:0	traces
4.	Stéarique	18:0	3.73
5.	Oléique	18:1	6.21
6.	Elaidique	18:1 iso	0.64
7.	Linoléique	18:2	18.14
8.	Linoléinique	18:3	36.17

	Pourcentage (%)
A.G.S	29.75
A.G.M.I.	11.64
A.G.P.I.	54.31
AGNI: %	4.3

Le tableau 3.30, montre que l'extrait alcoolique des feuilles est riche en acides gras polyinsaturés(AGPI) représentés par les acides Linoléique (omega6) et Linoléinique (omega3), avec 54.31%. Ces derniers font partie des acides gras essentiels jouant des rôles biologiques importants telle que la fluidité des membranes cellulaires [5].

Selon Martini [151], un déficit en AGPI entraîne une peau sèche par augmentation de la perméabilité cutanée.

Tableau 3.31 : Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des fruits

No.	Acides gras	Abréviation	Pourcentage (%)
1.	Palmitique	16:0	10.94
2.	Palmitoléique	16:1	0.69
3.	Heptadecanoïque	17:0	traces
4.	Stéarique	18:0	1.70
5.	Oléique	18:1	77.82
6.	Elaidique	18:1 iso	0.45
7.	Linoléique	18:2	7.47
8.	Linoléénique	18:3	0.63

	Pourcentage (%)
A.G.S	12.64
A.G.M.I.	78.96
A.G.P.I.	8.10
AGNI : %	0.3

Dans le cas des fruits, ce sont les acides gras mono insaturés (AGMI) qui dominent (78.96) principalement l'acide oléique.

D'après Menendez et al.[152], l'acide oléique possède des propriétés encourageantes pour le traitement du cancer du sein.

Tableau 3.32 : Identification des acides gras présents dans l'extrait alcoolique des tubercules

No.	Acides gras	Abréviation	Pourcentage (%)
1.	Palmitique	16:0	20.90
2.	Palmitoléique	16:1	0.81
3.	Heptadecanoïque	17:0	traces
4.	Stéarique	18:0	4.87
5.	Oléique	18:1	48.61
6.	Elaidique	18:1 iso	0.43
7.	Linoléique	18:2	18.54
8.	Linoléinique	18:3	1.05

	Pourcentage (%)
A.G.S	25.77
A.G.M.I.	49.85
A.G.P.I.	19.59
A.G.N.I	4.79

Les tableaux 3.31 et 3.32 montrent que contrairement aux feuilles, les extraits alcooliques des fruits et tubercules sont caractérisés par des teneurs élevées en acides gras mono insaturés, respectivement de 78.96% et 49.85%.

3.3.6. Résultats des essais bactériologiques

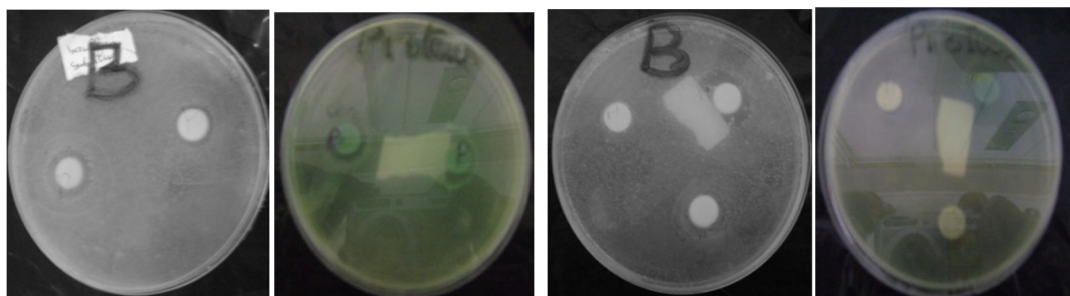
Etant donné le caractère antiseptique d'*Aristolochia longa* L., nous nous sommes intéressées à l'étude du pouvoir anti bactérien des différents extraits de la plante étudiés dans la partie phytochimique. Ainsi, nous avons testé le pouvoir antibactérien aussi bien de l'acide aristolochique purifié après maturité des graines (Figure 3.64 b) que l'extrait alcoolique (Figure 3.64 a) d'*Aristolochia longa* L. récoltée en 2007. Les résultats de ce test sont récapitulés dans le tableau 3.33.

Tableau 3.33 : Activité antibactérienne de la concrète alcoolique et de l'acide aristolochique (purifié après maturité des graines)

Les souches bactériennes	concrète	Ac Ar
<i>Bacillus subtilis</i>	13 mm	15 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 mm	15 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14 mm	-
<i>Proteus vulgaris</i>	15 mm	15 mm
<i>Pseudomonas ssp</i>	-	-
<i>Serratia marcesens</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 mm	14 mm

Les résultats montrent que parmi les 09 souches testées, l'acide aristolochique est éventuellement actif sur 4 souches.

La concrète alcoolique a presque le même spectre que l'acide aristolochique purifié. Nous remarquons qu'elle est active sur *Staphylococcus epidermidis* et sur toutes les bactéries sensibles à l'acide aristolochique (Figure 3.64).



a / Concrète alcoolique

b / Acide aristolochique

Figure 3.64 : Résultats du test antibactérien

L'effet antibactérien a été repris pour les échantillons de 2008, aussi bien sur les poudres des tubercules et des feuilles ainsi que sur l'huile essentielle des feuilles. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux : 3.34, 3.35 et 3.36.

Tableau 3.34 : Les diamètres des zones d'inhibition des feuilles d'*Aristolochia longa* L.

	Solution mère	Dilution $\frac{1}{2}$	Dilution $\frac{1}{4}$	Dilution $\frac{1}{8}$	Dilution $\frac{1}{16}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.7	11.8	9.8	8.8	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	13	11.4	8.6	8.2	–
<i>Escherichia coli</i>	-	-	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11.4	10.2	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–

D'après le tableau 3.34, nous constatons que l'effet inhibiteur des solutions préparées à partir de la poudre des feuilles est en rapport avec leur dilution.

En effet, avec la solution mère nous avons des diamètres d'inhibition allant de 11.4 à 13 mm, par contre avec la dilution $\frac{1}{8}$ les diamètres d'inhibition sont les plus faibles. L'extrait des feuilles d'*Aristolochia longa* L. a un effet sur : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Saccharomyces cerevisiae*, qui sont des Gram positif.

Tableau 3.35 : Les diamètres des zones d'inhibition des tubercules d'*Aristolochia longa* L.

	Solution mère	Dilution $\frac{1}{2}$	Dilution $\frac{1}{4}$	Dilution $\frac{1}{8}$	Dilution $\frac{1}{16}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.4	15.2	11.2	10.6	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	17	14.4	12.2	10	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–

Tableau 3.36 : Les diamètres des zones d'inhibition des fruits d'*Aristolochia longa*

	Solution mère	Dilution $\frac{1}{2}$	Dilution $\frac{1}{4}$	Dilution $\frac{1}{8}$	Dilution $\frac{1}{16}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.2	19.2	17	15.4	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.2	11.8	10.8	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	16.6	14.7	12.5	10	8.8
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–

Les tableaux 3.35 et 3.36 regroupent les diamètres des zones d'inhibition des extraits des fruits et tubercules.

Concernant les tubercules nous remarquons, qu'ils ont un effet uniquement sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Il semblerait que les autres bactéries soient résistantes aux solutions contenant la poudre de tubercules.

Dans le cas des fruits d'*Aristolochia longa L.* nous constatons, que la solution mère, ainsi que les différentes dilutions, exercent un effet inhibiteur sur 3 souches : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, et *Bacillus subtilis* avec un effet remarquable dans le cas de la solution mère.

Tableau 3.37 : Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Aristolochia longa L.*

	Solution mère	Dilution $\frac{1}{2}$	Dilution $\frac{1}{4}$	Dilution $\frac{1}{8}$	Dilution $\frac{1}{16}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.4	16.8	12.8	9.8	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	26.1	25.6	21.8	21.6	15
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28.6	26	23.4	20.2	16.8
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–

Le tableau 3.37, nous permet d'observer et de constater une forte activité inhibitrice de l'huile essentielle d'*Aristolochia longa* L., extraite à partir des feuilles. L'inhibition est surtout importante sur *Saccharomyces cerevisiae*, avec un diamètre de 28.6 mm pour la solution mère, et nulle sur *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Staphylococcus epidermidis*.

Une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été mise au point par Meena et Sethi [153] ; Keshavarz et al.[154], classant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 4 classes :

- L'huile essentielle est fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28mm.
- Modérément inhibitrice lorsque : $28\text{mm} > \text{ØZI} > 16\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice lorsque : $16\text{mm} > \text{ØZI} > 10\text{mm}$
- Non inhibitrice lorsque : $\text{ØZI} < 10\text{mm}$

En suivant cette échelle, nous déduisons que l'huile essentielle d'*Aristolochia longa* L., extraite des feuilles est modérément inhibitrice, selon la souche bactérienne et la dilution utilisée.

En outre, nous notons que la poudre des feuilles et les huiles essentielles extraites à partir des feuilles ont une action inhibitrice sur la croissance des mêmes souches à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et *Saccharomyces cerevisiae*). Nous remarquons aussi que l'action des différentes poudres utilisées sur la croissance des souches bactériennes, varie selon la nature de la poudre, ou suivant sa concentration en principes actif.

A partir des différents tableaux (3.34, 3.35, 3.36, et 3.37), nous constatons que les feuilles d'*Aristolochia longa* L., ainsi que l'huile essentielle ont une action inhibitrice surtout sur *Saccharomyces cerevisiae* contrairement aux extraits de fruits et tubercules. Ceci est dû probablement à la période de récolte des feuilles (le mois de mai). Ces dernières emmagasinent les principes actifs tels que les acides aristolochiques.

Globalement, nous constatons que les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits d'*Aristolochia longa* L. des deux années sont similaires, en ce qui concerne les mêmes bactéries.

3.3.7. Résultats des essais de culture *in vitro*

3.3.7.1. Stérilisation du matériel végétal

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate. Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet :

- Eviter l'infection due à la propagation des bactéries et des champignons,
- Eviter le traumatisme des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose [153].

En tenant compte du type et de l'origine de la contamination, nous avons tenté d'établir un protocole expérimental basé sur les travaux qui ont été réalisés dans le domaine de la culture *in vitro* surtout concernant les plantes herbacées.

Deux désinfectants ont été utilisés avec une variation des concentrations en hypochlorite de calcium et de chlorure mercurique. Les résultats obtenus, sont illustrés dans la figure 3.65 :

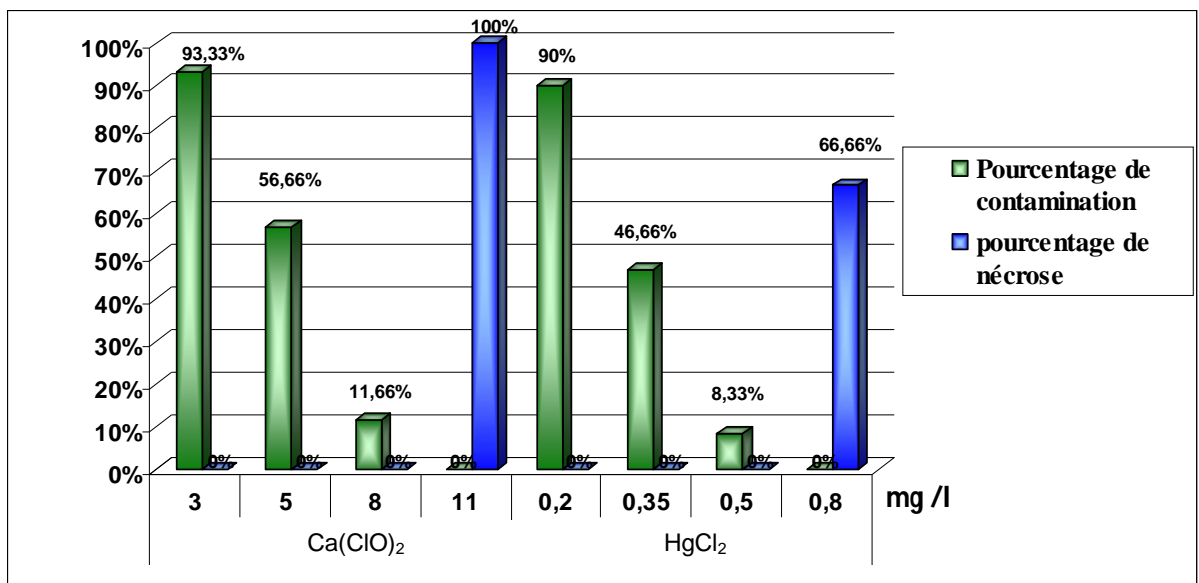


Figure 3.65 : Effet de Ca(ClO)₂ et HgCl₂ sur le taux de contaminations

Ainsi, les résultats montrent que le taux de contamination peut diminuer jusqu'à 8.33 %, par l'utilisation de HgCl_2 à 0.5 mg/l pendant 10 minutes. L'hypochlorite de calcium à 8 mg/l pendant 15 minutes peut abaisser le taux de contamination jusqu'à 11,66 %.

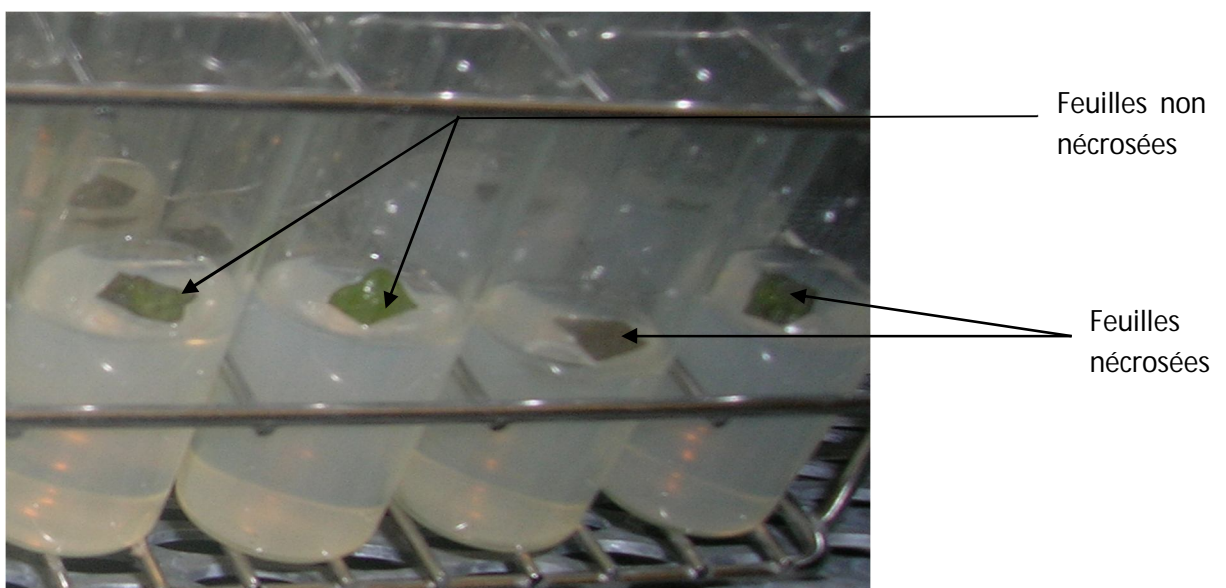
Nous avons remarqué aussi que toutes les contaminations d'origine fongique ont pu être maîtrisées au fur et à mesure de l'expérimentation, soit par l'utilisation de HgCl_2 ou $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

Cependant, les contaminations bactériennes persistent et semblent être difficiles à éliminer lors de l'utilisation de l'hypochlorite de calcium. Au contraire, avec le chlorure mercurique, nous avons pu les contrôler et le taux de contamination a diminué d'une façon remarquable (mais sans une élimination totale).

Nous avons remarqué aussi, que le taux de contaminations (bactériennes ou fongiques) diminuait au fur et à mesure du transfert des explants d'un milieu à l'autre.

Les autres tests se sont avérés inefficaces à cause de :

- Pourcentage élevé de contaminations (93,33% pour $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ à 3 mg/l contre 90% HgCl_2 à 0.2 mg/l).
- Au niveau des fragments apparition des noircissements ayant favorisé la formation des nécroses (l'hypochlorite de calcium à doses supérieures à 8 mg/l et chlorure mercurique à 0.8 mg /l) (figure 3.66).



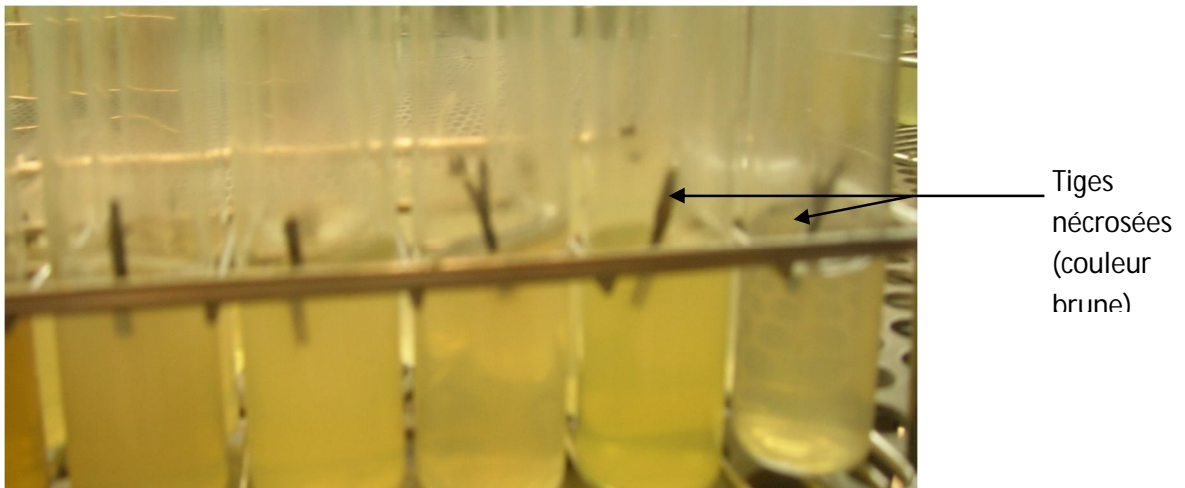


Figure 3.66 : Nécrose au niveau des fragments des feuilles et des tiges

Les travaux menés par AUGÉ *et al.* [113], GAUTHERET [154] et BAJAJ [155] sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que le chlorure mercurique est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes. Il doit être utilisé à des doses très faibles, suivi par des rinçages successifs soigneusement faits, car son élimination est difficile. Il a la possibilité de pénétrer dans les tissus, favorisant la formation de nécroses. Cela a été constaté lors de notre travail, par diminution des taux de contamination et l'apparition des nécroses au fur et à mesure que nous augmentions la concentration.

Au contraire, l'hypochlorite de calcium est utilisé à des concentrations plus élevées et des durées plus longues car il ne pénètre pratiquement pas à l'intérieur des tissus.

ZRYD [114], confirme que certains tissus peuvent héberger des parasites internes qui ne peuvent pas être éliminés par les méthodes de désinfection classique. C'est ainsi que certains contaminants peuvent ne pas se manifester avant plusieurs sub-cultures.

3.3.7.2. Micropropagation

Afin d'obtenir des plantules à partir des fragments d'*Aristolochia longa* L., nous avons tenté d'établir un protocole qui vise à obtenir des bourgeons suivant deux voies et qui sont :

- Directe, c'est le développement des bourgeons axillaires sans le passage par les cals
- Indirecte, c'est le développement des bourgeons avec passage par les cals

Oxydation phénolique :

Nous avons remarqué que les explants provenant des fragments de tige ou des feuilles, après leur introduction dans le milieu de multiplication brunissent, ainsi que le milieu environnant. Ce qui a conduit souvent à la mort des explants. Ce brunissement est dû à l'oxydation des phénols qui sont des pièges d'oxygènes. Ces substances sont appelées aussi inhibiteurs de croissance.

Ce problème a été contrôlé par l'addition d'un antioxydant au milieu de culture au moment de la préparation. Deux types d'antioxydants ont été testés :

- L'acide ascorbique à 0.1 g/l
- Le charbon actif à 1 g/l

Les deux antioxydants ont pu stopper la sécrétion des substances phénoliques.

Par ailleurs, nous avons observé que la libération des phénols est de plus en plus faible en passant d'une sub-culture à une autre.

Le brunissement des tissus isolés et cultivés *in vitro* est un phénomène connu. Il est dû à l'oxydation des phénols. Ces derniers s'oxydent très facilement en quinones.

Ce sont aussi des inhibiteurs des métabolismes qui interviennent dans de nombreux processus, soit comme des antagonistes des substances de croissance, soit comme des inhibiteurs des réactions métaboliques [113].

Ces substances sont considérées comme toxiques pour les plantes et conduisent à la mort des explants.

Ce phénomène est plus ou moins répandu. Il est en relation avec un certain nombre de facteurs :

- L'espèce : plus sévère chez les espèces qui contiennent naturellement beaucoup de tanins ou d'autres hydroxy-phénols, comme les ligneux.
- L'âge des tissus : les tissus jeunes brunissent moins que les tissus âgés et surtout ceux lignifiés [156].
- Nature du milieu : la nature du milieu de culture s'est révélée comme étant un facteur important. Selon BOXUS et *al.* [157], les explants de carotte survivent mieux en milieu liquide contenant des antioxydants que dans un milieu solide de même composition. Le manque d'oxygène réduit le potentiel de réduction de la solution (oxydation plus lente).
- Les substances de croissance : En général, la sécrétion des phénols est plus importante dans les milieux contenant des cytokinines. Ces dernières sont connues comme des stimulateurs de la synthèse des composés phénoliques. Par contre, les auxines possèdent un effet bloquant aux synthèses des phénols, les explants ont tendance à brunir moins [158].

3.3.7.2.1 Organogenèse directe

3.3.7.2.1.1. Phase de multiplication

Les fragments de tige de 1 cm de longueur présentant au moins un nœud, sont mis en culture après stérilisation. Le milieu de culture de base est celui de MURASHIGE et SKOOG [131] additionné à des hormones de croissance. Les échantillons sont introduits dans la chambre de culture où la photopériode est réglée pour 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

Nous avons testé plusieurs combinaisons hormonales pour favoriser le développement des méristèmes préexistés.

- Effet de BAP avec les auxines :

Nous avons utilisé des milieux contenant la cytokinine (BAP) et les auxines (AIA, AIB, ANA, 2,4-D) à différentes concentrations.

Les milieux utilisés sont :

- M₁ : Sans hormones (témoin)
- M₂ : 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l AIB
- M₃ : 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l AIA
- M₄ : 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA
- M₅ : 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l 2,4 -D
- M₆ : 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.67 :

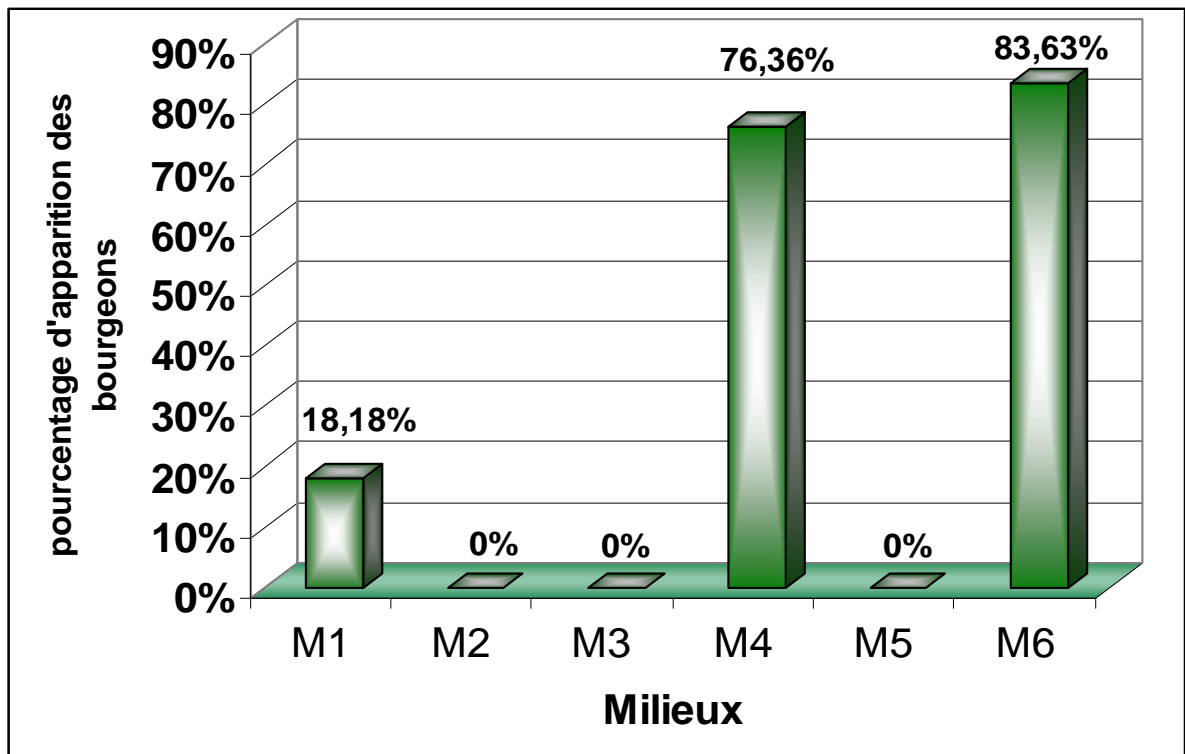


Figure 3.67 : Effet des combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons

Ces résultats sont obtenus après 6 mois de culture. Ils montrent qu'une seule combinaison hormonale est favorable au développement des bourgeons, BAP / ANA. Le reste des combinaisons semble inefficace au bourgeonnement.

Le milieu sans hormone qui est utilisé comme témoin est favorable aussi au développement des bourgeons mais avec un taux très faible de 18 %.

Nous avons remarqué aussi qu'après 10 jours, les explants qui ont été mis en culture dans le milieu M₆ commençaient à pousser (figure 3.67).

Les explants du milieu M₄ n'ont donné des résultats qu'après 20 jours de culture. Cette variation remarquable du temps de développement des bourgeons peut être due à l'augmentation de la concentration de BAP à 1.5 mg/l qui a un effet favorable sur le débourrement.

- Effet de la kinétine avec les auxines :

Quatre milieux ont été utilisés avec des combinaisons hormonales comportant la kinétine et quatre types d'auxines. Les milieux sont les suivants :

M₁ : Sans hormone (témoin)

M₇ : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l AIB

M₈ : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l AIA

M₉ : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l ANA

M₁₀ : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l 2,4-D

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 3.68

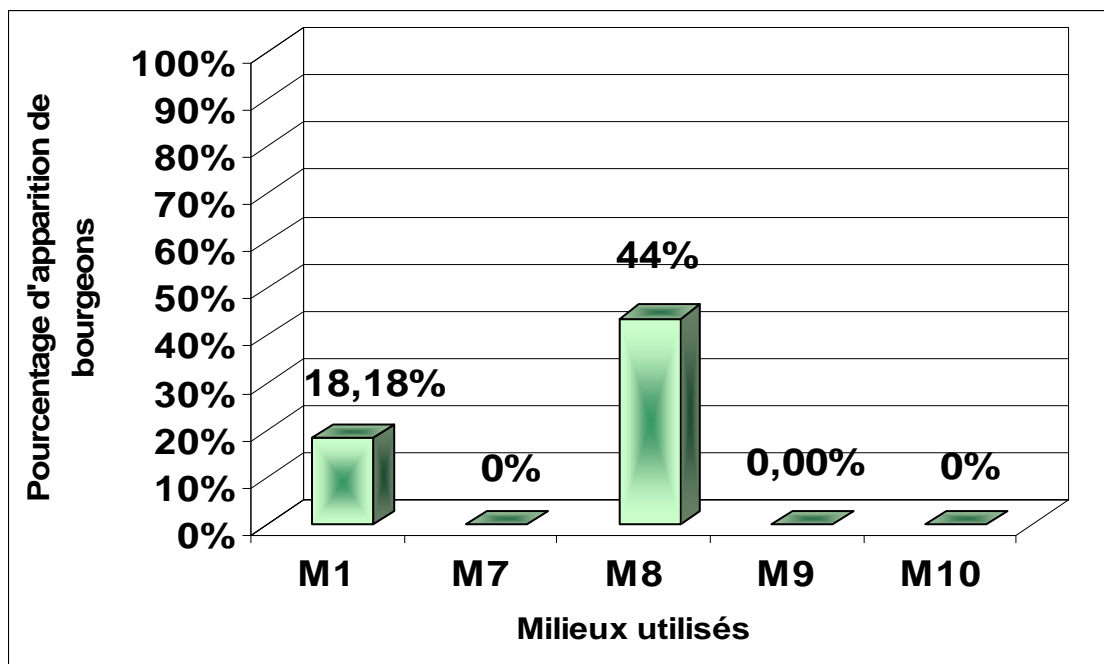


Figure 3.68 : Effet des combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons

Les observations ont été recueillies sur une période de 6 mois.

Ainsi, les résultats ont montré que parmi les quatre combinaisons hormonales utilisées seule la kinétine à 1 mg/l et AIA à 0.5 mg/l a pu déclencher le débourrement des bourgeons, mais avec un pourcentage plus faible 43.69% que celui du milieu M₄ (BAP/ANA).

Selon MARGARA [118], les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistés.

Ces mêmes résultats ont été observés par les travaux d'AUGE et *al.* [113], qui montra que la concentration élevée de BAP additionnée aux auxines favorise la prolifération des bourgeons.

Pratiquement nous pouvons admettre, que selon SKOOG [132], le comportement physiologique de l'explant mis en culture évoluera vers un fonctionnement caulogène lorsque le rapport de l'auxine /cytokinine est élevé. SELVAKUMAR [159] a montré que le milieu de base qui favorise la micropropagation d'*Aristolochia indica* est le MS additionné à la BAP ou la kinétine.

- Multiplication par fragmentation des vitro-plants obtenues à partir de fragments de tige et l'apex :

Après 30 jours de la mise en culture (introduction primaire), les vitro-plants développés (figure 3.69) indemnes de toutes infections et comportant au moins 5 nœuds (figure 3.70) sont fragmentés en micro-boutures de 1 cm de longueur.

Les micro-boutures ainsi obtenues sont transférées sur le même milieu frais dont sont issues leurs plante-mères et seront à leur tour fragmentées après 20 à 30 jours.

Par ailleurs, nous remarquons que certains explants développent des ramifications qui prennent naissance à partir du bourgeon axillaire à la base. Ces ramifications ne présentent pas un bon allongement, ce qui rend leurs séparations difficiles (figure3.71).

La réponse aux régulateurs de croissance est fort variable selon la plante.

Dans le cas de l'espèce *Aristolochia fimbriata*, l'utilisation de la cytokinine BAP à 1 mg/l seule est suffisante pour induire le développement des bourgeons [160]. Le même résultat est observé pour l'espèce *Aristolochia canadense*. [161]

En outre, AUGE et *al.* [113] rapportent que les tissus et les plantules cultivées *in vitro* présentent une certaine variabilité de croissance d'une culture à l'autre. Ainsi le taux de multiplication et l'intervalle de temps qui sépare deux repiquages peuvent être variables.

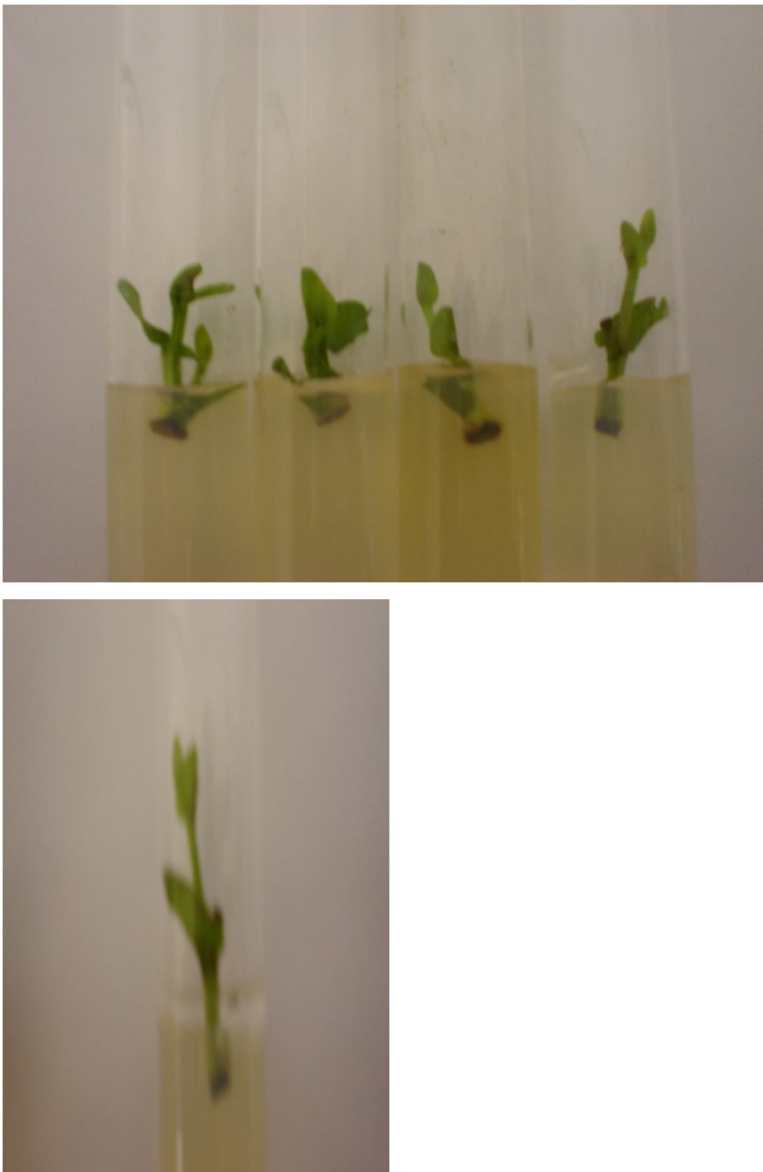


Figure 3.69: Développement des bourgeons après 10 jours d'introduction dans le milieu M₆



Figure 3.70 : Vitro-plant développé

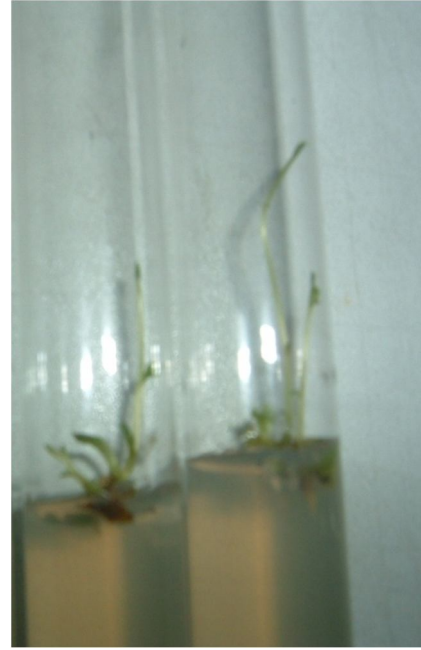


Figure 3.71 : Pousses ramifiés

- Phase d'élongation :

Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige :

Cette partie a été réalisée sur le milieu M₆ (1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA) de multiplication qui a donné le taux le plus élevé dans la néoformation des bourgeons.

Après un mois de culture, les vitro-plants *d'Aristolochia longa* L. qui présentent un bon allongement sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial (M₆). Ce repiquage successif est répété 4 fois.

En effet, nous avons remarqué que l'allongement moyen de la tige est nettement plus élevé à la première sub-culture (SbC₁) avec 4.2 cm par rapport aux autres sub-cultures qui présentent des valeurs de 3.5 cm pour la sub-culture 2 (SbC₂), 2.8 cm pour la sub-culture 3 (SbC₃) et 2.4 cm pour la sub-culture 4 (SbC₄).

La culture primaire (Cp) présente, quant à elle, la plus faible valeur qui est de 1.80 cm (figure 3.72).

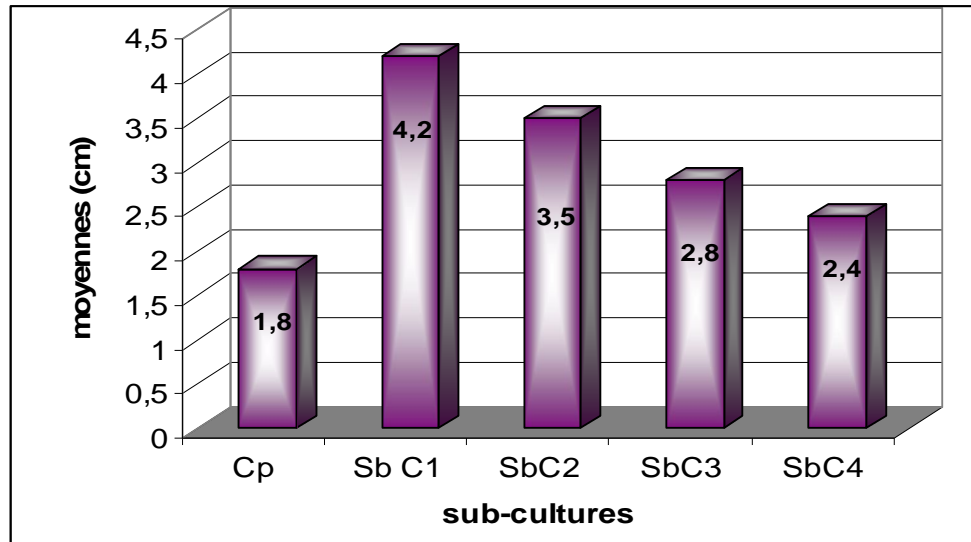


Figure 3.72 : Effet des sub- cultures sur l'allongement moyen de la tige

Les micro-boutures, après avoir eu un développement très rapide au cours des deux premières semaines, subissent un ralentissement de l'élongation dans la troisième semaine puis un arrêt plus ou moins important de la croissance. Ce qui nous a amené à faire des transferts fréquents dès l'apparition d'un dessèchement du milieu de culture, sur le même milieu frais.

Nous avons considéré que cela pourrait être dû à l'épuisement des constituants du milieu de culture.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'il y a une perte de l'aptitude à la caulogénèse d'une sub-culture à l'autre.

Diverses hypothèses ont été émises sur les causes de ce déclin progressif de l'organogénèse

- L'hypothèse génétique proposé par WRIGHT ET NORTHCOTE [162] met en cause principalement des variations du nombre chromosomique (polyploïde, aneuploïdie) souvent observées en culture *in vitro*.

Cependant, les travaux qui ont été menés par SACRISTAN ET MELCHERS [163] sur le Tabac, ont montré que l'altération du caryotype n'entraîne pas toujours l'inaptitude à l'organogenèse.

- L'hypothèse physiologique, qui n'exclut d'ailleurs pas la précédente, fait intervenir la perte de facteurs endogènes, hormonaux ou trophiques [118].

Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige :

Pour faciliter la séparation des pousses et leurs passages en enracinement, nous avons essayé d'améliorer leurs allongements.

Pour cela, les pousses ramifiées, ont été transférées sur des milieux d'allongements.

Le milieu de base utilisé est celui de MS [127] additionné au GA₃ et BAP à différentes concentrations. Les milieux sont :

M₁ : MS + sans hormones (témoin)

M₂ : MS + 1 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l BAP

M₃ : MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l BAP

M₄ : MS + 1.5 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l BAP

M₅ : MS + 1 mg/l GA₃.

Un contrôle continu des vitro-plants et des mesures de leurs allongements ont été effectués chaque semaine. Après 40 jours de la première introduction dans différents milieux (figure 3.73), les résultats obtenus ont montré que, le meilleur milieu d'allongement est celui de M₄ avec une longueur des vitro-plants qui peut atteindre en moyenne 9.2 cm suivi par le milieu M₂, avec 6.2 cm. Le reste des milieux présentent un allongement presque identique avec 4.9 cm pour M₁, 4.5 cm pour M₃ et 5.45 cm pour M₅.

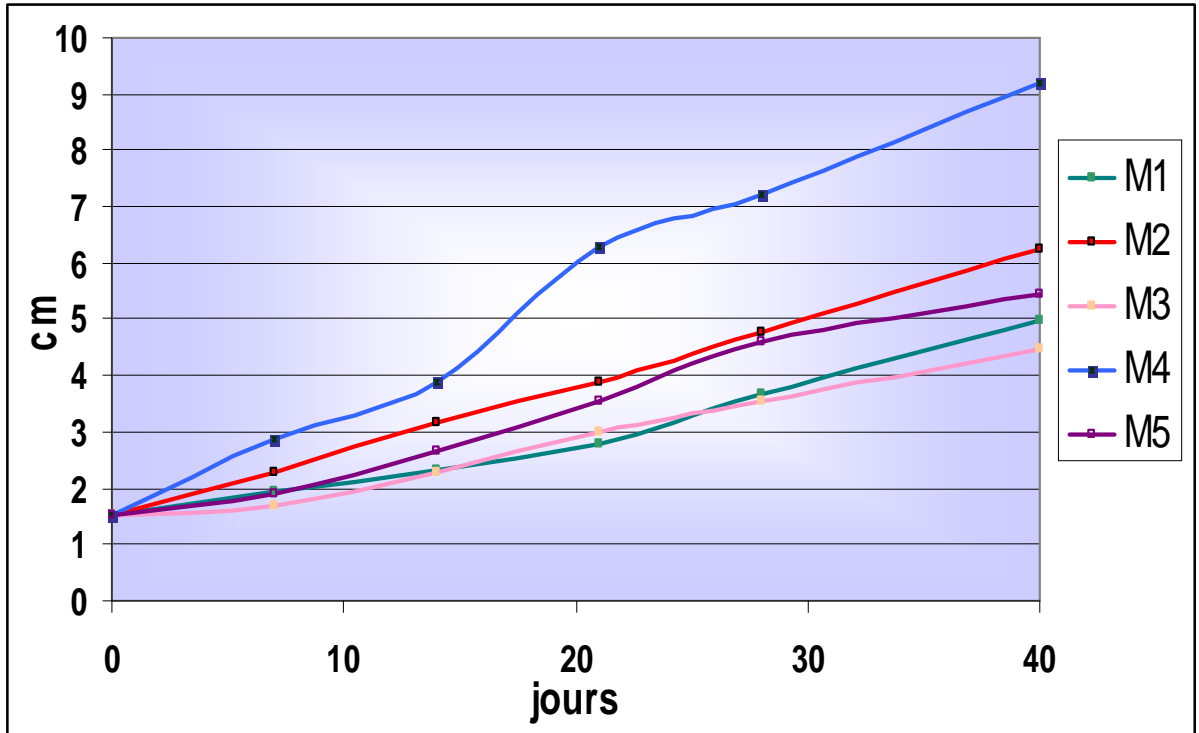


Figure 3.73: Effet de combinaison hormonale sur l'élongation

L'analyse de la variance effectuée après 40 jours de repiquage dans les milieux d'élongation (Tableau 1 App C), au risque $\alpha = 0.05$, révèle un effet significatif des milieux testés sur l'allongement moyen des vitro-plants. Le test de NEWMAN et KEULS, fait apparaître 4 groupes homogènes (tableau 3.38).

Les milieux M_1 et M_3 composent un groupe homogène c'est-à-dire ne présentant pas une différence significative entre eux. La même remarque concerne le milieu M_1 et M_5 . En plus, le milieu M_2 représente un groupe seul. Cependant, le milieu M_4 , apparaît être le meilleur milieu utilisé, avec une moyenne très élevée par rapport aux autres groupes. Les résultats s'avèrent affirmatifs.

Tableau 3.38 : Effet de gibbérelline sur la longueur moyenne de la tige

Milieu	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Moyenne (cm)	4.97 ± 0.67	6.27 ± 0.79	4.47 ± 0.39	9.20 ± 0.54	5.45 ± 0.88
Intervalle de confiance	[4.26 - 5.67]	[5.43 - 7.09]	[4.05 - 4.87]	[8.62 - 9.77]	[4.52 - 6.37]
Groupe homogène	A-B	C	A	D	B

D'après MARGARA [118] le milieu de MS est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH_4^+) et une concentration élevée en potassium (K^+). Ces deux composants, interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire. Ceci explique la capacité de certaines espèces à se développer et s'allonger après le repiquage dans un milieu MS sans hormone.

Egalement, les travaux de QUOIRIN [164] et DRUART [165] ont montré que, dans de nombreux cas, il suffit de laisser grandir suffisamment les plantules sur le milieu de multiplication avant de les faire passer en enracinement. Si la séparation des vitro-plants est difficile, on permet leur allongement en les cultivant sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de GA_3 .

MOREL et MULLER [166] ont utilisé l'acide gibbérellique pour favoriser l'élongation *in vitro* de certaines espèces, c'est l'un de leurs effets physiologiques les plus fréquents. Leur action s'exerce au niveau de la zone méristématique subapicale en favorisant l'élongation des entre-nœuds de la tige.

Par ailleurs, AUGÉ et *al.* [113] affirment que la GA_3 est active pour de nombreux méristèmes qui, en son absence, présentent un aspect globuleux fait d'empilement de nœuds. Mais dans le domaine de l'organogenèse, les gibbérellines se montrent antagonistes. Il semble qu'elles s'opposent au phénomène de dédifférenciation. C'est pour cette raison, qu'elles ne peuvent être utilisées à cette fin, mais elles trouveront leur emploi pour des explants déjà organisés.

- Phase d'enracinement :

L'induction des racines est réalisée sur le milieu de base MS.

M₁: Témoin sans hormones

M₂: 0.5mg/l GA_3 + 1mg/l 2.4 D

M₃: 0.5 mg/l GA_3 + 1 mg/l ANA

M₄: 0.5 mg/l GA_3 + 1 mg/l AIA

M₅: 0.5 mg/l GA_3 + 1mg/l AIB

Les observations ont été faites sur deux périodes, après 9 jours de transfert dans le milieu d'enracinement et après un mois de culture.

Les résultats sont illustrés par la figure 3.74.

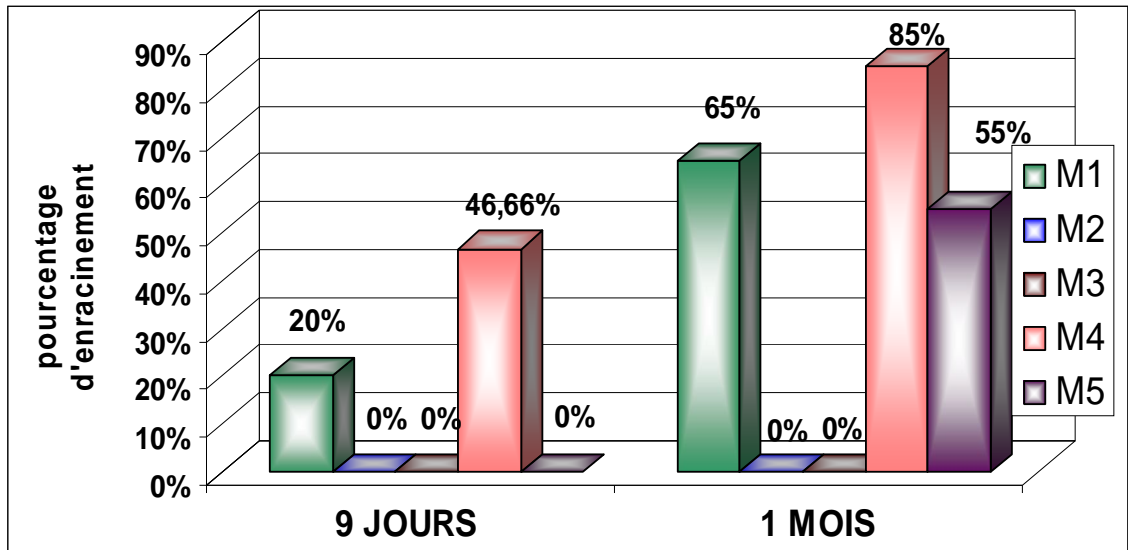


Figure 3.74 : Effet des combinaisons hormonales sur l'enracinement

Après 9 jours de transfert sur le milieu d'enracinement, nous constatons que les milieux M₂, M₃ et M₅ contenant respectivement GA₃ à 0.5 mg/l additionné à 1 mg/l de 2-4 D, ANA, AIB, n'ont aucun effet. Cependant sur le milieu M₁ sans hormone 20% les vitro-plants ont donné des racines.

Le milieu M₄ contenant 0.5 mg/l de GA₃ et 1 mg/l de AIA a provoqué l'enracinement de presque la moitié des micro-boutures (46.66%). C'est le meilleur milieu d'enracinement noté après 9 jours.

Après un mois, nous avons constaté que, les milieux M₂ et M₃ ne favorisent pas l'induction de la rhizogenèse, mais l'allongement des vitro-plants se continue. En ce qui concerne le milieu M₁, le pourcentage des micro-boutures ayant émis des racines a augmenté et a atteint 65% (figure 3.75 et 3.76).

Il faut toutefois, signaler que les micro-boutures qui n'ont pas réagi après 9 jours de repiquage dans le milieu M₅, émettent des racines pour la moitié des échantillons (55%) après 21 jours.

Pour le milieu M₄, il reste toujours le meilleur milieu d'enracinement testé après 21 jours et où le taux d'enracinement est augmenté et atteint 85%.

Pour le milieu M₄, il reste toujours le meilleur milieu d'enracinement testé après 21 jours et où le taux d'enracinement est augmenté et atteint 85%.

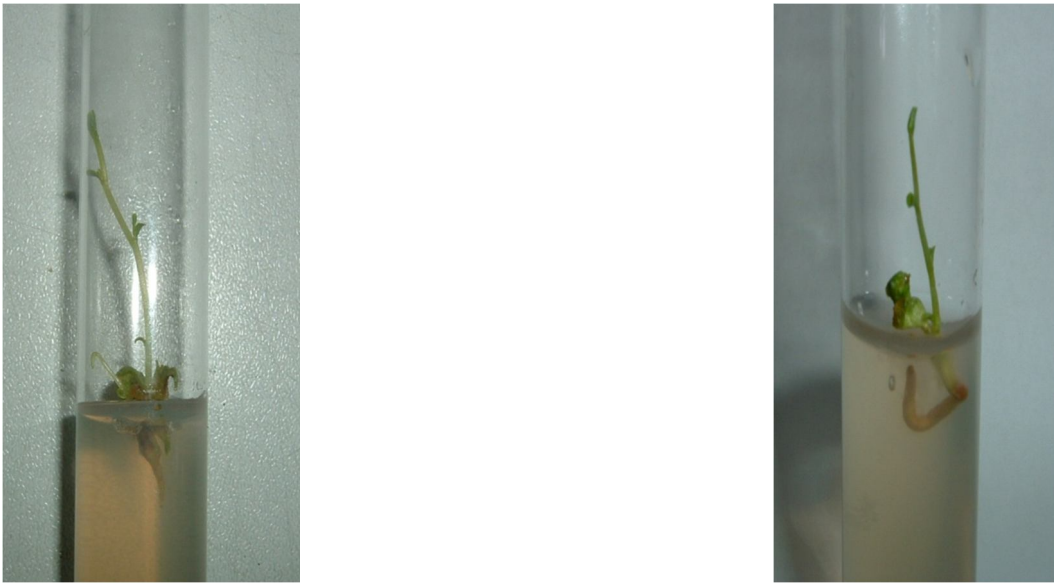


Figure 3.75: Plantules enracinées issues d'organogenèse directe

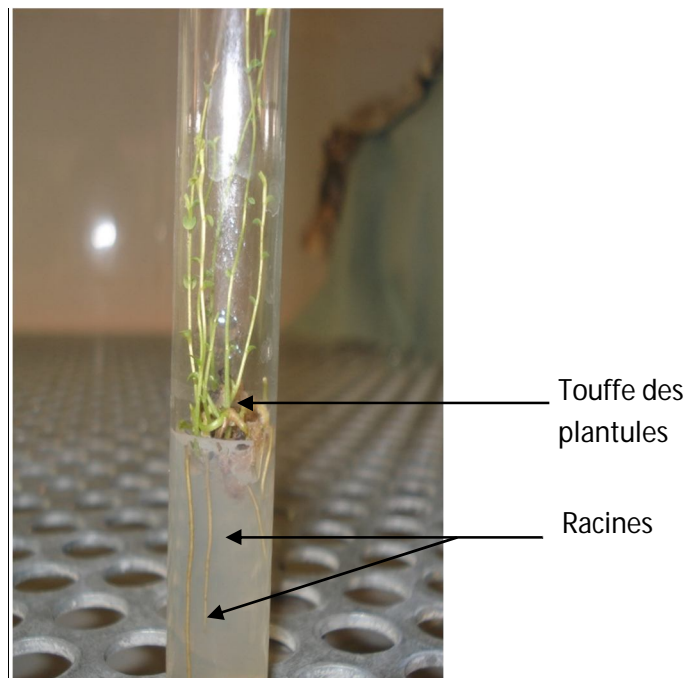


Figure 3.76 : Touffe des plantules enracinées issues d'organogenèse directe

Dans la culture *in vitro*, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition des auxines dans les milieux de culture. Selon MARGARA [118] et GALLAIS [167], les hormones de croissance les plus usuellement utilisées pour stimuler la rhizogenèse sont l'ANA, AIB et IPA.

Selon ZRYD [114], la rhizogenèse peut être déclenchée chez certain type de plantes lors du transfert de sub-culture d'un milieu qui contient des hormones de croissance vers un autre milieu sans hormone. Lors de notre expérimentation, nous avons obtenu les mêmes résultats.

Les travaux qui ont de BRAVO et *al.* [160] sur *Aristolochia fimbriata*, montrent que pour stimuler la formation des racines, les pousses ont été cultivées sur le milieu MS basique avec un demi de macroéléments, complété de AIB ou ANA. L'AIB a produit des racines avec toutes les concentrations examinées, alors que seule ANA a pu initier l'apparition des racines sans développement.

Par ailleurs, la phase de rhizogenèse étudiée chez *Aristolochia indica*, a montré que l'introduction des sub-cultures dans des milieux contenant AIB peut donner de très bons résultats [159].

Le phénomène de la rhizogenèse est expliqué par LEIFERT [168], qui montre que dès les toutes premières heures qui suivent la blessure faite à des plantules de vigne, de fortes augmentations sont enregistrées pour quatre marqueurs : production d'éthylène, AIA libre, O-dihydroxyphénol et les phénols. Les teneurs des trois derniers composés sont beaucoup plus importantes à la base des plantules plutôt qu'à leur sommet. En même temps, l'activité peroxydasique chute. Après 12 ou 24 heures, les tendances vont s'inverser. Les premiers marqueurs ont tendance à diminuer, tandis que l'activité peroxydasique augmente. Celle-ci continue à augmenter pour atteindre le sommet de la tige. A ce moment les primordiales racinaires apparaissent et l'activité peroxydasique chute. Les composés phénoliques, eux varient en sens opposés à celui de l'activité peroxydasique totale.

Ces variations dans le temps des auxines AIA libres, observées par LEIFERT [168] et confirmées par plusieurs autres, dont MONCOUSIN [169], peuvent expliquer pourquoi des clones présentant une capacité rhizogénétique élevée, peuvent être associés à de fortes ou à de faibles teneurs en auxines endogènes. Ces teneurs dépendent du moment où l'analyse est réalisée.

S'il est admis, que l'auxine joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de l'enracinement adventif, c'est cependant, la blessure de la tige au moment du microbouturage qui donne le signal initial. Celui-ci peut ensuite être amplifié par l'apport d'auxine exogène.

Toutefois, cet apport doit être fourni en quantités correctes. Ainsi, lorsque la dose est inférieure ou supérieure à celle exigée par le pommier facile ou difficile à enraciner, l'enracinement n'aura pas lieu [169].

Par ailleurs, FAVRE [170] et HARTMANNHT [171], affirment que dans la plupart du temps, la présence de bourgeons est nécessaire à la rhizogenèse. Elle se traduit par l'obtention de meilleurs résultats au niveau du pourcentage des boutures enracinées, de la cinétique d'apparition des racines néoformées et leur nombre.

Tout comme les bourgeons, la feuille exerce ordinairement un effet stimulateur sur la rhizogenèse. Sa présence à côté du bourgeon est obligatoire pour la réussite de la micropropagation.

Selon MARGARA [118], la néoformation de racines serait déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles, ensuite, elle migre vers la base de la tige.

Cette substance hypothétique spécifique à la rhizogenèse avait été appelée « rhizocaline », celle-ci se trouve en association avec les auxines [170] [171].

3.3.7.2.2. Organogenèse indirecte

Dans cette partie, nous avons étudiés la possibilité d'obtenir des plantules complètes par la voie d'organogenèse indirecte en passant par la phase de callogenèse.

- Phase de callogenèse :

Les explants utilisés pour l'induction des cals sont des fragments de feuilles avec une surface de 0.25 cm^2 . Ces derniers sont repiqués sur le milieu de base MS additionné aux différentes combinaisons hormonales avec la même concentration.

Les explants étudiés sont introduits dans deux chambres de culture

Chambre 1 : La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heure d'obscurité

Chambre2 : La photopériode : 24 heures d'obscurité.

Effet des différentes combinaisons hormonales sur le pourcentage des cals

Effet de BAP avec auxines :

Dans cette partie, quatre combinaisons hormonales ont été étudiées à des concentrations identiques. Les milieux sont :

$M_1 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l AIA}$

$M_2 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l AIB}$

$M_3 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l ANA}$

$M_4 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l 2.4-D}$

Après 20 jours dans la chambre de culture 2, les explants ayant pu initier la formation des cals sont transférés dans la chambre 1. La figure 3.77 illustre les résultats obtenus:

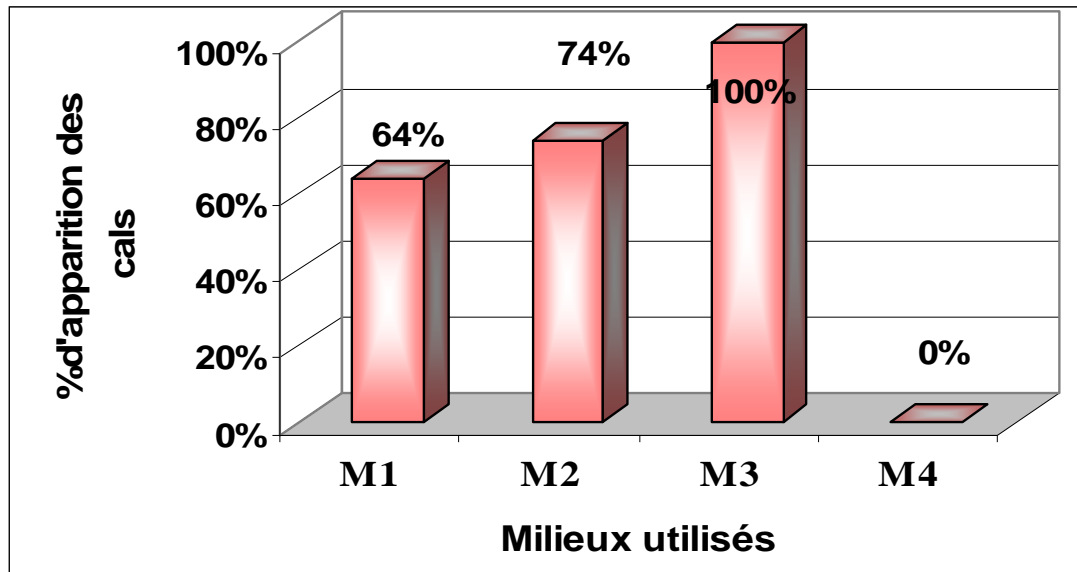


Figure 3.77 : Effet des combinaisons hormonales entre le BAP et les auxines sur l'apparition des cals

D'après les résultats obtenus, nous constatons que le pourcentage des cals obtenus sur le milieu M₃ (100%) est nettement supérieur à celui obtenu pour le milieu M₁ (64%) et M₂ (74%). Le milieu M₄ n'a donné aucun résultat.

Par ailleurs, tous les explants qui ont été introduit dans la chambre de culture 1 n'ont pu pousser. Ils ont brunis et se sont desséchés après 40 jours d'introduction et cela pour toutes les combinaisons hormonales

Effet de la kinétine avec les auxines :

Nous avons étudié l'effet de la kinétine avec les auxines sur la callogenèse.

Quatre milieux ont été testés :

M₅ = 1 mg/l Kin + 1 mg/l AIA

M₆ = 1 mg/l Kin + 1 mg/l AIB

M₇ = 1 mg/l Kin + 1 mg/l ANA

M₈ = 1 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D

Comme dans la première combinaison, les explants qui ont initié la formation des cals sont déplacés vers la chambre de culture 1 (Figure 3.78).

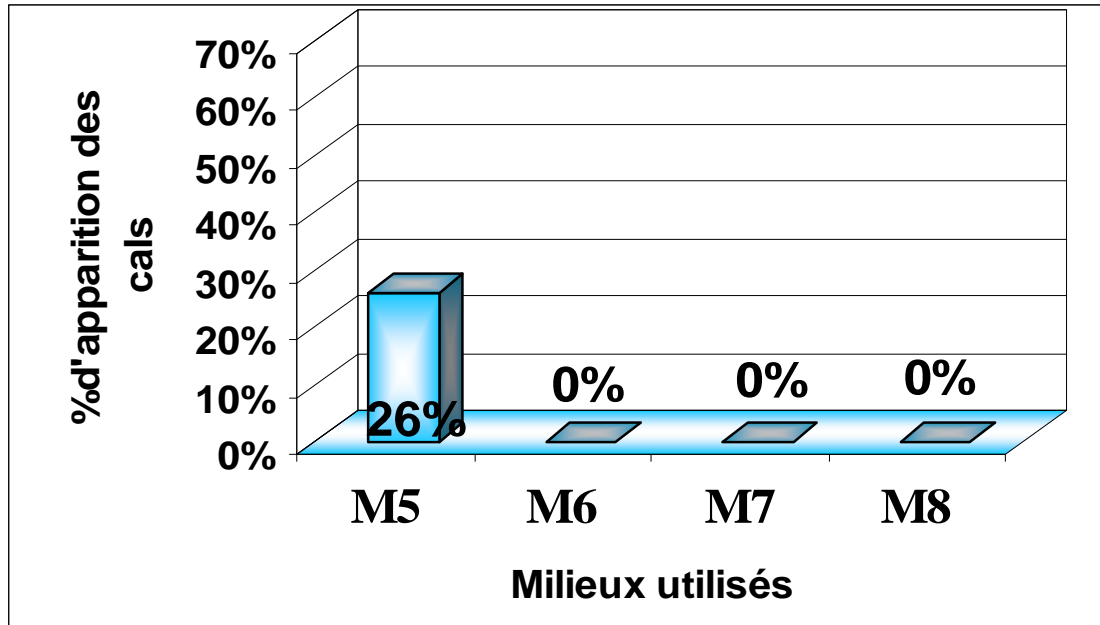


Figure 3.78 : Effet des combinaisons hormonales entre la kinétine et les auxines sur l'apparition des cals

Les résultats obtenus ont montré que le seul milieu qui a pu induire l'apparition des cals est celui qui contient les hormones de croissance : la kinétine (1mg/l) et l'AIA (1mg/l). Les trois milieux M₆, M₇ et M₈ non aucun effet.

En plus, les explants qui sont cultivés à une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

D'après tous les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les différentes combinaisons hormonales ainsi que, leurs concentrations n'ont pas le même effet sur l'aptitude à la callogenèse.

- Effet des différentes combinaisons hormonales sur le poids des cals :

Les mesures ont été faites sur les milieux ayant initié la formation des cals. Les milieux sont M₁, M₂, M₃ et M₅.

L'évolution du poids frais des cals est suivie pendant 80 jours après l'introduction primaire

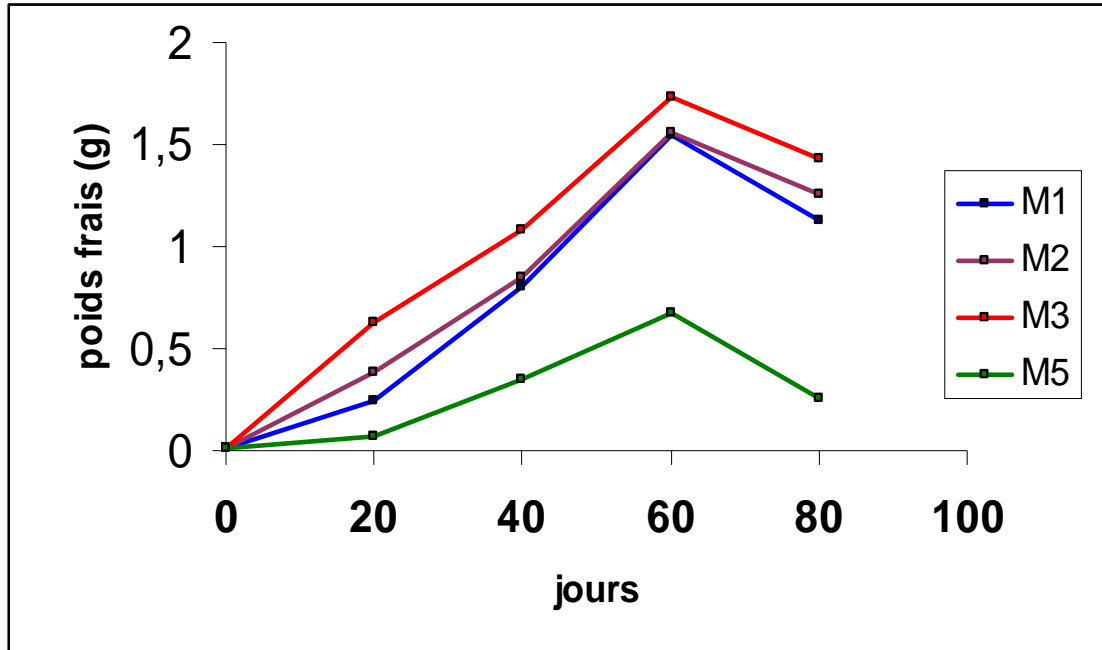


Figure 3.79: Evolution de la callogénèse exprimée en poids frais de feuilles sur les milieux de culture

Les résultats obtenus (Figure 3.79) montrent que, la croissance des cals est continue. Elle atteint son maximum après 60 jours de culture pour les quatre types de milieux de culture. Au-delà, le poids frais chute pour tous les milieux.

Le poids frais le plus élevé des cals est obtenu sur le milieu M₃, avec une valeur maximale de $(1.727 \pm 0.35 \text{ g})$.

En deuxième position, nous avons remarqué que l'évolution du poids frais des cals sur les milieux M₁ et M₂ est presque identique. Il atteint la valeur maximale aussi après 60 jours de l'introduction primaire avec $(1,545 \pm 0.153)$ pour le milieu M₁ et $(1,553 \pm 0.235)$ pour le milieu M₂.

Le milieu M5 présente un pouvoir callogène nettement plus faible comparé avec les autres milieux.

Les résultats de l'analyse de la variance (tableau 2, App C), nous permettent de dire que la variance interfactorielle présente une action très hautement significative sur le poids frais moyen des cals.

Par conséquent, les différentes combinaisons en régulateurs de croissance entraînent un effet très hautement significatif sur le poids frais des cals.

Après 40 jours de mise en culture, selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de signification $\alpha=5\%$, trois groupes homogènes se dégagent (A, B et C) (tableau 3.39).

Tableau 3.39 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals

Milieu	M1	M2	M3	M5
Moyenne (g)	0.817 ± 0.218	0.805 ± 0.068	1.069 ± 0.334	0.313 ± 0.294
Intervalle de confiance	[0.782 – 0.852]	[0.794 – 0.815]	[1.016 – 1.122]	[0.267 – 0.360]
Groupe homogène	A	A	B	C

Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals :

Les cals issus des feuilles diffèrent par leur couleur et leur texture selon les milieux et les conditions de culture dans lesquelles ils se trouvent.

- Aspect des cals à l'obscurité

Concernant les feuilles, la callogenèse débute au niveau du contour de l'explant. Elle progresse le long des nervures et s'étale finalement sur le limbe. Les explants des feuilles mis à l'arbi de la lumière, ont donné des cals de couleur beige blanchâtre, ou brune. La texture est friable, parfois peu compacte selon les milieux de culture (Tableau 3.40).

Tableau 3.40 : Couleur et texture des cals à l'obscurité

Milieu	Couleur	Texture
M1	Beige, blanchâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Blanchâtre ou beige	Granuleuse, compacte ou parfois friable
M3	Beige, jaunâtre ou brun	Noduleuse, friable, parfois peu compacte
M5	Beige ou brun	Dure et friable

Après 60 jours à l'obscurité, quelque soit la composition du milieu de culture, les cals deviennent pulvérulents et virent au brun. Lorsqu'ils sont transférés à la chambre de culture 1, ils gardent le même aspect sans aucun changement notable.

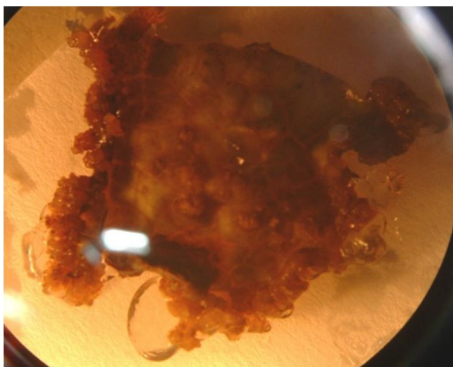
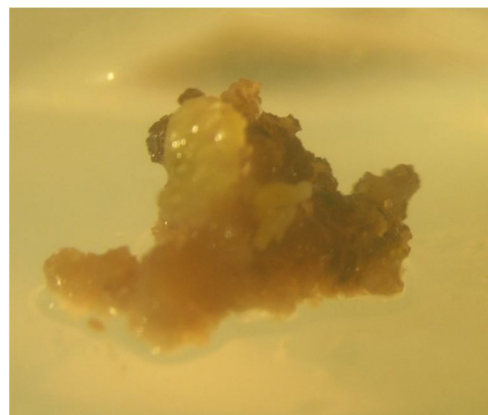


Figure 3.80 : Début de formation des cals

Figure 3.81 : Aspect des cals issus des milieux M₁ et M₂ à l'obscuritéFigure 3.82 : Aspect des cals issus du milieu M₃ à l'obscurité

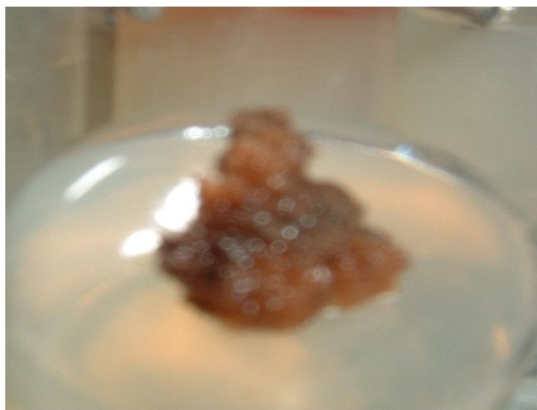


Figure 3.83 : Aspect des cals issus du milieu M₅ à l'obscurité

Aspect des cals à la lumière

Après 20 jours de leur introduction primaire, les explants ayant initié des cals sont transférés dans la chambre de culture 1. L'aspect des cals issus changent selon les milieux de culture (Tableau 3.41).

Tableau 3.41: Couleur et texture des cals après transfert à la lumière

Milieu	Couleur	Texture
M1	Verdâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Verdâtre, blanchâtre ou brune	Friable et Granuleuse
M3	Verdâtre, beige foncé	Noduleuse, friable parfois dure
M5	Brunes	Desséchés et friable

Nous remarquons ainsi que les cals exposés à la lumière changent d'aspect. Ceux des milieux M₁, M₂ et M₃, présentent une couleur beige-vert à blanc-vert, avec une texture noduleuse de consistance molle. Ce type de cals caractérise morphologiquement les cals non embryogènes. Ces derniers sont aptes à être conduit vers une organogenèse bien définie, car la couleur verte indique la présence d'une initiation de bourgeons c'est-à-dire des cals caulogènes.

Cependant, le milieu M5 donne des cals dont la couleur est brune et le développement est réduit. Ils finiront par se dessécher. Ces caractéristiques indiquent la présence de cellules mortes.

Après 40 jours de leur introduction primaire, les cals sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial.

Quel que soit le type du milieu de culture, après 3 à 4 transferts, les cals deviennent durs et la couleur vire vers le brun et parfois au noir. Ils montrent un aspect poudreux.

Après un mois de culture dans la chambre 1, les cals issus des milieux M₁, M₂, M₃ vont développer des bourgeons qui s'étalent sur toute la surface des milieux. Ces bourgeons donnent par la suite de petites tiges. Ces petites tiges sont transférées vers le milieu d'allongement pour assurer une bonne elongation aux poussées qui seront enracinées dans des milieux d'enracinement.

D'après nos résultats, nous constatons que l'aptitude à la callogenèse diffère. Elle dépend non seulement des milieux de culture utilisés mais aussi des conditions de culture.



Figure 3.84 : Aspect des cals issus des milieux M₁, M₂ et M₃ à la lumière

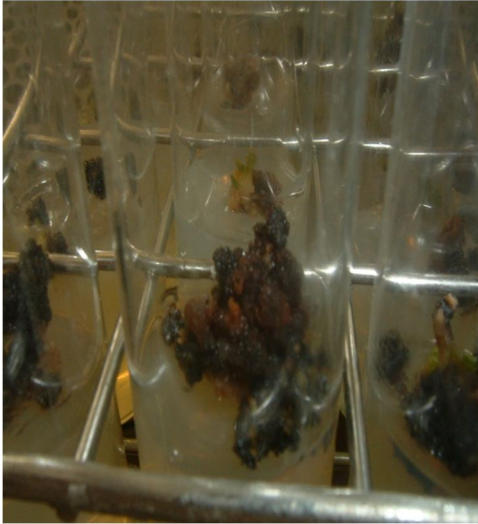


Figure 3.85 : Aspect des cals issus du milieu M₅ à la lumière



Figure 3.86: Développement de bourgeon issu du cal (loupe Gx4.5)

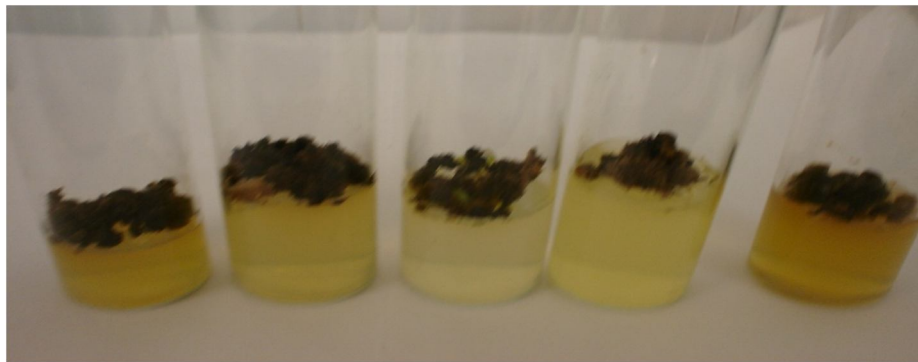


Figure 3.87 : Aspect des cals après 3 à 4 sub-cultures

D'après LUTZ [172] et NOZERAN [173], l'initiation de la callogenèse semble être due au bouleversement du comportement des explants. Il est essentiellement lié aux coupures des corrélations entre l'explant et la plante mère, ainsi qu'à son nouvel environnement.

En outre, d'après MARGARA [118], les fragments de tige peuvent présenter une callogenèse abondante à l'obscurité continue, mais ils ne forment jamais de bourgeon. En plus, après plusieurs semaines de séjour à l'obscurité, les cals transférés à la lumière paraissent avoir perdu leur aptitude initiale à la caulogénèse.

Dans l'aspect biochimique, THORPE [174], montrent une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants.

La perte de l'activité caulogène d'un cal *d'Arabidopsis* (cultivé trop longtemps sur 2,4-D) correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. La récupération de la capacité organogénétique, requiert une reprise de l'activité de la plupart des isoenzymes [175].

Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait être l'indication d'une réduction du niveau auxinique endogène [176].

Par ailleurs, lorsque le cal provient d'un fragment d'organe contenant des tissus divers (feuille, tige et apex), on constate souvent l'aptitude particulière à la caulogénèse chez certaines catégories de tissus (cambium, parenchyme vasculaire ou libérien) [118].

- Phase d'élongation :

-

Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige

Pour faciliter la séparation des plantules formées sur les cals et leur passage en enracinement, nous avons essayé d'améliorer leurs allongements.

Le milieu de base utilisé est celui de MS (1962) additionné au GA₃ et BAP à différentes concentrations. Les milieux sont :

M₁ : MS + sans hormones (témoin)

M₂ : MS + 1 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l BAP

M₃: MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l BAP

M₄: MS + 1.5 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l BAP

M₅: MS + 1 mg/l GA₃.

La prise de mesure de la longueur des plantules a été effectuée chaque semaine après leurs repiquages.

Les résultats obtenus (figure 3.88) montrent que l'élongation des vitro-plants présente certaines variabilités d'un milieu à l'autre. En effet, l'allongement moyen des tiges est nettement plus élevé et presque identique pour les milieux M₁ et M₅. Alors que pour les milieux où nous avons additionné des cytokinines (BAP) au GA₃, la moyenne d'élongation pendant la période d'observation a été plus faible pour les milieux M₂ et M₄. Quant au milieu M₃, il présente le plus faible taux d'allongement.

Nous avons remarqué aussi que le taux de néoformation des bourgeons dans les milieux M₂, M₃ et M₄ a été plus grand en comparaison à celui des milieux M₁ et M₅.

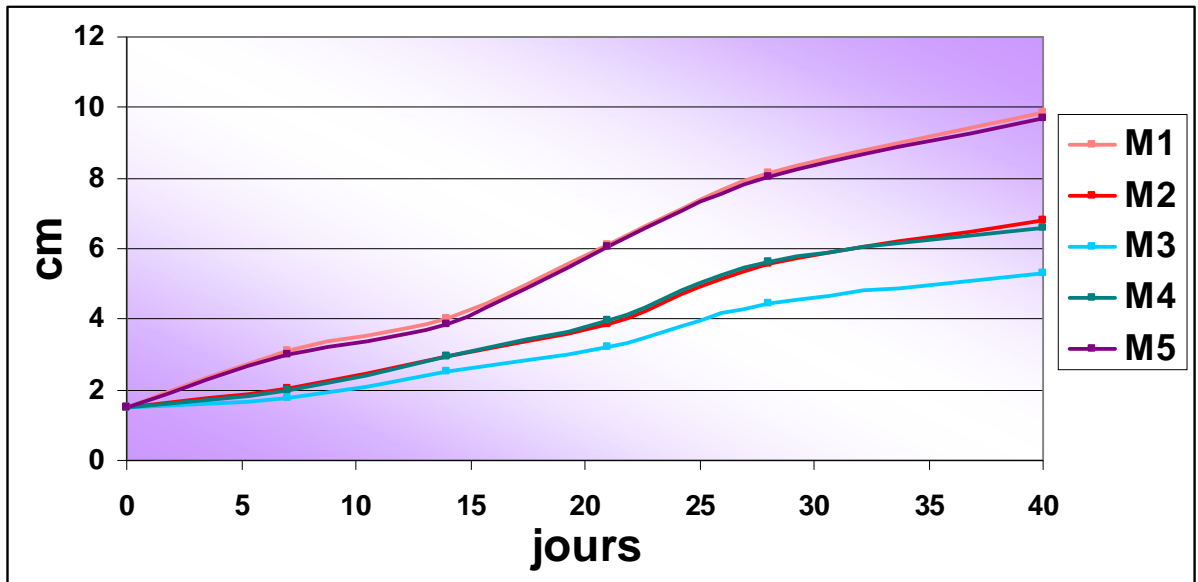


Figure 3.88 : Effet des hormones de croissance sur l'allongement moyen de la tige

Nos résultats ont été appuyés par l'analyse de la variance au risque $\alpha = 0.05$ (Tableau 3, App C). En effet, il existe une différence significative entre les milieux utilisés sur l'allongement moyen des vitro-plants. La comparaison des ces valeurs deux à deux par le test de NEWMAN et KEULS, permet de dégager 3 groupes homogènes (Tableau 3.42).

Tableau 3.42 : Effet des hormones de croissance sur l'allongement des vitro-plants

Milieu	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Moyenne (cm)	9.87 ± 0.35	6.82 ± 0.47	5.33 ± 0.17	6.6 ± 0.38	9.71 ± 0.41
Intervalle de confiance	[9.49-10.24]	[6.32 -7.31]	[5.15 -5.51]	[6.20-6.99]	[9.28-10.14]
Groupe homogène	C	B	A	B	C

D'après ZRYD [114], l'élongation des tiges est inhibée dans de nombreux cas par une trop forte concentration en cytokinine. Les plantules seront donc repiquées sur un milieu sans cytokinine ou à des doses très faibles pour qu'elles puissent reprendre leurs allongements.

Par ailleurs, le passage des plantules du milieu de multiplication au milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de GA₃, peut favoriser leurs allongements [164] [165][166].

Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige :

Cette partie d'étude a été réalisée sur les milieux M₁ (sans hormones) et M₅ (1 mg/l de GA₃) qui ont donné les meilleurs résultats concernant les vitro plants. Après un mois de culture, les vitro-plants d'*Aristolochia longa* L. ayant présenté un bon allongement, sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial (M₁ et M₅). Ce repiquage successif est répété 4 fois.

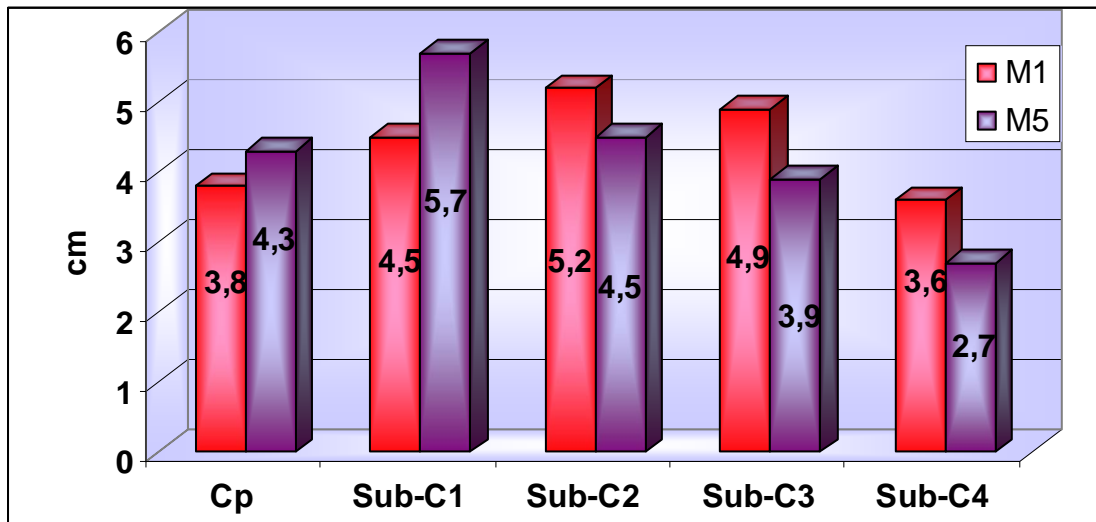


Figure 3.89: Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la tige

Nous avons remarqué que l'allongement moyen de la tige dans le milieu M₅ est nettement plus élevé à la première sub-culture (SbC1) avec 5.7 cm par rapport aux autres sub-cultures qui présentent des valeurs décroissantes.

Par contre, la meilleure éloration a été observée pour le milieu M1 après la deuxième sub-culture (figure 3.89).

- Phase d'enracinement :

Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige

Après leur développement en tubes, les pousses issues des cals ont été transférées sur un milieu d'enracinement. Les milieux testés sont :

M₁: Sans hormones (témoin)

M₂: 0.5mg/l GA₃ + 1mg/l 2.4 D

M₃: 0.5 mg/l GA₃ + 1 mg/l ANA

M₄: 0.5 mg/l GA₃ + 1 mg/l AIA

M₅: 0.5 mg/l GA₃ + 1mg/l AIB

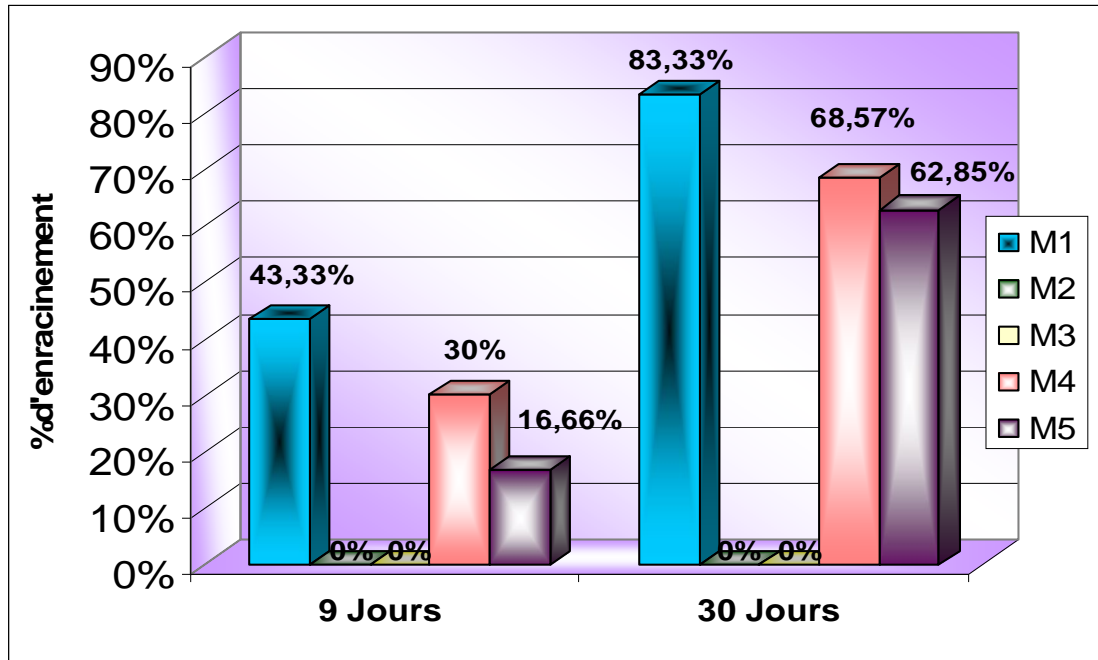


Figure 3.90 : Effet des hormones de croissance sur l'enracinement des vitro-plants issus des cals

Les résultats obtenus (figure 3.90) montrent qu'après un mois de culture, deux combinaisons hormonales ont pu favoriser l'initiation et le développement des racines, (AIA+ GA₃) et (AIB +GA₃) avec un taux de 68.67 % pour le milieu M₄ et 62.85% pour le milieu M₅.

En outre, après la deuxième sub-culture des vitro-plants obtenus sur le milieu M₁ de l'allongement, on remarque le développement de racines. Le pourcentage des pousses enracinées est le plus élevé (84%) par rapport aux autres milieux d'enracinement testés.

En ce qui concerne les milieux M₂ et M₃, on constate que les combinaisons hormonales utilisées (GA₃ + 2.4 D) et (GA₃ + ANA) n'ont aucun effet sur l'enracinement.

Nous avons noté aussi, l'initiation et le développement de la rhizogenèse après 5 à 10 jours de repiquage des vitro-plants. Ces derniers en deuxième sub-culture évoluent sur le milieu M₅ d'allongement qui contient 1 mg/l de GA₃.

En outre, nous avons remarqué l'apparition des racines sur des cals avant la formation des bourgeons et cela sur le milieu M_1 sans hormone (figure 3.91).

Selon JONES [176] et GASPAR [177], des substances comme l'acide gibbérellique ou des polyphénols, peuvent se révéler de bons stimulateurs de l'induction des racines si elles sont rajoutées au milieu de culture

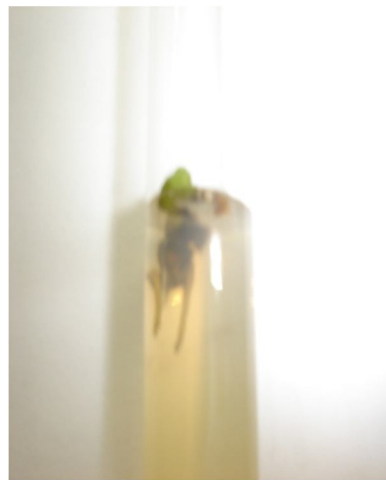


Figure 3.91 : Cal enraciné sur le milieu M_1

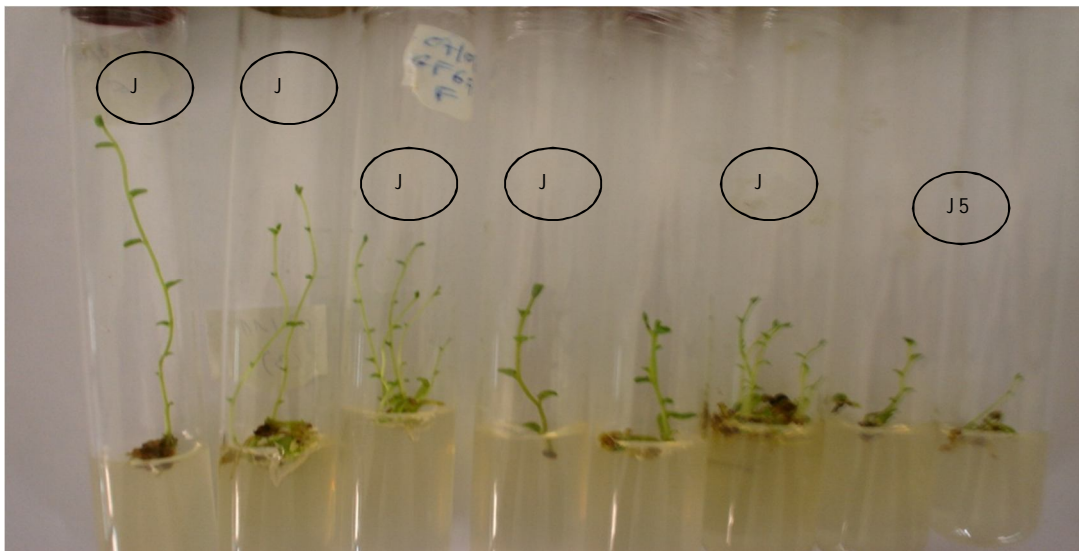


Figure 3.92 : Développement des plantules issues des cal

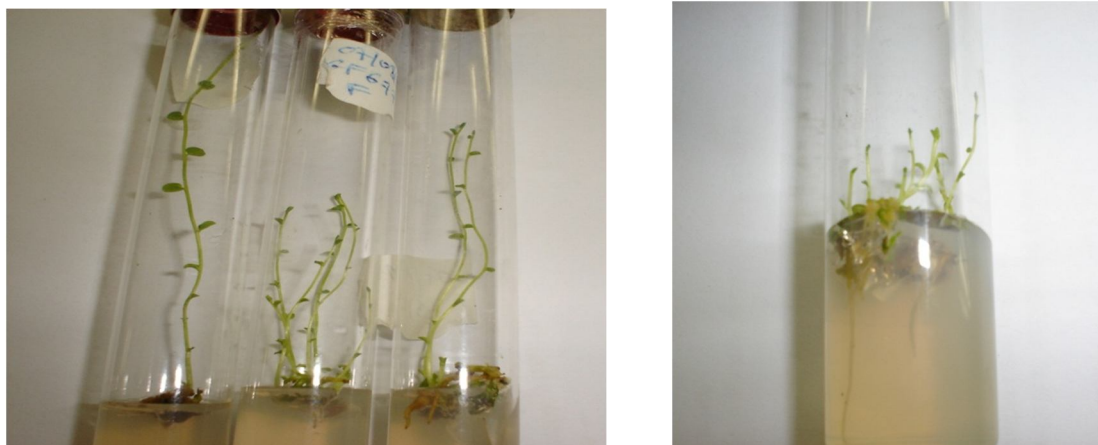


Figure 3.93 : Développement des racines des vitro-plants issus des cals

- Organogénèse déficiente :

Nous avons remarqué au cours de notre expérimentation, l'apparition de cas de malformations des vitro-plants. Ces malformations sont observées après le transfert des pousses issues des cals vers les milieux d'allongement M_3 et M_1 . Elles sont plus fréquentes sur le milieu M_3 où la concentration en cytokinine (BAP) est de 1 mg/l, en comparaison avec le milieu M_1 sans hormone de croissance. Les vitro-plants obtenus sont caractérisés par des tiges courtes et épaisses avec des feuilles généralement très allongées ou plissées et parfois enroulées (figure 3.94). Sur le milieu M_1 , nous avons observé l'initiation et le développement des racines. Mais le taux de développement des plantules entières était réduit.

D'après GASPARD et *al.* [178], ces malformations rencontrées chez les plantules herbacées en voie de micropropagation *in vitro* sont désignées par le terme de vitrification. Les plantes vitrifiées se caractérisent par des tiges et des feuilles épaisses, vitreuses et plus ou moins translucides. Les aspects les plus apparents de la vitrification sont l'hyperhydricité des tissus et leur hypolignification avec une déficience en cellulose. Il est possible d'expliquer l'hyperhydricité par une turgescence accrue des cellules à cause de la diminution de la rigidité des parois.

En plus, l'assise génératrice libéroligneuse ou cambium dans les feuilles est déficient. Elle donne peu rangées de bois et liber. En outre, ils ont observé une lignification déficiente des vaisseaux de bois.

Par ailleurs, d'après ZRYD [114], La croissance des plantules s'en trouve réduite mais elle s'accompagne surtout d'un taux réduit de multiplication de bourgeons et d'enracinement.

Le taux de réussite de l'acclimatation est aussi réduit puisque les plantules vitrifiées sont susceptibles d'être infectées et perdent beaucoup d'eau.

Les principaux facteurs inducteurs ou activateurs possibles de la vitrification sont certaines hormones de croissance (les cytokinines en particulier), certains ions (NH_4^+), l'humidité du milieu ou de l'atmosphère, l'augmentation de la température et certains gaz (C_2H_4) [177].

D'après MURASHIGE et SKOOG [131], la plupart des cas de vitrification mentionnés sont constatés sur le milieu qui est particulièrement riche en nitrate d'ammonium. La vitrification y est donc considérée comme la réponse morphologique à un stress non traumatique (excès d'eau, de cytokinines, de certains ions).

CREVECOEUR [179] considère que le processus de vitrification peut être réversible, soit par un transfert *in vitro* sur un milieu non vitrifiant, ou en serre pour acclimatation. Les plantules peuvent former des organes parfaitement normaux

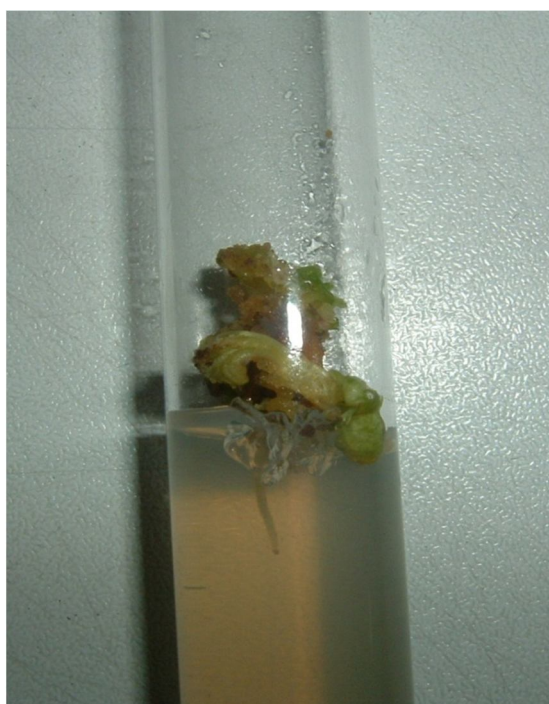
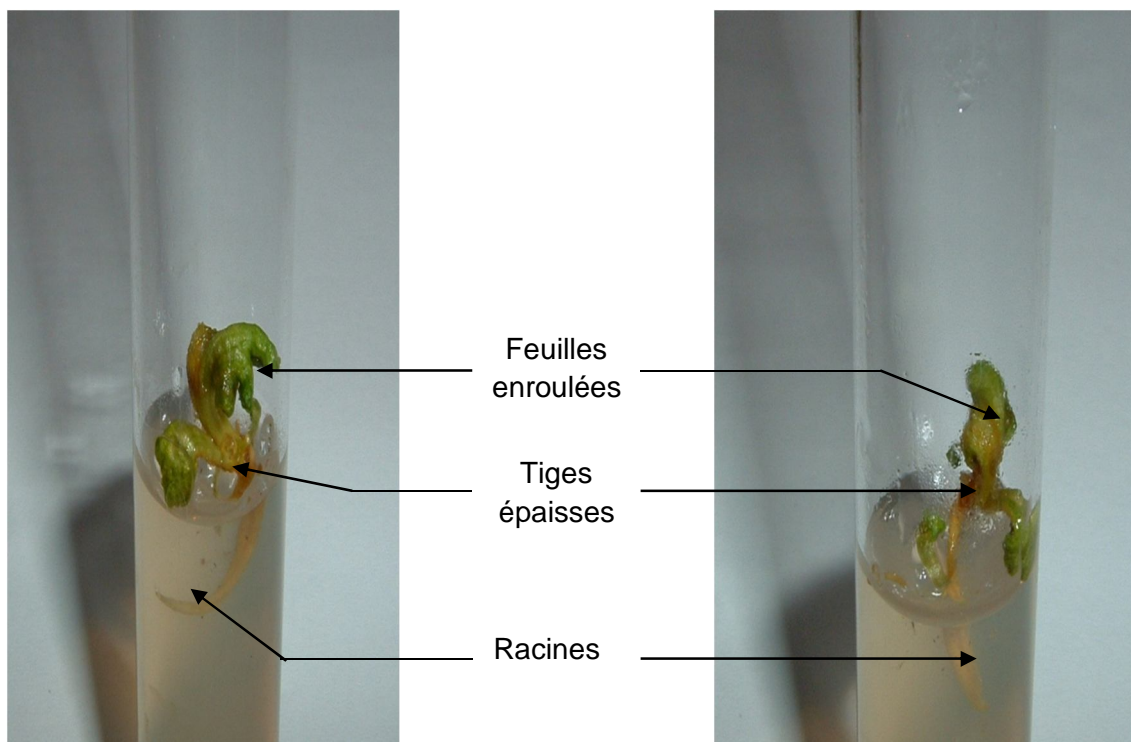


Figure 3.94: Aspect des plantules enracinées et vitrifiées

3.3.7.3. Acclimatation

Les vitro-plants enracinés obtenus par organogenèse directe et indirecte (figure 3.95) ont été acclimatés sur deux types de substrat :

- Substrat 1 : tourbe + perlite
- Substrat 2 : tourbe seule

Après 2 à 3 semaines de début d'acclimatation, on soulève progressivement les sachets en plastique afin de ramener lentement la plante en contact avec l'atmosphère de la mini-serre (figure 3.96 et 3.97).

Par ailleurs, après un mois d'acclimatation, l'effet des milieux utilisés et l'origine des vitro-plants, ont montré une action très hautement significative sur le pourcentage de réussite de l'acclimatation (figure 3.97).

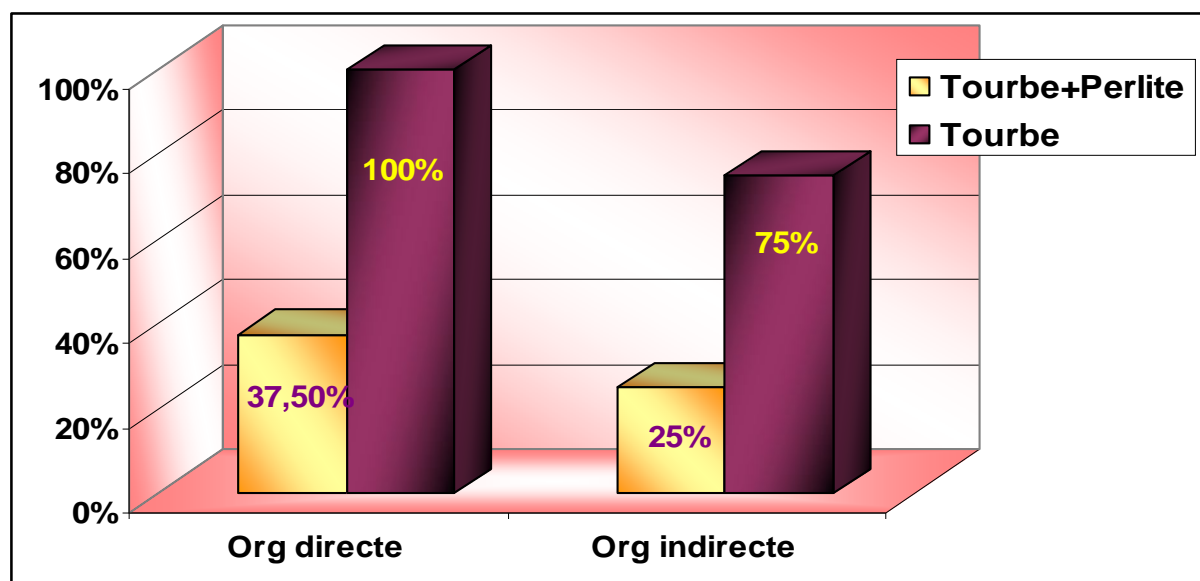


Figure 3.95: Pourcentage de réussite après un mois d'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse directe et indirecte après un mois

Les pourcentages de réussite de l'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse directe (S_2 37.5% et S_1 100%), sont nettement supérieur à celui obtenu par l'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse indirecte (S_1 25% et S_2 75%).

En outre, l'utilisation de la tourbe seule est plus efficace. Dans le cas de l'organogenèse directe, les plantules obtenues s'adaptent et survivent à 100% sur le substrat 1. Par contre, le pourcentage diminue à 37.50 % dans le cas du substrat 2. Les mêmes résultats ont été constatés dans le cas d'une organogenèse indirecte. Le pourcentage de réussite de l'acclimatation des vitro-plants est de 75% pour le substrat 1 contre 25 % sur le substrat 2.

En outre, le substrat constitué uniquement de tourbe permet une rétention importante de l'eau. Mais la perlite exige un arrosage fréquent pour compenser les pertes d'eau dues à sa texture.

A partir du 40^{ème} jour d'acclimatation, tous les vitro-plants issus de l'organogenèse indirecte sur les deux types de milieux ainsi que les vitro-plants issus d'organogenèse directe cultivés sur le mélange se dessèchent et meurent. Alors que, les seules plantules qui persistent pendant 2 mois sont celles issues de l'organogenèse directe (figure 3.100), ensuite, elles dessèchent et meurent. Cela peut être dû à la fragilité des plantules obtenues.



Figure 3.96 : Plantules début de l'acclimatation



Figure 3.97: Développement des plantules après 3 semaines de l'acclimatation

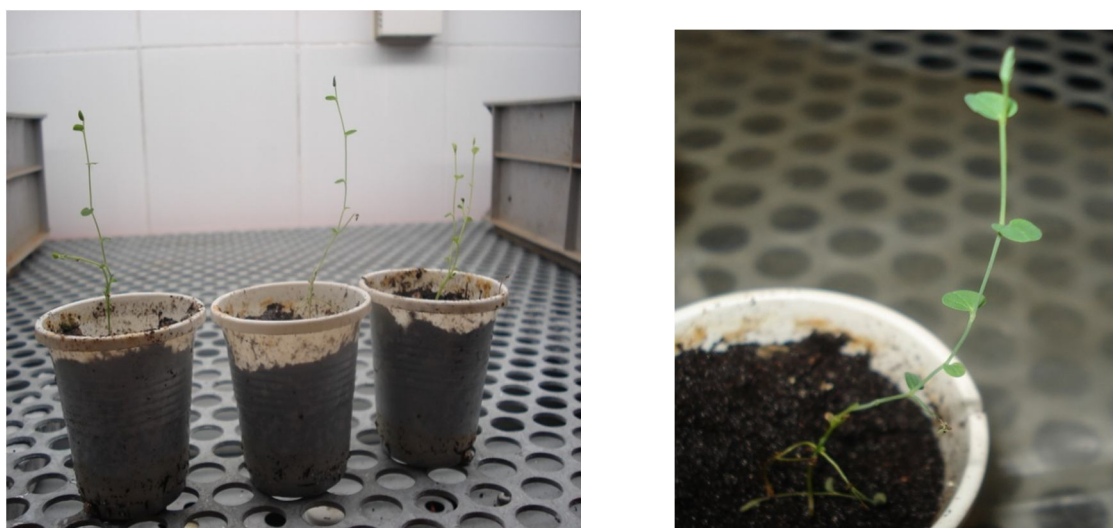


Figure 3.98 : Plantules issues de l'organogenèse directe après 40 jours

D'après AUGE et *al.* [113], les facteurs de réussite de l'acclimatation sont basés surtout sur le contrôle des conditions extérieures. Le mélange 2/3 tourbe et 1/3 sable (ou perlite) est fréquemment employé comme substrat d'acclimatation. De plus, l'humidité relative est l'un des facteurs les plus importants. Passant d'un micro-climat strictement contrôlé au climat d'une serre, le plant doit être placé le plus rapidement possible dans une atmosphère à humidité relativement élevée et bien contrôlée.

SKIRVIN [130] ajoute que, les stomates de jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de la transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. C'est pour cette raison qu'on recouvre les pots d'acclimatation par un film polyéthylène et on doit attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

Avec certaines espèces tubérifères, il est quelquefois nécessaire de passer par une période de froid pour lever la dormance. En effet, les tubercules peuvent entrer en dormance après leur transfert en pot.

Les vitro-plants possédant un cal, au contact du milieu de culture présentent des vaisseaux du système racinaire mal raccordés à ceux de la tige. Ce qui peut expliquer des insuccès lors du transfert en pot [177].

Le plus souvent, les jeunes racines formées en tubes ont un rhizoderme non subérifié. Lorsqu'elles sont placées au contact du substrat de culture, elles se dessèchent et meurent. Il faut attendre la formation de nouvelles racines pour que la plantule s'alimente normalement. Pendant cette phase, nous devons éviter le dessèchement des plantes en les plaçant en atmosphère confinée (humidité relative) pendant une à trois semaines et surveiller un développement éventuel de maladies. Les plantes peuvent être progressivement traitées comme celles issues d'une multiplication traditionnelle [180].

3.3.8. Résultats de l'étude toxicologique

Les observations des tests toxicologiques réalisés sur les animaux de laboratoire sont consignées quotidiennement. Les signes de morbidité les plus importants et la mortalité sont notés.

- Premier test

A l'issue de la période d'observation, les résultats du test limite sont reportés dans le tableau 3. 43.

Tableau 3.43 : Rapport entre le taux de mortalité et la dose administrée

	Dose g/Kg	A(différence entre 2doses successives)	B=Moyenne des nombres de morts de deux doses successives	Taux de mortalité%	Nombre d'animaux Utilisés	Nombre d'animaux morts
Lot 1	0.4	0.4	0	0%	12	0
Lot 2	0.8		0	0%	12	0
Lot 3	1.6	0.8	0	0%	12	0
Lot 4	3.2	1.6	0	0%	12	0

D'après Multon [181], dans un test limite, si une dose au moins égale à 2000 mg/Kg, ne provoque, ni mortalité ni anomalie dans les 14 jours qui suivent l'administration du produit à tester, ce dernier est alors considéré comme non toxique.

Dans ce test, aucune mortalité n'a été observée. Ce résultat est dû probablement à :

1/ L'administration d'une dose unique soit insuffisante, pour provoquer un trouble ou une intoxication notable,

2/ La poudre végétale utilisée lors de ce test après une année de conservation a probablement perdu son efficacité.

- Deuxième test :

Vu le goût très amer d'*Aristolochia longa* L., les souris ne pouvaient pas consommer l'aliment contenant 4g de poudre de feuilles, ainsi, cette dose a été écartée.

- Test répété:

Le tableau 3.44 regroupe les taux de mortalité observés.

Tableau 3.44 : Les taux de mortalité observés

	F1 (0.4)	F2 (0.8)	F3 (1.6)	Fr1 (0.4)	Fr2 (0.8)	Fr 3 (1.6)	Fr 4 (3.2)	Tr (0.4)	Tr (0.8)	Tr (1.6)	Tr (3.2)					
Nbr d'animaux utilisés	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
Nbr d'animaux morts	-	1	3	-	-	1	2	-	-	1	1					
Taux de mortalité %	0%	33.33 %	100%	0%	0%	33.33%	66.66%	0%	0%	33.33%	33.33 %					
A= différence entre 2doses successives	0.4		0.8		0.4		0.8		1.6		0.4		0.8		1.6	
B=Moyenne des nombres de morts de deux doses successives	1		2		0		1		1		0		1		1	
AxB	0.4		1.6		0		0.8		1.6		0		0.8		1.6	
Σ AxB	6.8															

Comme les 100% d'animaux morts sont observés uniquement dans le cas de l'utilisation des feuilles, nous n'avons donc pas calculé la DL50.

Interprétation des résultats

Les résultats obtenus pour les trois parties d'*Aristolochia longa* L. sont interprétés, en considérant le facteur organe et la période de récolte.

Cas des feuilles :

Le taux de mortalité de 100% a été observé chez les souris ayant eu la dose de 1.6g/Kg de poudre de feuilles d'aristoloche. Cette mortalité est en rapport probablement avec la richesse en alcaloïdes, en l'occurrence les acides aristolochiques.

En effet, en période de floraison, les feuilles sont très riches en divers métabolites. En outre, les spectres des concrètes analysées par UV-VIS (3.3.2) révèlent que les feuilles récoltées durant le mois de mai contiennent une grande quantité de composés phénoliques, notamment l'acide aristolochique.

Les travaux de Cherif et al. [129] ont montré que les feuilles récoltées au mois de mai présentaient des taux élevés d'acides aristolochiques par rapport aux tubercules, avec les valeurs suivantes : AA-I (195.221 μ g/ml), AA-II (37.025 μ g/ml) . L'analyse chromatographique réalisée précédemment (3.3.3) a montré que les feuilles récoltées durant la période de floraison contenaient deux acides aristolochiques (AA-I et AA-II). Toutefois, c'est AA-I qui est majoritaire.

Cas des fruits :

Dans ce travail, nous avons constaté que plus la dose est élevée, plus elle devient toxique. Ainsi, un cas de mortalité a été observé pour la dose de 1.6g/Kg et deux cas pour 3.2g/Kg. Néanmoins, aucun cas de mortalité n'a été observé pour les doses de 0.4g/kg et 0.8g/kg.

La solution à base de poudre de fruits paraît moins toxique que celle des feuilles. Ce résultat pourrait éventuellement avoir deux explications :

- 1/ Les fruits non mûres ne contiennent que peu de métabolites secondaires, en l'occurrence, ils sont moins toxiques. Au fur et à mesure de la maturation du fruit, les quantités de métabolites augmentent et le fruit devient toxique.
- 2/ A maturité du fruit, les graines se concentrent en alcaloïdes et deviennent toxiques.

Selon Cabaret [182], la toxicité se concentre avec l'âge de la plante dans les racines, les bulbes, les fruits et les graines.

Cas des tubercules

Comme pour les cas des feuilles et des fruits, nous constatons une proportionnalité entre le taux de mortalité et la dose administrée. Plus la dose est élevée, plus le taux de mortalité est élevé.

Cependant, les résultats observés semblent indiquer que les tubercules sont moins toxiques que les feuilles et les fruits, si l'on tient compte exclusivement de la morbidité, il y a eu mort de deux souris sur un total de 12.

Dans le cas des tubercules il est probable que le taux de toxicité soit en rapport avec la période de récolte. En effet, il est évident que pendant la floraison, les feuilles sont plus riches en composés que les tubercules qui après maturité des graines emmagasinent différentes substances, entre autres les acides aristolochiques.

En effet, la première enquête ethnobotanique réalisée avec les herboristes et phytothérapeutes, nous a permis de déduire que ces derniers conseillent aux patients l'utilisation des feuilles récoltées de préférence au mois de Mai, et les tubercules au mois de septembre.

Par ailleurs, Cherif et al. [129] ont montré que la teneur en acide aristolochique était plus importante au mois de septembre qu'au mois de mai avec les proportions suivantes : AA I(117.618 μ g/ml), AA II(38.984 μ g/ml).

Comparativement avec l'échelle de Viala [183], l'extrait végétal étudié serait peu toxique car la DL50 est située entre 500 et 5000mg/kg

Concernant l'étude préliminaire sur la toxicité aiguë d'*Aristolochia longa* L., les résultats obtenus nous permettent de constater que, la dose la plus faible (0.4g/Kg) n'a pas donné de signes visibles d'intoxication. Cependant, à partir de la dose (0.8g/Kg), les signes de morbidités deviennent de plus en plus importants.

D'après Bruneton [7], il ne semble pas exister des cas d'intoxication humaine aiguë par des espèces du genre *Aristolochia* et les intoxications animales ne sont pas fréquentes. Néanmoins, ces plantes se révèlent particulièrement dangereuses lorsqu'elles sont ingérées sur une longue période car elles occasionnent surtout une néphropathie dite « Néphropathie aux herbes chinoises » ou « Néphropathie à AA ».

Il est à signaler toutefois, que la plupart des expériences réalisées sur les rats se sont intéressées plutôt à la toxicité chronique de l'Aristolochie.

Ainsi, Hwang et al. [184] ont pratiqué un gavage quotidien pendant 90 jours sur des rats mâles et femelles, les doses variaient entre 0.02135 et 2.0135g/kg. Ils ont constaté une absence de mortalité et des signes cliniques. Cependant ils ont signalé des hyperplasies épithéliales cellulaires et une néphrotoxicité à partir des doses \geq à 2.0135g/kg par jours.

De même, POON et al. [70][185][186][187] mentionnent qu'une toxicité cumulative pourrait apparaître après une utilisation prolongée ou intermittente de plantes médicinales contenant de l'acide aristolochique.

En effet, les adduits d'ADN formés par les acides aristolochiques I et II persistent pendant 9 à 44 mois dans les reins des patients qui présentent une CHN [188][189]. Ces adduits peuvent persister six ans après l'arrêt de l'ingestion de l'acide aristolochique ou après exposition aux plantes chinoises contenant cet acide [190][191][192].

En étudiant la toxicité sub-chronique pendant 3 à 6 semaines sur des souris adultes albinos, Benzakour et al. [65] ont démontré le potentiel immuno-stimulateur d'*Aristolochia longa* L. à induire des toxicités hépatiques et intestinales. Les doses journalières étaient de 1.25g/kg et 2.5g/kg. Les observations histopathologiques ont montré que la dose 1.25g/kg n'était pas toxique par contre la dose de 2.25g/kg provoquait d'importantes lésions au niveau des intestins.

Par ailleurs, CHERIF et al.[129] ont observé que les teneurs en acides aristolochiques étaient plus importantes au mois de Septembre qu'au mois de mai. Ces résultats concordent dans l'ensemble avec l'étude ethnobotanique qui révèle que les spécialistes utilisent les feuilles de l'aristoloche récoltée au mois de mai et les tubercules au mois de Septembre. D'autre part, les analyses effectuées sur la concrète alcoolique des tubercules montrent qu'ils sont plus riches en acides aristolochiques en comparaison avec les feuilles, surtout en périodes de maturité des graines.

Il est établi que 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 [185]. Nous le trouvons particulièrement dans de nombreuses espèces du genre *Aristolochia* et *Azarum*. En plus d'être cancérogène il est aussi néphrotoxique [143] [66][65][64][192][193][194][195], pour l'homme [64][185][193] et les animaux [64][143][185] avec une période de latence extrêmement courte.

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 (3.3.1).

CONCLUSION

Au terme de ce travail, les objectifs que nous nous sommes assignés au départ ont été atteints, au moins en grande partie.

L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de conclure sur les points suivants :

- * Les enquêtes menées sur terrain auprès de certains phytothérapeutes, herboristes et une centaine de personnes, nous ont permis de collecter des informations très importantes sur *Aristolochia longa* L. et son utilisation en médecine traditionnelle Algérienne.

- * Les coupes histologiques ont permis de connaître l'organisation des différents tissus au sein des feuilles, et des tiges.

- * Une étude phytochimique a été abordée, comportant des essais physicochimiques, visant 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. Ces acides ont été analysés sur deux années et par deux méthodes différentes.

- * 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, phosphore, fluorure et nitrite. Le plomb et le cadmium sont absents dans la matière minérale d'*Aristolochia longa*.

- * La présence des ions nitrites est un facteur de risque de cancérogenèse.

- * 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.

- 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 ou alors des sels d'acides aristolochiques.

Nous avons trouvés que les tubercules contiennent trois types d'acides aristolochiques en période de floraison.

* Après maturité des graines, ils en contiennent quatre types d'acides aristolochiques. Nos résultats montrent que l'acide aristolochique I est le type

majoritaire dans les tubercules pendant les deux périodes (en période de floraison et après maturité des graines).

Ce résultat a pu être confirmé en partie, par les chromatogrammes de la deuxième année, où dans les feuilles l'acide aristolochique I apparaît le plus important.

Les acides aristolochiques sont les principaux métabolites bioactifs des espèces du genre *Aristolochia*. La néphrotoxicité causée par ces acides aristolochiques attire l'attention du monde entier [66].

- L'analyse quantitative détermine les teneurs et permet de considérer la toxicité [68]. Cette analyse est importante, non seulement pour prévenir de nouvelles intoxications, mais aussi pour chercher les substituts dans lesquels l'acide aristolochique existe à des teneurs très basses [66]. .
- L'utilisation de la technique de CG/MS a permis d'identifier quelques constituants chimiques de la fraction volatile. Nous avons constaté, dans les huiles essentielles analysées, la présence d'une certaine proportion de sesquiterpènes et monoterpènes. Les résultats ne sont certes pas concluants, il serait intéressant de reprendre l'analyse de la fraction volatile, selon différentes périodes de l'année afin de tracer le chémotype de l'huile essentielle d'*Aristolochia longa* L.
- Concernant la détermination du profil lipidique, il semblerait évident que *Aristolochia longa* L. est potentiellement riche en acides gras, particulièrement les acides linoléique, linoléique et palmitique.

En outre, les résultats de la toxicité aiguë des poudres végétales d'*Aristolochia longa* L. nous permettent de dire que même si la dose létale précise n'a pas pu être déterminée, elle serait probablement entre 0.1 et 4g /kg. Les résultats obtenus sont encourageants. En effet, utilisé à fortes doses il y a eu des mortalités ou des symptômes divers tels que les diarrhées et pertes de poids.

En 2001, Food and Drugs Administration « FAD » [189][190], a informé les consommateurs pour arrêter immédiatement l'utilisation des produits contenant l'acide aristolochique. Cette décision est prise dans le but de prévenir d'éventuels événements d'intoxication [183][66].

Le volet de la culture *In Vitro* d'*Aristolochia longa* L. a aussi été abordé lors de ce travail. Les résultats relatifs à la stérilisation du matériel végétal, ont montré l'importance de la désinfection pour l'obtention d'une culture stérile. Les contaminations les plus courantes observées sont d'origine fongique et bactérienne. La détermination d'une méthode de désinfection où le taux de contamination est très faible (8.33%) est basée sur l'utilisation du chlorure mercurique à une concentration de 0.5 mg/l pendant 10 minutes. Il s'avère plus efficace que l'hypochlorite de calcium. A partir des explants d'*Aristolochia longa* L., deux modes de micropropagation sont réalisables :

- La micropropagation par voie directe
- La micropropagation par voie indirecte

En ce qui concerne l'organogenèse par voie directe, la multiplication des explants de tiges a permis de conclure que :

Le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) s'est avéré efficace pour toutes les étapes de multiplication. Cette espèce est caractérisée par une grande capacité au bourgeonnement dans le milieu MS contenant 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA. L'élongation est favorisée sur un milieu MS additionné au GA₃ avec une concentration de 1.5 mg/l et 0.5 mg/l BAP. Pour la rhizogenèse, les résultats ont montré que l'enracinement s'améliore après un mois de l'introduction primaire dans le milieu MS, en présence de l'AIA à 1mg/l.

Concernant la micropropagation par voie indirecte, pour l'induction des cals à partir des explants de feuilles sur le milieu MS avec des variations hormonales, nous pouvons dire que la variabilité de la callogenèse vis-à-vis des explants dépend de deux facteurs :

- Le type et la concentration des hormones de croissance utilisées,
- Les conditions de culture et plus précisément la photopériode.

Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de la callogenèse des feuilles dans le milieu MS contenant 1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA, cultivé pendant 20 jours à l'obscurité. Cependant, la phase de l'allongement a montré que le transfert des vitro-plants obtenus sur un milieu sans hormone ou additionné à 1 ml/l de GA₃ peut donner une très bonne élévation.

En ce qui concerne la phase de l'enracinement, le milieu sans hormone a pu induire l'apparition des racines. Cependant, *Aristolochia longa* L. fait partie des espèces qui présentent un phénomène de vitrification des pousses feuillées, qu'il faut réduire en utilisant une solution diluée et de faibles concentrations hormonales.

En tenant compte des conditions de culture optimales, la capacité au bourgeonnement des explants soit par voie directe ou indirecte, diminue au cours du transfert d'une sub-culture à l'autre.

A l'issue de ce travail, nous pouvons dire que quelque soit le potentiel thérapeutique de l'espèce *Aristolochia longa* L. et malgré son utilisation en médecine traditionnelle Algérienne, sa nature toxique pourrait représenter un facteur limitant cette utilisation.

Ainsi, en Algérie il est impératif voire salutaire d'informer les consommateurs, et sensibiliser les cancéreux en particulier, pour une utilisation rationnelle sur une courte période d'*Aristolochia longa* L.

Il serait souhaitable que les services de santé publique Algériens prennent en charge l'autorisation et le contrôle de mise sur le marché d'*Aristolochia longa* L. ainsi que toute plante qui présente un risque de toxicité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Iserin, P., « Larousse des plantes médicinales » Edition Larousse-Bordas, (2001), 335 p.
2. Becker G., « Plantes toxiques » Edition Grund, (1984), 413p.
3. Benabdelli, A. « Phytothérapie, le pouvoir des plantes », (1993),
4. Skalli S., Alaoui I., Pineau A., Zaid A., Soulaymani R., (2002). L'intoxication par la chardon à glu (*Atractylis gummifera*L.) ; à propos d'un cas clinique. Edition Bull Soc Pathol Exot ; vol 95(4), pp 284-286.
5. Bruneton J. « Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux » 2^{ème} Edition Lavoisier, (2005), 618p.
6. Menges.U, 1992, "Toxicity of aristolochic acid- a subacute study in mal rats" Med Sci Res, 20: 223-224P.
7. Bruneton J. « Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux » 3^{ème} Edition TEC et DOC, (2001), pp23-24.
8. Baba-aissa. F. « Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb ; substances végétales d'Afrique » Edition moderne Rouiba, Algérie, (1999), 368p.
9. Benchaabane A., Abbad A., (1997) Medicinal Plants marked in Marrakech. Edition Trace of the present, Marrakech, p74.
10. Bellakhdar, Dj., « La pharmacopée marocaine traditionnelle » Edition Ibis Press, Paris, Edition Fenec , Casablanca, (1997), 764p
11. Skalli S., (2010). Bereztem : Big threat to the health of a natural product. Moroccan Toxicol., 5 :15
12. 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.
13. 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.
14. Ute, K., Lobmeyer, T.R. « Plantes médicinales : identification, récolte, propriétés et emplois », Edition Parragon, (2007), 319p.

15. Fouché, J.G., Marquet, A. Hambuckers, A. « Les plantes médicinales : de la plante au médicament », observatoire du monde des plantes Sart-Tilman, (2000), pp 4-6.
16. Pelikan, W., « L'Homme et les plantes médicinales » Tome I. Edition Triades.(1986). 284p.
17. Sallé, J.L. « Les huiles essentielles ». Edition Frison Roche,(1991), 167p.
18. Debuigne, G. Couplan, F. « Petit Larousse des plantes médicinales » Edition Larousse, (2009), 383p.
19. Aquaron, M. « Relation entre les hommes et les plantes médicinales », Revue Homidés , les évolution de l'Homme, (2005).
20. Valnet, J. « Phytothérapie : traitement des maladies par les plantes » Edition Maloine, First science,(1983), 568p.
21. Foley, C., Jill, N. « Le grand guide des herbes » Paris 1^{ère} édition,(2003), 223p.
22. Debuigne, , « Dictionnaire Larousse » Edition Larousse,(1984), 255p.
23. Scimeca, D., Tetaux, M. « Votre santé par les plantes, le guide de phytothérapie utile pour toute la famille » Edition Alpen, (2004), p9.
24. Lamnaouer, D. « Plantes médicinales du Maroc : usages et toxicité. » Revue N°1 de l'Institut Agronomique et Vétérinaire, Hassen II. Rabat, Maroc, (2000)pp 18-21.
25. Maotti, R., Fauron, R., Denadieu, Y. « La phytothérapie », Paris,(1983), 19p.
26. Organisation mondiale de la santé(OMS). « Médecine traditionnelle », 56^{ème} assemblée mondiale de la santé, (2003), pp1-5.
27. Pousset, J.L., « Plantes médicinales africaines : utilisation pratique » Paris, (1989), In Keita, Y.,Koné, O., Ly, A . « Etude chimique et activité anti-bactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée », Compte rendu de chimie. Vol1,(2004), pp1095-1100 .
28. Lahsissene, H., Kahouadjia, N., Tijane, M., Hseini, S., “ Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaeir (Maroc occidental), Revue botanique Lejeunia , (2009), N°186 ,
29. Djerroumi, A., Nacef, M. « 100 plantes médicinales d'Algérie » Edition Palais du livre, (2004), 159p.
30. Halimi, A. « Les plantes médicinales en Algérie » Edition Berti, (2004),304p.
31. Mulder, C. « *Aristolochiceae* » Review of Palaeobotany and Palynology, n° 123, Utrecht University, The Netherlands, (2003), pp 47-55.

32. Judd, G., Kellogg S. «Botanique, anatomie, cycle évolutif systématique »1^{ère} Edition, De Boeck, , (2002), pp172-174.
33. Audouin, F. «Dictionnaire classique d'histoire naturelle», Tome III , Edition Boudouin, (1822), pp 568 - 569.
34. Schauemberg, P., « Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes. »Edition Ferdinand. Paris,(1977), 548p.
35. Bianchini, F., Carrara, A. P., «Le guide vert des fleurs», Edition Solar, (1986), 115p.
36. Quezel P., Santa,S. «Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales», Tome I, centre national de la recherche scientifique, Paris, (1962), 283p.
37. Maire, R., « Encyclopédie biologique : Flore de l'Afrique du nord » Edition Lechevalier , volume VIII, Paris ,(1961), 283p.
38. Quillet, A. «Dictionnaire encyclopédique Quillet. » Edition Aristide Quillet, Paris,(1934), 792p.
39. Rulick B., Wanke, S., Nuss, M., Neinhwis C. « Pollination of *Aristolochia pallida* Willd (*Aristolochiaceae*) in the Mediterranean», Flora, n°203, Germany, 2007, pp175-184.
40. Fournier, P. « Le livre des Plantes Médicinales et Vénéneuses de France » Edition lechevalier, Tome I, (1947), pp 358-359.
41. Meyer,S., Reeb, C., Bosdeveix, R. «Botanique: Biologie et physiologie végétale», Maloine, (2004) , pp.14-15.
42. Trujillo, C.G. Sersic, A, N. «Floral biology of *Aristolochia argentina* (*Aristolochiaceae*) », Flora, n°201, Argentina, (2006), pp 374 - 382.
43. 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.
44. 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.
45. Fluck, H., « Petit guide panoramique des herbes médicinales »Edition Delachaux et niestlé, (1977) 187p.

46. Paris .R .R, Moyse. H, « Précis de Matière médicale.», tome II, 2^{ème} Edition, Masson, Paris, (1981), p116.
47. Villars. D., «Catalogue méthodique des plantes.», F. C. Levraut, Strasbourg, (1807), 100p.
48. Bruneton , J, « Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales» Edition II, TEC et DOC, Paris, (1999), 1120 p, 286-426.
49. Guignard, J.,L, « Biochimie végétale » Edition Masson, Paris, (2000), 281p.
50. Verdrager, J., « Ces médicaments qui nous viennent des plantes. » Edition Maloine, Paris, (1978)
51. 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.
52. Paris, M., Hurabille, M., «Agrégé de matière médicale: pharmacognosie.», Tome I Edition Masson, Paris, (1980), 339p.
53. Grandclaudon, P., «Implication des anions dans la synthèse des aristolactames», *Laboratoire de chimie organique et physique, France*,(2002), pp 1-3.
54. Mix, D.B., Guinaudeau, H., «Determination of aristolochic acids in medical plant and herbal production by liquid chromatography » *Nat. Prod* , (1982), pp.657.
55. Yuan, J.,Liu, Q., Zhu, W., Ding.,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 ChromatographyA, China*, (2008), pp. 85-92.
- 56(a). De Pascual,T.T.,Julio, G.U, Alvaro, F. « An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa* » *Phytochemistry*, Volume 22, Spain, (1983), pp.2745-2747.
- 56(b). De Pascual,T.T.,Julio, G.U, Alvaro, F. « Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia longa* “. *Phytochemistry*, volume 22, Spain, (1983), pp2753-2754.
57. Wu, T.S.,Damou, A.G., Su, S.R., « Stereoselective synthesis of piperamide alkaloids by a modified ramberg –bäcklund reaction», *Journal of Royal Society of Chemistry, Lanzhou*, (1994), pp.631-634.
58. Kupchan. S.M et al. «Tumor inhibitors, I, aristolochic acid, the active principle of *Aristolochia indica* » *Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Wisconsin, Wisconsin*, (1962), pp.657

59. 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), pp565-583.
60. Robish, G., et al. « Aristolochic acid is a direct mutagen in Salmonella typhimurium » Mutat press, (1982), pp.105-201.
61. Chakrabarty. A., « Aristolochic acid an antifertility agent is non-mutagenic to bacterial system» Indian Institute of Chemical Biology Jadavpur, Calcutta, (1987), pp.26-31.
62. Feri,H., Wurgler, F.H., Juon, H., « Experientia » (1983), pp. 33- 685.
63. Bezanger, L., Pinkars, M., Torek, M., Trotin, F., «Plantes médicinales des régions tempérées», Edition Maloine , Paris, (1980),413p.
64. Shibutany, S., Huan, D., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F., Grollman, A.P., “Selective Toxicity of Aristolochic Acids land II”, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.35, N°7, pp 1217-1222, (2007).
65. Benzakour, G., Benkirane, N., Amrani, M., Oudghiri, M., « Immunostimulatory potential of *Aristolochia longa* L..induced toxicity on liver, intestine and Kidney in mice”. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, Vol. 3(8),pp214-222, (2011).
66. Sarembaud , A., «Médicaments à usage homéopathique»,Edition Masson, Paris, (1999), p 25.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Gadhi. C.A., Weber, M., MoryF., Bebharef, C;, Lion, C., Jana, M., Lozniewski, A. « Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel » Journal of Ethnopharmacology, N° 67, Morocco, (1999). Pp 87-92.
71. 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.

72. Hsieh et al. «Determination of aristolochic acid in chinese herbal medicine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection» department of medicine, Taipei medical university, Taipei, Taiwan, (2006), pp.127-134.

73.Poon, W.T., Lai, C.K., Chan, A.Y.W. « Aristolochic Acid Nephropathy : The Hong kong Persective», Hong Kong journal of nephrology, Volume 9, N°1 (2007), pp.7-14.

74.Stoborova, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., “Metabolic activation of carcinogenic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy”,Mutation Research, N°658, Czech Republic,(2008), pp 55-67.

75. Shamma, M. et al. « Isoquinoleine alkaloids » Plenum, New York , (1978),

76.Castedo, L. « In the alkaloids» Vol (39), brossi academic, New york, (1990), pp.39-99.

77.Rosenmund. H, Reichstein. T , *Pharm. Acta Helv.* 18,(1943), pp. 243.

78.Himosu, J. et al. « Cytotoxic and antimicrobial principles from roots of *Aristolochia longa* », (1990)

79. Bianchini, J., Corbetta, F., «Atlas des plantes médicinales», Edition Fernand Nathan, Paris, (1975), pp72, 196-197.

80. Kohara, A.,Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T., Kayashi, M., “Mutagenecity of aristolochic acid in the Lambda/ Lac Z transgenic mouse (Muta TM Mouse)”,Mutation Research, N° 515, Japan, (2002), pp 63-72.

81. Candolle, M., « Essai sur les propriétés médicinales des plantes comparées avec leur forme externe et leur classification. », Edition Crochard, Paris(1816), 259p.

82. 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.

83. Yuan, J., Nie, L., Zeng, D., Luo, X., Tang, F., Ding ? L., Liu, Qi., Guo, M., Yao, S. « Simultaneous determination of nine aristolochic acid and analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid chromatography» Talanta N°13, college, China (2007), pp. 644-650.(a)

84. 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(b).

85. 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.
86. Blanc-daire, L., « Plantes et régimes» Edition Nathan, (1983),pp 207.
87. bn El-baytar. F «الجامع لمفردات الادوية و الاغذية» volume 1, Edition dar el dawaa, beyrouth, (1982), pp.179.
88. Gicunochet, M. « Flore de France » Edition Centre National de la Recherche Scientifique, vol 3, fascicule 3, Paris, (1978), pp.858.
89. Walter, S., « Botanique Systématique, Une perspective phylogénétique » ISBN, Boeck université, (2001), pp.173.
90. Lechevalier, P., « Arbre et fleurs de pleine terre » vol 2. Paris,(1952), 610p.
91. Vries, L., « French-English, Science dictionary for students in agricultural» Edition MC Graw-Hill, Michigan, (1962),pp. 655.
92. Hou, D., « Flora of Taiwan, editorial Committee of the flora of Taiwan» volume 2, Taipei, Taiwan, (1996), pp.637.
93. Jalas, J., Suominen, J., " Atlas florae Europaeae, Distribution of vascular plants in Europe: Cambridge University Press,(1988),115p.
94. Ait Youssef, M., "Plantes médicinales de Kabylie". Edition Ibis Press, (2006), 349p.
95. Battandier , Trabut. «Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie» Edition Giralt, Alger, (1902), pp460.
96. De Pascual, T.T., Julio, G. U., Alvaro , F., Vaquero, M. D. A., «Lipid components of *Aristolochia longa*», *Phytochemistry*, Volume 23, n°2, Spain, (1984), pp 461 - 462.
97. Chaumeton, F .P., Turpin, P.J., «Flore médicale», Tome I, C.L.F. Panckoucke, Paris,(1814), pp 115 - 116.
98. Archil, R., «Elément d'histoire naturelle médicale», Edition Bechet, Paris, (1831), pp 63, 436 - 439.
99. 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.
100. Evert, T., « Etude ethnobotanique, ethnozoolique et de la faune de la forêt sacrée de Zaïpobly », Université de Gent, Belgique.

101. Bonne-Maison, J., « Les fondements géographiques d'une identité », Histoire et géosymbole, Tome II,(1997), pp90-91.
102. Walter, A., Leboi, V., « Jardin d'Océanie », Edition IRD, (2003), 325p.
103. Dowe, J., Cabalion, P., « Taxonomie Account of *Arecaceae* in Vanuatu », Edition Orstom, Australie,(1996), 256p.
- 104 Harris, D.,” A revision of the irvingiaceae in Africa”, Nat. Belg. 65,(1996), pp 143-196.
105. Aameeruddy, G., « Conservation of environment seen through the prism of local representations.” People and plants. 3,(1994), pp189-191.
106. Eyzaguirre, P., « Ethnobotanical information in plant genetic resources. » International Plant Documentations, 21,(1995), pp13-14.
107. Shepherd, G., Okafor, J.C.,” Cameron forest management and regeneration project”, Academic Press, 53,(1991), pp 131-150.
108. Okafor, J.C.,” Varietal delimitation in *Irvingia gabonensis*. “Nat. Belg 45, (1998), pp 211-221.
109. 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(AFSSA), février (2007).
110. Kamoun, P., «Appareil et méthode en biochimie et biologie moléculaire», Edition Flammarion, Paris, (1997).
111. Kamoun, P., «Appareil et méthode en biochimie», deuxième édition, Flammarion, Paris, (1977), pp 85-182.
112. Di Benedetto, D., Breuil, P., “Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible”. Techniques de l'Ingénieur, V 2 : 2795, (2007), pp 2-20.
113. Auge, R.,Beauchesne, G., Boccom Gibod, J.,Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Meynier, R., Morand, J.C.L., Reynoird, J., Sturullu, D.G., Vidalie, M., « La culture *in vitro* et ses applications horticoles » Edition Tec et Doc, (1989), 256p.
114. Zryd, J.P., « Cultures de cellules, tissus et organes végétaux » Edition Press polytechniques Romandes, (1988), 308p.
115. Tourte, Y., « Génie génétique et biotechnologie .» Edition Dunod, Paris,(2002), 200p.
116. Haicour, R.,« Biotechnologie végétales »,Techniquesde laboratoire ,Paris, (2002), 273p.

117. Doré, C., Varoquaux, F., « Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées » Edition Quae, (2006).198p.
118. Margara, J., « Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogénèse. » INRA, Paris, (1982).288p.
119. 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»,Bull Laboratoire de Biochimie, d'environnement et d'Agroalimentaire, Maroc,N°7 (2006), p 10-14.
120. Martin, P. P, Gagnard. J, Gautier. P, Drouineau. G, «L'analyse végétale de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales » Edition Lavoisier, Paris, (1984).
121. Pinta, M., «Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux », Oléagineux, n°2, France (1973), p1.
122. 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.
123. 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).
124. Foungeb, S., Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., Paris, R. R ., «Sur une Hypericaceae de Madagascar l'*Elialea articulata* Cambess», Plantes médicinales et Phytothérapie, Tome 3, Paris, (1969), pp 197 - 198.
125. William. B. J, «The original of the soxhlet extractor », Journal of Chemical Education, Volume 84, n°12, Canada,(2007), pp1913.
126. Meuwly, D., «Séparation des alcaloïdes de l'opium par chromatographie sur couche mince», Collection Woodner, New York, (1992), p 18.
127. Paris, R. R., Moyse, H., « Matière médicale », Tome 2, Edition Masson, Paris, (1981), 116p.
128. Carreras, L.M., « Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica* L.», Anales del instituto botanico, n°30, Cavanilles, (1973), pp 253 – 265.
129. 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 Biotechnologies animales et végétales, Université de Blida -Algérie, Novembre (2007).

130. Lucchesi, M.E., « Extraction sans solvant assistée par Micro-ondes, Conception et application à l'extraction des huiles essentielles. », Thèse de Doctorat en Sciences , discipline : chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies, Canada,(2005), 143p.
131. Murashige, T., Skoog, F., «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.» *Physiology of Plants*, Vol 15, (1962), pp.473-497.
132. Skoog, F., Miller, C.O., « Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro» *Symposium experimental biology*,(1957), pp.118-130.
133. Skirvin, R.M., « Introduction to horticulture. » *Stripes Pub*,(2004), pp.425.
134. Dagnelie, P., « Statistique théorique et applications. » *Boeck université*,(2007), pp512.
135. Hodgson, E., « A text book of modern toxicology. » third edition Hoboken, John Wiley and sons, Inc, New Jersey and Canada, (2005), 557p 63-218.
136. Stelljes, M.E., "Toxicology of Non toxicologists." *Government Institutes: an imprint of the scarecrow Press, Inc, USA*,(2008), 207p 61-63.
137. Anderson, D., Conning, D.M., "Experimental toxicology, the basic issues.", second edition , *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, (1993), 566 p, 8-10
138. Derelanko, M.J., "Toxicologists pocket handbook". *CRC Press LLC, Boca Raton, London , New York*,(2000), 231p, 145, 188, 202, 225.
139. Calzoni. G. L, «Atlas de la structure des plantes: Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos», *Annas Peranza, Paris*,(2006), pp 157.
140. Paris, P.,Moyse,H., « Pharmacognosie générale. » *Edition Masson*,(1965), 491p.
141. Jonatham. H. V, «Est-il pertinent d'ajouter des nitrites dans les aliments», *Institut de Technologie Agroalimentaire, Campus de St- Hyacithe*,(2007), p 127.
142. 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.
143. 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>
144. Palmaria –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.

145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. Souèges, R., « La vie Végétale, La dynamique de la vie » Edition Flammarion, (1949), 301p.
149. Canela, N., Ferro, E., Alvarenga, N.,” Chemical Composition of the Essential Oil of *Aristolochia gibertii* Hooker from Paraguay.” *J. Essent. Oil Res.*, 16,(2004), 566-567.
150. Yu, Q.J., Liao, Z.X., Cai, X.Q. , Lei, J.C., Zou, G.L., « Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23,(2007), 162-167.
151. Martini, M.C., « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. » Edition Lavoisier, 2^{ème} édition,(2006).
152. Menendez, J.A.,Vellon, L., Colomer , R., Lupu, R., « Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her- 2/neu expression and synergically enhances the growth inhibitory effects of herceptin (TM) in breast cancer cells with Her-2/ neu –oncogen amplification. *Ann. Onc.* 16,(2005) ,pp 359-371.
153. Meena, M.R., Sethi, V., “Antimicrobial activity of essential oils.” *J. Food. Sci.Technol* (1994)
154. Keshavarz, E.,Babiuk,L.,Gerson,D., Ceschiutti, M.J., « Lignes directrices en matière de bioécurité en Laboratoire »Public Health Agency of Canada, 2^{ème} Edition, 1996
152. De Billerbeck, V.G., « Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques »*Phytothérapie*, Vol 5 (2007) issue 5, pp249-253 .

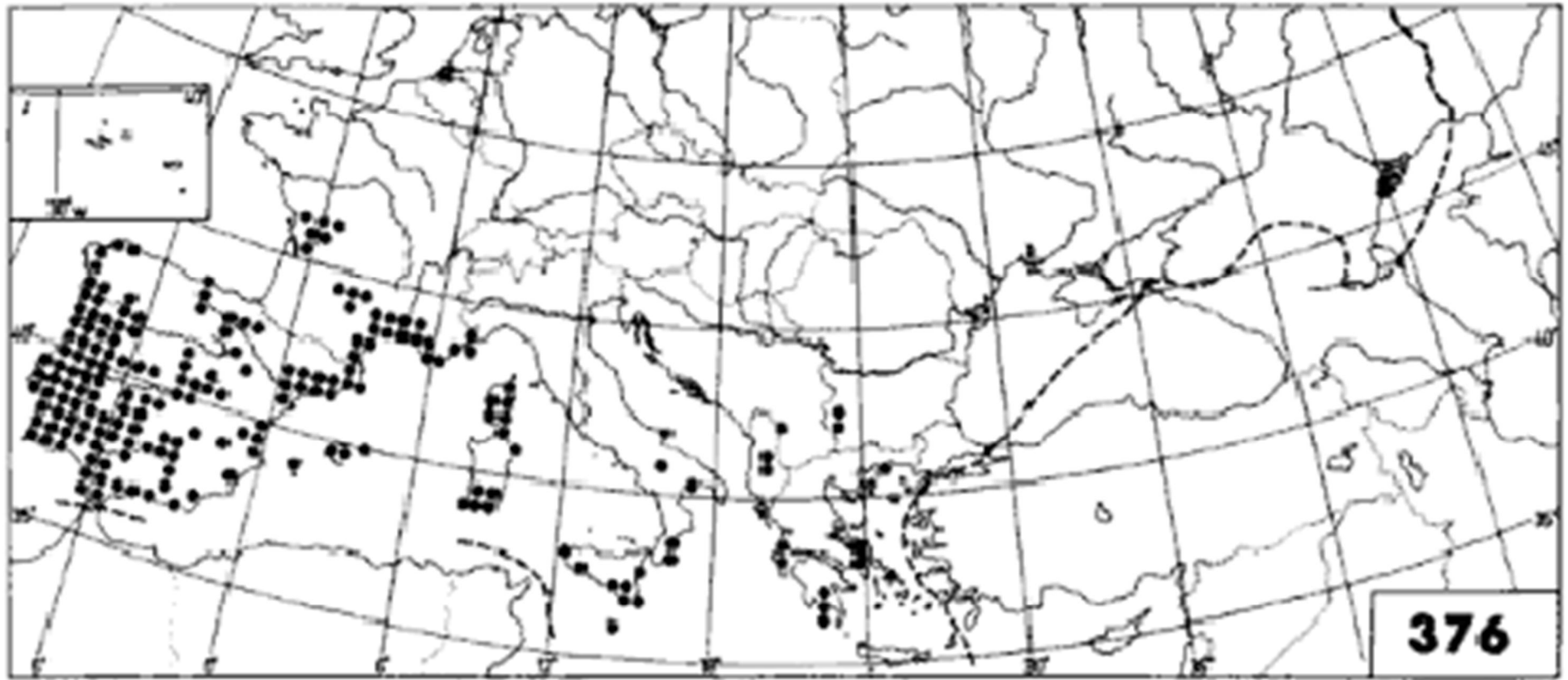
153. Bouderrah, M « Comparaison de deux modes de vitro-propagation à partir de vitro semis d'*Eucalyptus camaldulensis* provenance. » J. Plant Physiology .Vol 45 (1988), pp 102-106.
154. Gautheret, R.J., « La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations » Edition Masson, (1959), 863p.
155. Bajaj, Y.P.S., « Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and Micropropagation. » Birkhäuser, Edition Springer,(1997), 395p.
156. Ait chitt, M, « Problèmes rencontrés en culture *in vitro* du palmier (*Phoenix dactylifera* L.) par la technique d'organogenèse » In compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du Palmier dattier, Institut National de la Recherche Agronomique, Marrakech, Morocco, 9-12 (1989), pp.27-36.
- 157.Boxus. P.H. « La maîtrise des techniques de multiplication *in vitro* : réalités et perspectives » annales de Gembloux, 96, (1990), pp.33-42.
- 158.Hopkins. G « Physiologie végétale » Edition Boeck Université, (2003),312p.
- 159.Selvakumar, V., Balakumar, T.,« *In vitro* propagation of the medicinal plant *Aristolochia indica* L.through nodal explants»University of Florida,(2006)pp.3019
- 160.Bravo, C., Yormann, G., Liorente, B., « Micropropagation of *Aristolochia fimbriata*» Congress medical and aromatic plants, (1997), pp. 502.
- 161.Hedman, Y., «Studies of root formation of micropropagated shoots *in vitro* and cuttings from light treated mother plants *ex vitro* of Manchurian Dutchman's pipe (*Aristolochia anshuriensis*)» Horticultural Science, ALNARP, (2005), pp.36.
- 162.Wright, K., Northcote, D., « Differences of ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses» J. Cell.Sci, 12, (1973), pp.37-53.
- 163.Sacristan, M., Melchers, G., « The Caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tabacc» Molecular and General Genetics MGG, Springer Berlin / Heidelberg, (1969), pp.317-333.
- 164.Quoirin, M., Boxus, Ph., Gasper, Th., « Root initiation and isoperoxidases of stem tip cutting from mature *Prunus* plants» physiologie végétale 12, School of Agriculture, Aristotle University Thessaloniki, Greece, (1974), pp.165-174.
- 165.Druart, P., Kevers, C.,Boxus, Ph., Gasper, Th., « *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases » Z. P .flanzenphysiol , Vol 108, (1983), pp.429-436.

166. Morel, G., Muller, J.F., «La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre» *Compte rendus*. Vol 258,(1964), pp.5250-5252.
167. Gallais, A., Bannerot, H., « Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection » Edition Quae, pp.768.
168. Leifert, C., Ritchie, J.Y., Whites, W.M., « Contaminants of plant tissue and cell cultures» *World J. microbial and biotech.* Vol7, (1991), pp.542-469.
169. Moncousin, C., «Rooting of *in vitro* cuttings. In biotechnology in agriculture and forestry, high tech and micropropagation » Vol17, Springer-Verlag, Berlin, (1991), pp.231-261.
170. Auderset, G., Gavillet, S., Michel, J., Ribaux, M., «Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the *in vitro* rooting of *Me domestica* » *Borekh, Jork 9, Adv, Hort.Sci.*8,(1984), pp.5-10.
171. Favre, J.M., « La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale » *uni, Paris*, (1977), pp.37-52.
172. Hartmann, T., Kester, D.E., « Plant propagation principales and practices » *Hall, INC, Engenvod, Chiffs N.S, USA 4*, (1993), pp. 727.
173. Lutz, A., « L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissus et de cellules » *Bulletin Scientifique botanique* 132, France, (1985), pp.35-50.
174. Nozeran, R., «L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes » *Actualités botaniques, Paris*, (1985), pp.11-21.
175. Thorpe, T.A., Gaspar, Th., « Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus *in vitro* » *J. physiology*, Vol14, (1978), pp.522-526.
176. Negrutiu, T., Jacobs, Gaspar, Th., « Leaf formation from *arabidopsis callus* » *Z.P. flanzentphysiol.* 91, (1979), pp.119-126.
177. Jones. O.P « Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots » *nature* 626, (1976), pp.392-393.
178. Gaspar, Th., Smith, D., Thorpe, T., «Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogenèse» *C.R. Acad. Sci. Série D* 285, Paris, (1977), pp. 327-330
179. Gaspar, Th., Kevers, C., Debergh, R., « Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects », in : Cell and tissue culture in forestry » volume1, General principles and biotechnology, Edition Bonga, (1987),316p.

180. Jones, O.P « Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots » Nature 626, (1976), pp.392-393.
181. Crevecoeur, M., Kevers, C., Greppin, H., Gaspar, Th., “A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli.” *Biologia Plantarum*, Vol19, (1987), pp 1-6.
182. Lee. N, Wetzstein. H.Y, Sommer. H. E « Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival » *plant physiology* 78, (1985), pp.637-641.
183. Multon, J.L., “Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries Agroalimentaires. » Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris, (1992), pp 263 ,280, 555.
184. Cabaret, J., “ 167 plantes pour soigner les animaux.” Edition point vétérinaire, (1986), 192p.
185. Viala, A., “Elément de toxicologie.” TECH et DOC,(1998), 512p.
186. Hwang, M.S., Park, M, Moon,J.S, Yum,Y., Lee,H., Lee, B.M., Yang, K.H., “ Subchronic toxicity studies of the aqueous extract of *Aristolochia fructus* in Sprague- Dawley rats. ” *J. Toxicol. Environ Health*, Vol 69,(2006), pp 2157-2165.
187. 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.
188. 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.
189. Yeh. Y. H, Lee. Y. T, Hsieh. 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.
190. 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 (2003), pp 1011 - 1017.
191. 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.
192. Flurer, C., Rick, A., « Determination of aristolochic acid in traditional Chinese medicines and dietary supplements. » *FAD laboratory*, 16,(2003), pp 4212-4213.

193. Ioset. J-R et al. «Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens» institut de pharmacognosie et phytochimie, BEP, université de Lausanne, switzerland, (2003) pp.29-36
194. 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.
195. Arlt. V M, Pfohl-Lezkowicz A, Cosyns. J. P, Schmeizer. 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.
196. 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.
197. Schmeizer. H. H, «Chemical and molecular basis of toxicity of *Aristolochia* and plants containing pyrrolizidine alkaloids», Toxicology, n°240, Germany, 2007, p 147.
198. 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



Aristolochia longa

Figure 1.9 Carte représentant la Répartition d'*Aristolochia longa* L. en Europe (Jalas, et suominen, 1988)

APPENDICE A

Tableau 1.2: structure chimique des acides aristolochoïques et l'aristolactame la isolées à partir d'*Aristolochia longa* L.

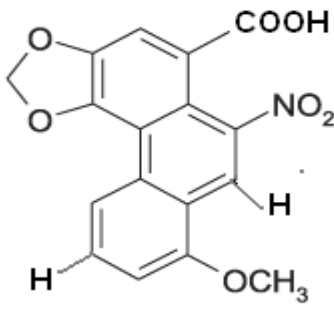
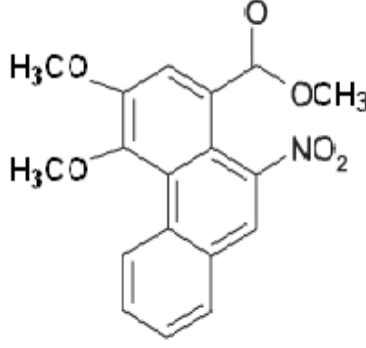
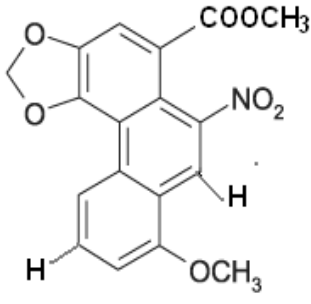
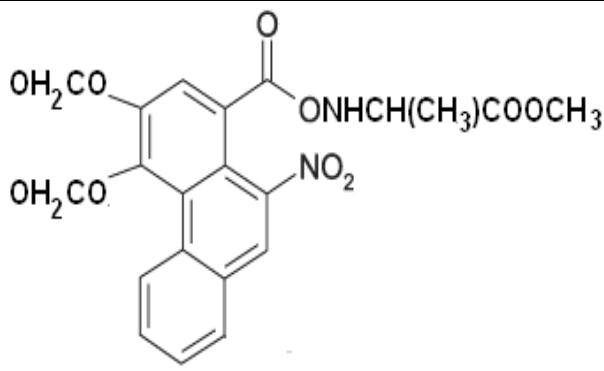
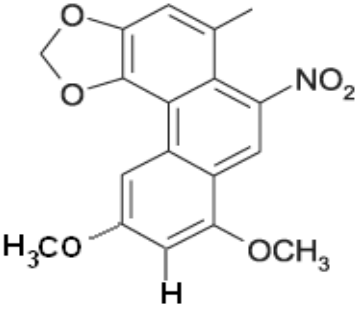
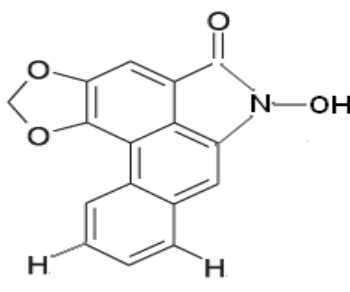
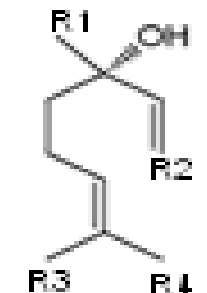
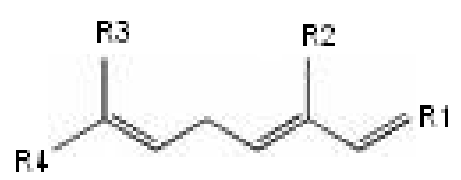
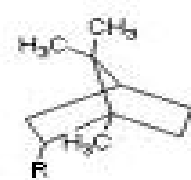
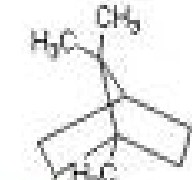
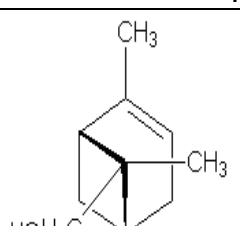
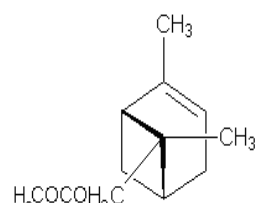
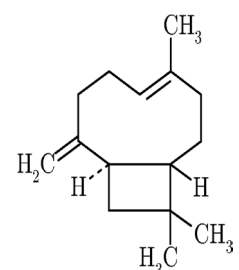
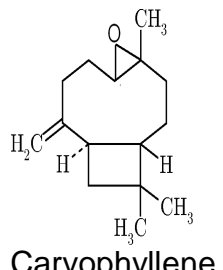
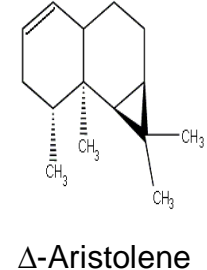
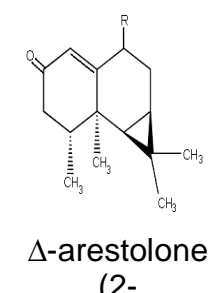
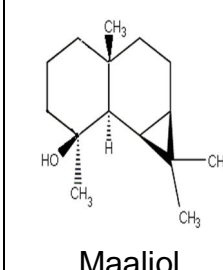
Les acides aristolochoïques		
 <p>Acide aristolochoïque I</p>	 <p>Acide aristolochoïque II</p>	 <p>Acide aristolochoïque III</p>
 <p>Acide aristolochoïque IV methyl ester</p>	 <p>2-Phenanthro-[3.4-d]-1.3-dioxole-6-nitro-5-carboxamidopropanoïque methyl ester</p>	
Aristolactames		
 <p>Aristolactame Ia</p>		

Tableau 1.4: Structure chimique des huiles essentielles chez *Aristolochia longa* L.

Monoterpanoïdes acycliques				
 <p>R₁ OH R₂ R₃ R₄ R₁=R₃=R₄=CH₃ R₂=CH₂ Linalool -(s)</p>		 <p>R₃ R₂ R₁ R₄ R₂=R₃=R₄=CH₃ R₁=CH₂ Ocimene-β</p>		
Monoterpanoïdes bicycliques				
Camphanes		Pinanes		
 <p>R=COCH₃ Bornyl acétate</p>	 <p>Bornanol</p>	 <p>CH₃ HOH₂C Pin-2-en-8-ol</p>	 <p>CH₃ H₃COCOCH₂C 8-Acétoxy-pin-2-ene</p>	
Sesquiterpanoïdes				
Caryophyllanes		Aristolanes		
 <p>CH₃ H₂C β-Caryophyllene</p>	 <p>CH₃ H₂C Caryophyllene oxyde</p>	 <p>CH₃ CH₃ CH₃ Δ-Aristolene (calarene)</p>	 <p>R CH₃ CH₃ CH₃ Δ-arestone (2-oxocalarene)</p>	 <p>CH₃ HO CH₃ Maaliol</p>

APPENDICE B

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
- Dispositif d'hydrodistillation
- Evaporateur rotatif de marque Quickfit RE100/R
- Spectrophotomètre UV-visible
- Spectrophotomètre infra rouge de Fourier (FTIR)
- Appareil de chromatographie ionique ICS3000
- Spectrophotomètre d'absorption atomique
- Appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de type SHIMATZU
- Appareil de chromatographie en phase gazeuse (CG 6890 N) couplé à une spectrophotométrie de masse (5973 N Agilent technologie)
- Appareil de chromatographie en phase gazeuse, type SHIMATZU, CG17A
- 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 d'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 d'un mélange d'acide aristolochique I 29% et de l'acide aristolochique II 69%.
- Standard de l'acide aristolochique : ampoule SIGMA A-5514 lot 035k0890 contenant 25mg de poudre jaune de l'acide aristolochique. Formé du mélange d'acide aristolochique I 66.13%, et de l'acide aristolochique II 33.87%
- 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 Erlenmeyers (50ml, 100ml et 300ml)
 - tubes à essai
 - ballon
 - boîte de Pétri
 - disque en papier filtre
 - milieu de culture soja- agra, milieu Sabouraud, milieu Muller- Hinton

Recherche Ethnobotanique

Questionnaire N°:1

Age, Sexe, Région, Fonction
Région de la récolte de la plante
Période de récolte
Partie utilisée
Nature du traitement pour lequel est administrée la plante
Mode d'emploi
Nature du résultat : + ou -
Effets secondaires

Questionnaire N°:2

Sexe :

الجنس :

Age :

العمر :

Région :

المنطقة :

Fonction :

المهنة :

1- Connaissez-vous la phytothérapie ?

- Oui
- Non

1- هل تعرفون الطب التقليدي (التداوي بالأعشاب)؟

- نعم
- لا

2- Si oui, comment vous la connaissez ?

- Avez-vous entendu parler
- Avez-vous été déjà soigné par la phytothérapie ?

2- إذا كان نعم، كيف تعرفونها ؟

- هل سمعتم بها ؟
- هل تداويتم بالأعشاب الطبيّة من قبل ؟

3- Connaissez-vous l'aristoloche ?

- Oui
- Non

3- هل تعرفون هذه النبتة :برستم أو عنق الجمل أو

فقوس الغول أو قنا الحية أو بوبرالة أو اجرزخي ؟

- نعم
- لا

4- Comment la connaissez-vous ?

- Utilisé par une personne de votre entourage ?
- Utilisé par vous-même

4- إذا كان نعم ، كيف تعرفونها ؟

- هل استعملها شخص من معارفكم ؟
- هل استعملتموها شخصيًا ؟

5- Dans quelles maladies est –elle utilisée ?

5- في أيّ مرض استعملتموها ؟

6- Quelle est la partie utilisée de la plante ?

- La racine
- Les feuilles

6- ما هو الجزء المستعمل ؟

- الجذور
- الأوراق

7- Son mode d'emploi

7- طريقة استعمالها (كيف تناولتها) ؟

8- Est ce que le résultat est positif ?

- Oui
- Non

8- هل كانت النتائج ايجابية ؟

- نعم
- لا

9- Ya t-il des effets secondaires ?

- Oui
- Non

9- هل لها تأثيرات سلبية ؟

- نعم
- لا

10- Préférez-vous :

- Un traitement naturel
- Un traitement médical
- Les deux

10- هل تفضّلون :

- التداوي بالأعشاب
- التداوي بالطب الحديث
- الاثنين معًا

APPENDICE C

Tableau 3.1 : Résultat de l'enquête ethnobotanique avec les spécialistes

Individu	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
1	Herboriste Ghardaïa	Bouroustoum Katsa elhya Ajrarkhi	+	Mitidja Est	Mai Septembre	Racine Feuille	Hémorroïde Diabète Hypertension L'estomac Cancer Cicatrisation des plaies	-Les feuilles en infusion -Petite quantité de rhizome en poudre mélangé au miel usage interne ou externe	+	+
2	Herboriste Ghardaïa	Bouroustoum Katsa elhya	+	Lieu humide	Mai	Racine	Diabète L'estomac Cancer Les plaies	-Petite quantité de rhizome en poudre mélangé au miel ou les dattes	+	+
3	Herboriste Ghardaïa	Bouroustoum Katsa elhya	+	Mitidja Tizi ousou	Mai Septembre	Racine Feuille	Diabète Hypertension Les plaies L'anémie	-Les feuilles en infusion -Le rhizome en poudre mélangé avec du miel ou les dattes	+	+
4	Herboriste Blida	Bouroustoum Katsa elhya	+	Prairie Lieu humide	Automne	Racine	Hémorroïde Diabète	-Mélange le rhizome avec le miel	+	+
5	Herboriste Blida	Bouroustoum Katsa elhya	+	Lieu humide et ombré	Automne	Racine	Hémorroïde Diabète Cancer Les plaies	-Mélange du rhizome avec du miel ou les dattes	+	+
6	Herboriste Blida	Bouroustoum Katsa elhya	+	Annaba Grande Kabylie	Automne	Racine Feuille	Hémorroïde Diabète Cancer Cicatrisation des plaies	-Les feuilles en infusion -Le rhizome en poudre mélangé avec du miel ou les dattes	+	+

Individu	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
7	Herboriste Blida	Bouroustoum Katsa elhya	+	Annaba Grande Kabylie	Automne	Racine	Hémorroïde Diabète L'estomac Cancer	-Le rhizome en poudre mélangé avec du miel ou les dattes	+	+
8	Herboriste Blida	Bouroustoum Katsa elhya Fgous eryoul Ajrarkhi	+	Lieu humide et ombré	Mai Septembre	Racine Feuille	Diabète L'estomac Cancer Hémorroïde Cicatrisation des plaies	-Les feuilles en infusion -Le rhizome en poudre mélangé avec du miel ou les dattes	+	+
9	Médecin phytothérapeute Blida	Bouroustoum Katsa elhya	+	Lieu humide et ombré	Automne	Racine	Hémorroïde Cancer Cicatrisation des plaies	-Le rhizome broyé en poudre avec du miel	+	+
10	Médecin phytothérapeute Blida	Bouroustoum Katsa elhya Ajrarkhi	+	Lieu humide et ombré	Automne Septembre	Racine	Hémorroïde Cancer Cicatrisation des plaies	-Le rhizome broyé en poudre avec du miel	+	+
11	Herboriste Constantine	Bouroustoum Ajrarkhi	+	Nord et Est de l'Algérie	Automne	Racine	Diabète Cancer Les plaies	-Les feuilles en infusion -Le rhizome broyé en poudre avec du miel	+	+

Partie phytochimie

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

	Tubercules			Feuilles		
	PI	PS	%	PI	PS	%
1 ^{er} essai	150,2421	44,4825	70,3928	20,3641	06,1815	69,6451
2 ^{ème} essai	69,2126	20,4981	70,3839	35,1261	10,6625	69,6451
3 ^{ème} essai	26,0652	07,7184	70,3881	37,3403	11,3345	69,6454
4 ^{ème} essai	29,6633	08,7835	70,3893	15,3095	04,6469	69,6469
5 ^{ème} 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 ^{er} essai	01,0489	00,0224	02,1356
2 ^{ème} essai	01,0004	00,0214	02,1391
3 ^{ème} 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 ^{er} essai	200,1	11,00	05,2378	32,7363
2 ^{ème} essai	200,0	10,90	05,450	34,0625
3 ^{ème} essai	200,3	11,00	04,9993	31,2456
Moyenne	200,1333	10,9667	05,2290	32,6815
Ecart-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.

Teneur en matière polaire des tubercules et des feuilles

	Tubercules			Feuilles		
	PP (en g)	PMP (en g)	%	PP (en g)	PMP (en g)	%
1 ^{er} essai	10,0083	01,7759	17,7443	10,0001	00,8635	08,6349
2 ^{ème} essai	10,0008	01,7745	17,7436	10,0000	00,8634	08,6340
3 ^{ème} 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.

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

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 ^{er} essai	100,0025	24,9	00,0249	50,0014	05,1	00,0102
2 ^{ème} essai	100,0006	25,2	00,0252	50,0024	04,8	00,0096
2 ^{ème} 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 ^{er} essai	100,0017	69,9	00,0699
2 ^{ème} essai	100,0010	69,7	00,0697
3 ^{ème} 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

APPENDICE D
LISTE DES SYNONYMES ET DES ABREVIATIONS

A°: Angstrom

Ac Ar : Acide aristolochique

Ac Ar I : Acide aristolochique I

Ac Ar II : Acide aristolochique II

2-4D :Acide 2-4 Dichlorophénoxyacétique

ADN : acide désoxy-ribo-nucléique

AIA : Acide Indole -3 Acétique

AIB : Acide Indole Butyrique

ANA : Acide Naphtalène Acétique

App : APPENDICE

APS : Acide Périodique et Schiff

BAP : Benzyladénine = 6-Benzyl AminoPurine

°C: Degré Celsius

CCM: Chromatographie sur couche mince

CHN: Néphrotoxicité chronique provoquée par les plantes

CG/MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

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

Cm: Centimètre

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

ENARP : Entreprise National d'Aménagement des Réserves des Parcs nationaux et de loisirs

G: gramme

GA₃ : Acide Gibbérellique

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

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

IPA :IsoPenténylAminopurine

Kin : Kinétine = 6-furfuryl-aminopurine

MS : Murashige et Skoog

SbC : Sub-Culture

g: pesanteur

Rf: facteur de rétention

UV: Ultraviolet

SAA: spectrométrie d'absorption atomique

μl: Microlitre

μg: Microgramme

GLOSSAIRE

- Âcre : qui irrite les organes de gout 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 les graines 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.
- Callogenèse : Néoformation d'un cal
- 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.
- Caulogénèse :

Ce terme signifie, étymologiquement, formation d'une tige. Mais il est communément employé pour désigner la formation des bourgeons à l'origine des tiges feuillées. Dans le cas de l'organogénèse *in vitro* il est souvent utilisé comme synonyme de néoformation de bourgeons.

- 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).
- Dédifférenciation cellulaire :

Retour progressif de cellules différenciées vers l'état méristématique. Les cellules dédifférenciées comme les cellules méristématiques possèdent à des degrés divers les caractéristiques cytologiques des cellules embryonnaires : vacuole réduite, rapport « nucléo-plasmique » élevé, plastides peu différenciés ou proplastides.

Elles recouvrent l'aptitude aux divisions (activité mitotique). Elles peuvent devenir également capables d'exprimer la « totipotence » fondamentale de la cellule, en produisant à la suite de divisions successives des embryoides ou des proméristèmes évoluant en méristèmes primaires de racine ou de tige. Elle est souvent favorisée par les conditions de la culture in vitro.

- Différenciation cellulaire :

Perte progressive des caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et acquisition des caractéristiques des cellules adultes, éventuellement liée à la spécialisation.

La cellule végétale adulte est généralement caractérisée par sa grande vacuole centrale, le rapport « nucléo-plasmique » faible.

- 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 mâle 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 voies respiratoires.

- Explant : Fragment d'organisme (apex, organe, fragment d'organe ou fragment tissulaire) excisé et éventuellement mis en culture *in vitro*.
- Eutocique : qui est relatif à l'eutocie ; accouchement qui se déroule de façon normale.
- 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.
- Fistule : 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 (fistule interne) ou dans les cavités internes (fistule 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.
- 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 secrétée 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.
- Multiplication végétative : Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes
- Napiforme: ayant la forme d'un navet.
- Nauséux (euse) : qui donne l'envie de vomir.
- Nectaire : organe végétal sécrétant le nectar.

- Néof ormation : Formation de structures nouvelles : tissus, méristèmes, embry oïdes.
La néof ormation est l'aboutissement d'une dédifférenciation.
- 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.
- Organogenèse : Formation des organes. L'organogenèse végétative se situe essentiellement au niveau des méristèmes.
- 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.
- *Rhizogenèse* : Formation de racines
- 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
- Totipotence cellulaire : Aptitude des cellules à exprimer la totalité des potentialités du génome. Cette aptitude se révèle dans les cas d'embryogenèse somatique.
- 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.
- Vulnérable : En médecine et en pharmacie qui aide à la guérison des blessures.