

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم بيولوجيا تجمعات الكائنات الحية

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire

En vue de L'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Génomique et Biotechnologies Végétales.

Thème

Exploration Phytochimique et Biotechnologique (Culture *in vitro*) de *Zygophyllum album L.* et évaluation de ses activités hypoglycémiantes et anti-inflammatoires.

Soutenu publiquement le : 08 Octobre 2017

Présenté par :

Mlle. SELMANE Rayhana

Mlle. BEN ACHOUR Rawaa

Devant le Jury :

Présidente : Mme. FAIDI H.

MAA/BPO BLIDA 1

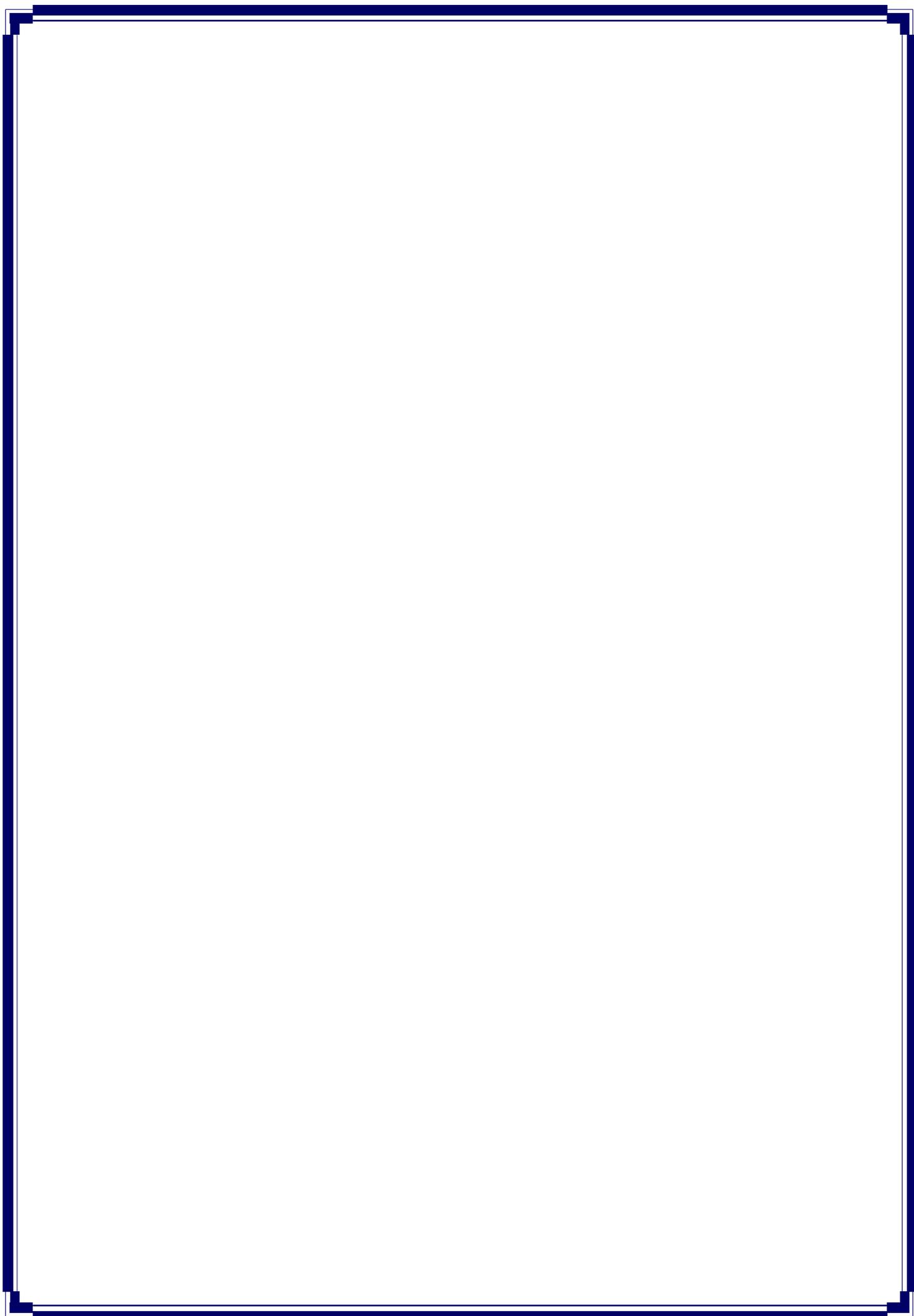
Examinatrice : Mme. BENASSEL N.

MAA/BPO BLIDA 1

Promotrice : Mme. AYADI R.

MCB/Biotechnologie BLIDA 1

Année Universitaire 2016/2017



Remerciement

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de « Mme AYADI R » Maître de conférence à l'Université Blida 1, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, ses précieux conseils et orientations, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mme FAIDI H maitre assistante A à l'Université Blida 1 en étant président du jury et Mme BENASSEL N maitre assistante A à l'Université Blida 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mesdames « Issemyani » et « Hadj Bachir » Ingénieure au laboratoire de recherche « Amélioration des plantes et physiologie végétale » de l'université de Blida 1 ainsi qu'à tous ceux qui nous ont aidés à réaliser ce modeste travail.

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues et à tout ce qui ont participé à réaliser ce mémoire. Ainsi qu'à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

Dédicace

A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon coeur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

*A mon frère Mohamed Safouane et ma sœur Aya
A qui je souhaite un avenir radieux et plein de réussite*

A mon encadreuse Mme Ayadi R, pour son aide, sa gentillesse et son accueil chaleureux, Qu'elle trouve ici l'expression de ma haute considération, mon respect que dieu vous procure bonne santé et long vie.

A toute ma famille « Ben Achour » ainsi qu'à mes amis sans exception.

A mon binôme Rayhana

Je te remercie pour ton soutien moral, ta patience et ton dévouement.

A mes collègues du laboratoire qui nous ont aidés.

A mes camarades de promotion Génomique et Biotechnologie végétale.

RAWAA

Dédicace

À mes très chers parents

Abi & Ommi, Tous les mots de révérence ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

À Mes chers frères Zoubir, Tayeb et Abd nour qui n'ont cessé d'être mon meilleurs exemples de persévérance, de courage et de générosité

À mon âme sœur Oumaima, je te souhaite une vie merveilleuse, heureuse et pleine de bonnes promesses

À mes nièces, Asmaa et Basma et mon cher neveu Abd allah, long vie pleine de joie

À mon encadreuse Madame Ayadi R, que dieu vous bénisse et récompense car, mes mots expressifs restent faibles pour énoncer ma gratitude hautement profonde.

À toute ma famille paternelle Selmane et maternelle Bakir

À mon binôme, Rawaa qui m'a supporté durant notre travail et en qui j'ai trouvé l'entente et la subvention dont j'avais besoin.

À tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur et à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin.

Rayhana

Liste des figures

Figure 1 : Les espèces de la famille des Zygophyllaceae	4
Figure 2 : <i>Zygophyllum album</i> L	5
Figure 3 : Feuilles de <i>Z. album</i> (Anonyme)	7
Figure 4 : Fleurs de <i>Z. album</i> (Anonyme).	7
Figure 5 : Fruits de <i>Z. album</i> (Anonyme)	7
Figure 6 : Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires	8
Figure 7 : Acide benzoïque (Pawlowska <i>et al</i> ; 2006)	10
Figure 8 : Acide cinamique (Gorham, 1977)	10
Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003)	10
Figure 10 : structure d'isoprène (Benaissa, 2011)	12
Figure 11 : Rôles des auxines et cytokinines dans le développement des plantes	18
Figure 12 : Représentation schématique d'une infection par <i>Agrobacterium</i> (Umber, 2004).....	20
Figure 13 : Méthode de l'infection, de la co-culture et de l'isolement des racines induites ...	21
Figure 14 : Deux lignées de CRs sélectionnées par Sahli et Gadiri (2015)	22
Figure 15 : A, B, C, les différentes parties de travail de la plante <i>Zygophyllum album</i> L.....	24
Figure 16 : les souris albinos utilisé pour les activités biologiques	25
Figure 17 : Protocole expérimentale d'extraction, de dosage des polyphénols totaux	30
Figure 18 : Récupération de La solution aqueuse obtenue par le méthanol	30
Figure 19 : Administration des suspensions par gavage et mesurations de taux du glycémie à l'aide d'un glucomètre	33
Figure 20 : Diagramme expérimentale de l'activité anti-hyperglycémie de l'extrait aqueux de <i>Z. album</i>	34
Figure 21 : Administration des suspensions par gavage	35
Figure 22 : Injection de la carragénine (1%) par voie sous cutanée	36
Figure 23 : Coupure des pattes postérieures au niveau de l'articulation	36
Figure 24 : Diagramme expérimentale de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de <i>Z. album</i>	37
Figure 25 : les capsules de <i>Z. album</i>	38
Figure 26 : les graines de <i>Z. album</i> après désinfection sous la hotte	38
Figure 27 : Diagramme d'essai d'obtention des vitroplants	41
Figure 28 : la mise en culture des chevelus racinaire dans un milieu liquide	43
Figure 29 : Diagramme des différentes méthodes expérimentales	44

Figure 30 : Quelques résultats de screening phytochimique	46
Figure 31 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	48
Figure 32 : L'évolution de la glycémie moyenne enregistrée chez les souris	50
Figure 33 : pourcentage de réduction de la glycémie moyenne chez les souris	51
Figure 34 : l'évolution de l'inflammation chez les souris pour chaque lot	52
Figure 35 : Résultat global du germination des graines de <i>Zygophyllum album</i>	55
Figure 36 : résultats de germination des graines de <i>Zygophyllum album</i> . Traités par différentes balances hormonales.....	56
Figure 37 : Les plantules (condition As) (saccharose) après 08 semaines	57
Figure 38 : Les plantules (condition A) (glucose) après 08 semaines	57
Figure 39 : formation de bourgeons dans la condition C	58
Figure 40 : formations de Callogenèse des plantules de dose D et J	59
Figure 41 : les chevelus racinaires de <i>Z. album</i> au T ₀ de la mise en culture	60
Figure 42 : les chevelus racinaires <i>Z. album</i> après 15 jours de la mise en culture	60
Figure 43 : les chevelus racinaires <i>Z. album</i> après 1 mois de la mise en prolifération	60
Figure 44 : Chevelus racinaires de <i>Z. album</i> après 2 mois de mise en culture	61

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques études publiées sur le genre <i>Zygophyllum</i>	19
Tableau 2. Composition du milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962)	39
Tableau 3 : les différentes proportions du milieu	40
Tableau 4 : condition hormonales ANA / BAP	40
Tableau 5 : condition hormonales 2,4D / BAP	40
Tableau 6 : Résultats du screening Phytochimique de la partie aérienne de <i>Zygophyllum album</i>	45
Tableau 7 : Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique de <i>Zygophyllum album</i>	48

Liste des abréviations

AIA: Acide indole 3-acétique

BAP : Benzyl adénine

2-4D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

UV : Ultra Violet

SM : Métabolites secondaires

° C : Degré Celsius

pH : Potentiel hydrogène

MS : milieu Murashige et Skoog

AIB : Acide indol-3-butyrique

AIP: Acide indol-3-pyruvique

HCl: Acide chlorhydrique,

NH₄OH: Ammoniaque

FeCl₃: Chlorure de fer

KOH: Hydroxyde de potassium

H₂SO₄: Acide sulfurique

Al Cl₃: Chlorure d'aluminium

H.P.V.O : Hyperglycémie temporaire ou Hyperglycémie provoquée par voie orale

MS : Murashige et Skoog

CRs : Chevelus racinaires

Rpm : Rotation par minute

Le Sahara le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde possède une végétation spontanée très riche et diversifiée. Certaines espèces possèdent des biomolécules actives qui leur confèrent un intérêt médicinal.

Parmi ces espèces, on a choisi *Zygophyllum album* L. appelée localement "Aggaya", celle-ci est explorée premièrement du point de vue phytochimique et ceci en vue de déterminer les constituants chimiques de *Z. album* et son effet pharmacologique.

Les tests phytochimiques ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, tanins, saponosides, glucosides, hétérosides cardiaque, terpènes et mucilage... . L'estimation quantitative des polyphénols totaux par le dosage spectrophotométrique, a révélé la teneur de 3.88mg EQ/g d'extrait et qui nous permet d'évaluer les activités biologiques.

L'évaluation de l'activité hypoglycémiant de notre plante a révélé que l'extrait aqueux du *Z. album* est doté d'un effet anti-hypoglycémique minime à 10,24% pour une dose de 0,125 g/ml et encore plus importante à 17,4% pour la dose de 0,25g/ml ; en comparaison avec l'effet du médicament (metformine) qui permet une réduction à 39,68%.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire du *Z. album* nous a permis de confirmer que son extrait aqueux a un effet anti-inflammatoire à la dose de 0,8 mg /ml puis qu'elle a permis de réduire l'œdème à 53,63% par rapport au diclofenac (pourcentage de réduction de l'œdème 71,72%.)

La deuxième partie de notre étude est consacrée au volet biotechnologique (culture *in vitro*), et ceci en vue de créer un système de productions de cultures organisées essentiellement de type "hairy root" et un essai d'obtention de vitroplants par la germination des graines de *Z. album*.

Nous avons remarqué une croissance rapide, autotrophie aux régulateurs de croissances et des ramifications plagéotropiques des poils absorbants des chevelus racinaires.

Par ailleurs pour la germination *in vitro* des graines de *Z. album*, on a constaté un pourcentage de germination estimé à **43%** par contre le pourcentage des graines non germé est de **37%** et un pourcentage de contamination estimé à **20%**. Ainsi on note des plantules orientées vers une caulogénese et d'autres vers une callogénese, cela est dûe aux balances hormonales testées.

Mots clés :

Zygophyllum album, métabolites secondaires, screening phytochimique, culture *in vitro*, chevelus racinaires, activités biologiques.

تتمتع الصحراء الاكثر اتساعا والاشد حرارة من بين صحاري العالم بنباتات برية ذات فوائد كثيرة, غنية و متنوعة. بعضها تمتلك جزيئات حيوية فعالة ذات فائدة طبية. من بين هذه الانواع اخترنا نبتة *Zygophyllum album*. التي تسمى محليا "العقاية".

تمت دراستها أولا من الناحية الكيميائية النباتية و هذا من أجل تحديد المكونات الكيميائية الموجودة بهاو مدى تأثيرها الدوائي

بينت الاختبارات الكيميائية على احتواء نبتة العقاية لكل من:

.Hétérosides cardiaque, mucilage, flavonoïdes, tanins, saponosides, glucosides, terpènes...

التقدير الكمي ل Polyphénol totaux من خلال الفحص الطيفي كشف عن إحتوائه على :

3.88mg EAG/g للمستخلص الميثانولي والذي يسمح لنا لتقييم الدراسات البيولوجية.

اضافة الى ذلك كشف تقييم نشاط تخفيض نسبة سكر الدم أن المستخلص المائي لنبتة العقاية له تأثير مضاد للسكري بسيط

قدر بنسبة 10.24% عند أخذ جرعة مقدرة بـ 0,125 g/ml و يكون تأثيره أكبر عند زيادة الجرعة إلى 0, 25 g/ml

قدر بنسبة 17.4% , بالمقارنة مع تأثير الدواء (الميتفورمين) الذي يسمح بانخفاض إلى 39.68% .

كما ان دراسة النشاط المضاد للالتهابات لنبتة *Zygophyllum album* سمحت لنا بالتأكد أن المستخلص المائي له تأثير

كمضاد للالتهابات بجرعة 0.8 ملغم / مل التي تسمح للحد من الوذمة بنسبة 53.63% مقارنة مع ديكلوفينك (النسبة المئوية لخفض

الوذمة 71.73%)

يخصص الجزء الثاني من دراستنا لجانب التكنولوجيا الحيوية (*culture in vitro*) بهدف انشاء نظام انتاج محاصيل

من نوع "جذور شعيرية" و محاولة الحصول على شتلات مخبرية عن طريق انبا بذور *Zygophyllum album*.

لاحظنا نموا سريعا، ذاتية التغذية بالنسبة لمنظمي النمو و تفرعات بليوجيوتروبكية للشبكات الماصة على مستوى الشعيرات الجذرية.

ومن ناحية أخرى، حصلنا على نسبة من الإنبات تقدر ب 43% ، بينما كانت النسبة المئوية للبذور غير المنبئة

37% و 20% نسبة التلوث.

نلاحظ أيضا شتلات موجهة الى caullogénès و أخرى موجهة الى callogénès , ويرجع ذلك إلى التوازن الهرموني.

الكلمات الرئيسية:

الدراسات البيولوجية ، الشعيرات الجذرية ، *Zygophyllum album* , المركبات الثانوية، فحص نباتي كيميائي

culture in vitro

Sahara The largest and hottest desert in the world has a very rich and varied spontaneous vegetation. Some species have active biomolecules that give them a medicinal interest.

Among these species, we chosen *Zygophyllum album* L. called locally "Aggaya" , this one was explored first from the phytochemical point of view and this with a goal of to determining the chemical constituents of *Z. album* and its pharmacological effects.

Phytochemicals tests helped to highlight: flavonoids, tannins, saponosides, glucosides, cardiac heterosides, terpenes and mucilage... . The quantitative estimation of the total polyphenols by the spectrophotometric dosage revealed contents of 3.88mg EAG /mg extract and which allows us to evaluate the pharmacological studies.

The evaluation of the hyperglycaemic properties of our plant revealed that the aqueous extract of *Z. album* has a minimal anti-hyperglycaemic effect in 10.24% for the dose of 0.125 g / ml and even more important in 17, 4% for the dose of 0.25 g / ml; in comparison with the effect of the drug (metformin) which allows a reduction to 39.68%.

The study of the anti-inflammatory activity of *Z. album* allowed us to confirm that its aqueous extract has an anti-inflammatory effect at a dose of 0.8 mg / ml and decreased edema to 53.63% compared to diclofenac (percentage reduction of edema 71.72%.)

The second part of our study is devoted to the biotechnological aspect (*in vitro* culture) , and this with a goal of creating a production system of an organized cultures essentially in a " hairy root " and an essay to obtain vitroplants by the germination of the seeds of *Z. album*.

We noticed a rapid growth, autotrophy to growth regulators and plageotropic ramifications of the absorbent webs in hairy roots.

On the other hand, for the *in vitro* germination of the seeds of *Z. album* we found a percentage of germination of 43%, whereas the percentage of seeds not germinated was 37% and a percentage of contamination of 20%. Also we note we noticed seedlings oriented to a caulogenesis and others towards a calogènese are observed, this is due to the hormonal balances tested.

Key words:

Zygophyllum album, secondary metabolites, Phytochemical screening, *in vitro* culture, hairy roots, biological activities.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction.....1

I. Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de la plante.....3

I.1.1. La famille des Zygophyllacées3

I.1.2. Genre *Zygophyllum*5

I.1.3. Modèle végétal *Zygophyllum album*.....5

a. Définition5

b. Position systématique.....6

c. Répartition géographique de *Zygophyllum album*.....6

d. Description botanique.....6

e. Propriétés et usage thérapeutiques.....7

I.2. Les métabolites secondaires.....8

I.2.1. Définition.....8

I.2.2. Classification des métabolites secondaires.....9

I.2.2.1. Les polyphénols totaux9

A. Polyphénols monomériques.....9

a. Acides phénoliques.....9

b. Les flavonoïdes.....10

B. Polyphénols sous forme de polymères.....11

a. Tanins.....11

b. Coumarines.....11

I.2.2.2. Les alcaloïdes.....11

A. Définition11

B. Classification.....12

a. Selon l'origine biosynthétique.....12

b. Selon leur composition chimique et structure moléculaire.....	12
I.2.2.3. Les Terpènes.....	12
A. Définition	12
B. Classification des terpènes	13
a. Monoterpènes.....	13
b. Sesquiterpène	13
c. Diterpènes	13
d. Triterpènes	13
e. Tétraterpènes	14
I.2.3. Fonction des métabolites secondaires	14
I.2.4. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des métabolites secondaires	15
I.3. La culture <i>in vitro</i>	16
I.3.1. Définition	16
I.3.2. Facteurs influençant la culture <i>in vitro</i>	16
I.3.2.1. Environnement	16
I.3.2.2. Potentiel hydrique	17
I.3.2.3. Milieu de culture	17
I.3.2.4. Composition minérale du milieu	17
I.3.2.5. Les régulateurs de croissance	18
I.3.2.6. Source de carbone	18
I.3.2.7. Les vitamines	18
I.3.3. Culture <i>in vitro</i> de <i>Zygophyllum</i> : Etat de question	18
I.3.4. Induction de chevelus racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	19
I.3.4.1. Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T	19
I.3.4.2. Co-culture bactérie-plante et Isolement des racines induites	21
I.3.4.3. Caractérisation biochimique des lignées de CRs	22

II. Matériels et Méthodes

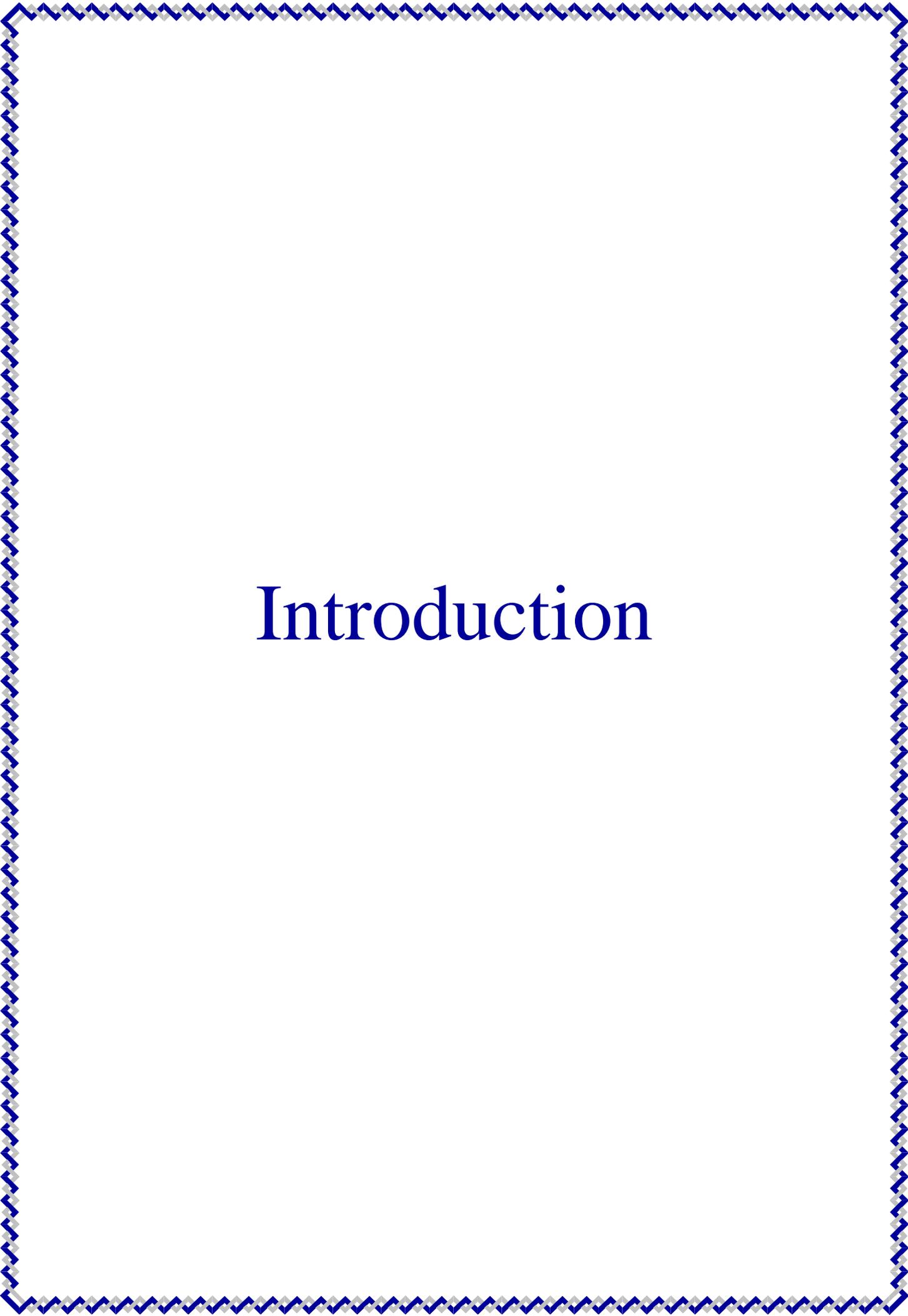
II.1. Matériels.....	23
II.1.1. Matériels biologiques	23
A. Matériels végétal	23
B. Matériel animal	24
II.1.2. Matériel non biologique	25
II.2. Méthodes	26
II.2.1. Tests phytochimiques	26

II.2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux (infusé).....	26
II.2.1.2. Screening phytochimique	26
a. Flavonoïdes	26
b. Polyphénols totaux	26
c. Dérivées phénoliques	27
d. Coumarines	27
e. Alcaloïdes	27
f. Anthocyanes	27
g. Anthracénosides	27
h. Tanins	28
i. Saponosides	28
j. Quinones	28
k. Terpènes	29
l. Irridoïdes	29
m. Hétérosides cardiotonique	29
n. Glucosides	29
o. Mucilage	29
p. Acides aminés	29
II.2.1.3. Dosage des polyphénols totaux	30
A. Préparation de l'extrait végétal brut	30
B. Dosage quantitatif des polyphénols totaux par spectrophotométrie	31
a. Dosage des polyphénols totaux	31
II.2.1.4. Etude des activités biologiques de la partie aérienne de <i>Zygophyllum album</i> L	31
A. Etude de l'activité hypoglycémiante de l'extrait aqueux de <i>Zygophyllum album</i> L	31
B. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de <i>Zygophyllum album</i> . L	34
II.2.2. Culture <i>in vitro</i>	38
II.2.2.1. Essai d'obtention de vitroplants de <i>Z. album</i>	38
A. Désinfection des graines	38
B. Condition de culture	39
a. Milieu de culture	39
b. Balance hormonales	40
C. Mise à germination des graines	40
II.2.2.2. Essais d'optimisation des conditions de culture de chevelus racinaires de <i>Z. album</i> obtenus après transformation génétique via l' <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	41

A. Culture des chevelus racinaires sur milieu liquides	42
a. Préparation de milieu MS liquide et solide	42
b. Mise en Culture des chevelus racinaires	42
B. Effet du stress salin sur la croissance des chevelus racinaires	43

III. Résultats et discussions

III.1. Etude phytochimique	45
III.1.1. Analyse qualitative des extraits de <i>Zygophyllum album</i> (Screening phytochimique)..	45
III.1.2. Analyses quantitatives des polyphénols totaux.....	47
III.1.3. Activités biologiques	49
III.1.3.1. Activité anti hypoglycémiant	49
III.1.3.2. Activité anti- inflammatoire	52
III.2. Culture <i>in vitro</i>	55
III.2.1 .Essai d'obtention des vitroplants de <i>Zygophyllum album</i>	55
III.2.2. Culture des chevelus racinaires de <i>Z. album</i> obtenus après transformation génétique dans le milieu liquide	59
a. Effet du milieu liquide et les conditions de culture sur la croissance des chevelus racinaires	61
b. Effet de stress salin sur la culture des CRs	61
Conclusion	63
Références bibliographiques	65
Annexes	

A decorative border with a repeating geometric pattern of blue and grey zig-zags surrounds the page content.

Introduction



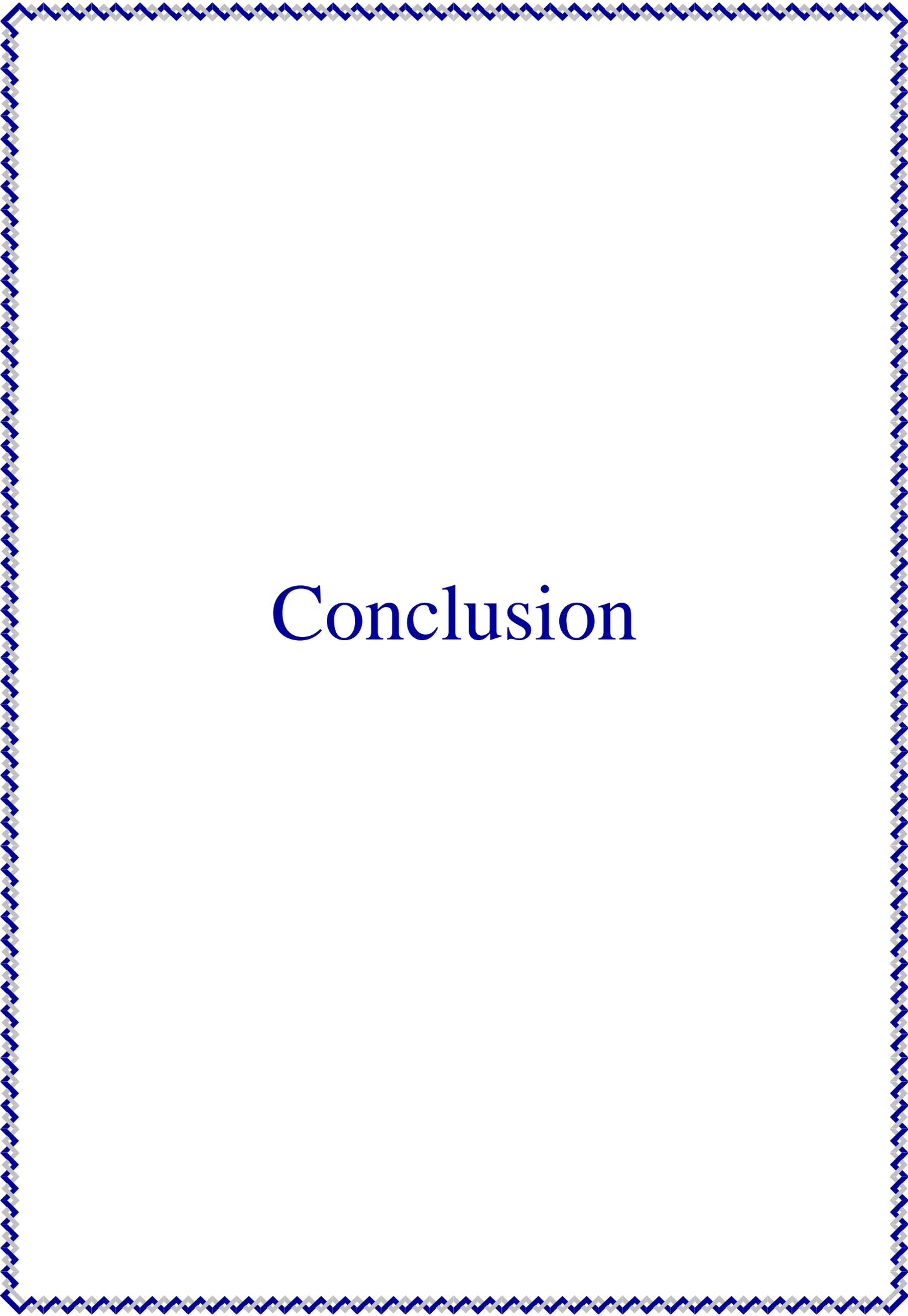
I. Synthèse bibliographique



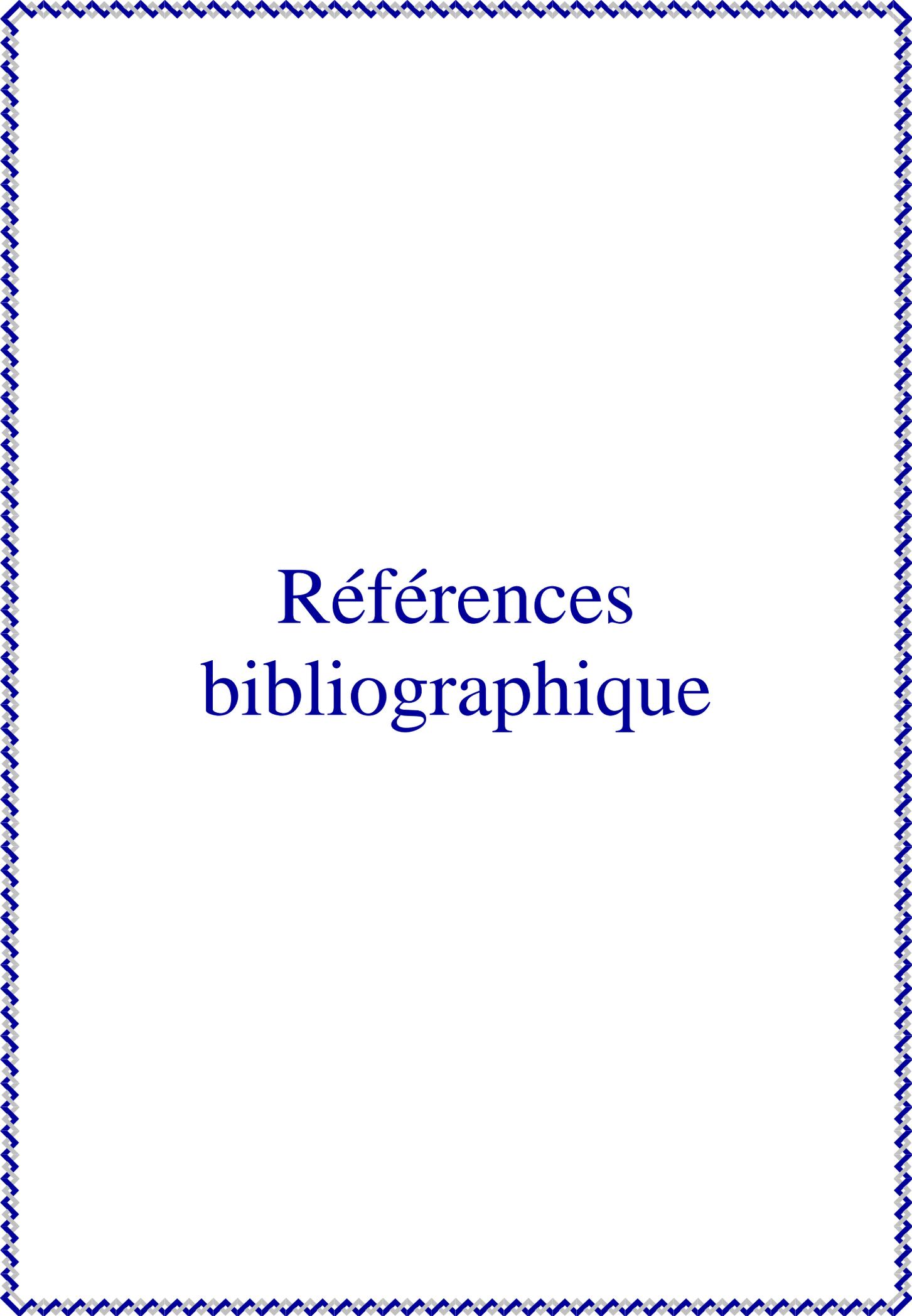
II. Matériel et Méthodes



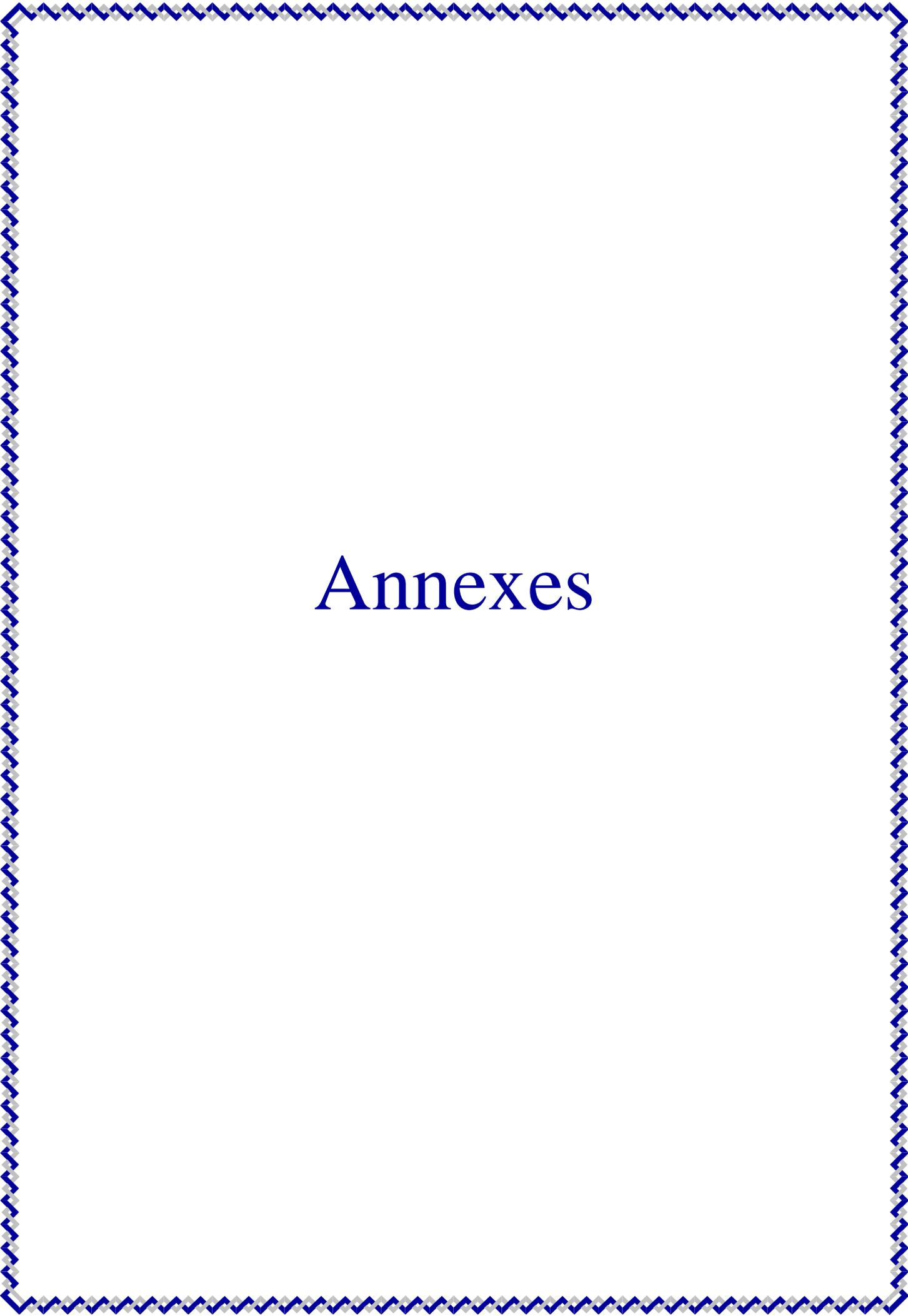
III. Résultats et Discussions

A decorative border with a repeating geometric pattern of blue and grey zig-zags surrounds the page content.

Conclusion



Références bibliographique



Annexes

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons). En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin **(Muanda, 2010)**.

Selon l'organisation mondiale de la santé (**OMS**), environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire.

La végétation Algérienne est constituée de plusieurs variétés végétales que ce soit méditerranéenne ou saharienne. Cette diversité explique ses nombreuses potentialités dans le domaine de l'exploitation des espèces végétales **(Belmimoun, 2016)**.

Au Sahara algérien, plusieurs plantes sont utilisées sous différentes formes pour le traitement des pathologies telles que les maladies cardiaques, le diabète, l'hypertension...ect.

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes **(Chaabi, 2008)**.

Parmi elles nous retrouvons les espèces appartenant au genre *Zygophyllum*, qui jouissent de propriétés antidiabétiques, antiseptiques, antispasmodiques et anti inflammatoire.

La culture *in vitro* des cellules, tissus ou organes peuvent remplacer l'exploitation des plantes entières ou les synthétises purement chimiques pour la production des métabolites secondaires. L'optimisation des conditions de culture par différentes techniques et l'utilisation de cellules immobilisées accroissent les rendements de production de métabolites secondaires.

Toutefois, l'accumulation *in vitro* de biomolécules est le plus souvent corrélée à une différenciation cellulaire, morphologique et métabolique.

La transformation par *Agrobacterium rhizogenes* est particulièrement intéressante pour produire *in vitro* des métabolites secondaires.

Les racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes* se caractérisent par un abondant chevelu racinaire appelé "hairy root". De telles cultures organisées sont génétiquement stables et accumulent des métabolites secondaires à des niveaux parfois plus élevés que ceux rencontrés chez la plante entière **(Ahnetral, 1996)** ou dans de cultures de racines non

transformées (**yoshikawa et al., 1980**). Enfin, la croissance du "hairy root" permet d'envisager l'application industrielle de telles cultures.

A ce titre, l'un des objectifs de notre étude est d'optimiser les conditions de culture *in vitro* de chevelus racinaires obtenus préalablement par **Sahli et Gadiri, (2016)**.

L'étude de la **phytochimie** fait l'objet d'intenses investigations pour aider à déterminer les constituants chimiques présents dans les plantes médicinales. Pour mener ces investigations, divers organes des plantes (feuilles, fleurs, écorces, racines, fruits) sont cueillis dans leur habitat naturel afin de déterminer leur teneurs en métabolites secondaires et analyser leurs éventuels effets pharmacologiques.

Dans cette optique, le **screening phytochimique** ou **criblage phytochimique**, est l'un des outils indispensables qui permet de déceler la présence des métabolites secondaires (les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tanins...etc.) dans une drogue donnée.

La présente étude portera donc sur l'exploration de la plante saharienne nommée: *Zygophyllum album* L en se fixant les objectifs suivants :

- ✚ Screening phytochimique de l'espèce *Zygophyllum album* et comparaison avec les résultats obtenues par **Touari (2012)**.
- ✚ Dosage quantitatif des polyphénols totaux et des flavonoïdes d'un extrait méthanolique de *Z.album* par spectrophotométrie.
- ✚ Détermination de deux activités biologiques de l'extrait aqueux de *Z. album* (anti-hyperglycémie et anti-inflammatoire).
- ✚ Essai d'optimisation des conditions de culture *in vitro* des lignées de chevelus racinaires obtenues par **Zaidi et Masmoudi (2016)**, après transformation d'explants de *Z. album* par la souche *Agrobacterium rhizogenese*.
- ✚ Germination *in vitro* des graines de *Zygophyllum album*, traitées par différentes concentration hormonales de (AIA/ BAP. 2-4D/ BAP).

I.1 Présentation de la plante

I.1.1. La famille des *Zygophyllacées*

Cette famille comprend environ 25 genres et 500 espèces. Elle se subdivise en sous familles: *Peganoideae*, *Nitrarioideae*, *Balanitoideae*, *Tribuloideae*, *Zygophylloideae* (**HassanAl Barre, 2003**).

Les *Zygophylloideae*, constitue la sous famille la plus large avec 180 espèces, regroupées en quatre genres, *Augea* (monotypique), *Tetraena* (monotypique), *Fagonia* (30 espèces) et *Zygophyllum* (150 espèces) (**Sheahan et Chase, 1996**).

Les zygophyllacées, dans la classification de **Sheahan et Chase**, sont constitués environ 285 espèces (**Sheahan et Chase, 2000**).

Ces dernières sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques (**Quezel et Santa, 1963 et Sheahan et Chase, 2000**).

La famille des zygophyllaceae est représentée dans tous les continents mais principalement dans les régions arides : ainsi au Sahara Algérien on observe 7 genres et 27 espèces, c'est-à-dire que les Zygophyllacées forment plus de 3% de la flore de notre désert. Parmi ces dernières, plus du tiers des espèces et de nombreuse variétés sont des endémiques du Sahara (**Ozenda, 1977**)

Les plantes appartenant à cette famille, sont très reconnaissables à l'aspect de ses arbustes, ou arbres.

Les rameaux sont parfois articulés. Les feuilles sont charnues, épaisses, coriaces, généralement opposées avec des stipules en général épineuses, très polymorphes, Leur bois produit des substances stéroïdiques qui leur donne des propriétés médicinales.

Les fleurs sont bisexuées de 4 à 5 mères, isolées ou inflorescences, la corolle, est également de 4 à 5 mères, et parfois nulle. Généralement, ces plantes renferment 10 étamines, le plus souvent, à stipules unies, un ovaire de 4 à 5 carpelles, à un ou plusieurs ovules par loge.

Leurs fruits, sont en général, capsulés, loculicides, ou septicides, se dissociant en coques, parfois bacciformes, ou drupacés (**Quezel et Santa, 1963**).

➤ Intérêts biologiques de la famille Zygophyllaceae

Beaucoup d'espèces de cette famille ont des propriétés thérapeutiques remarquables et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique :

- *Balanites aegyptiaca* : c'est une plante riche en saponines, elle a plusieurs activités : Anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-nociceptives, anti-fongiques, antiseptiques,

anti-malaria, anti-syphiliques et anti-virales, traditionnellement, ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement de la jaunisse et le diabète.

- *Larrea divaricata* : c'est une plante populaire en médecine, elle est utilisée dans le traitement des tumeurs : des maladies inflammatoires, des rhumatismes et de la fièvre.
- *Larrea tridentata* : c'est une plante désertique, elle est largement utilisée dans la thérapeutique, ses extraits peuvent soigner l'acné et les psoriasis et en même temps ont des effets cicatrisants, anti-fongiques et anti-viral, elle a aussi des activités analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes.
- *Zygophyllum eichwaldii* : cette espèce a des propriétés nombreuses, anti-septiques, antieczéma, anti-diabétiques, anti-bactériennes et anti-fongiques.
- *Zygophyllum coccineum* : c'est une plante commune en médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens, elle est utilisée contre le rhumatisme, la goutte et l'hypertension, et le diabète.
- *Zygophyllum gaetulum* : très connue avec ses propriétés anti-diabétiques, elle est également anti-spasmodique, anti-eczéma et un bon remède pour l'estomac.
- *Zygophyllum geslini* : cette espèce est utilisée contre le diabète, elle a également des activités cytotoxiques.
- *Zygophyllum album* : ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement des diarrhées et des diabètes. Ils sont carminatifs, anti-septiques, et stimulants (Ayad, 2008).



Figure 1 : Les espèces de la famille des Zygophyllaceae.

I.1.2. Genre *Zygophyllum*

Celle-ci numériquement le plus important de la famille, comprend une centaine d'espèces du désert et des steppes du Vieux Monde.

Ce sont des buissons ramifiées, à feuilles opposées, pourvues d'une paire de folioles ; celle-ci tantôt étroite et cylindrique comme chez les espèces nord-africaines, tantôt aplaties en raquette comme chez beaucoup de types sud-africaines ou asiatiques.

Sept espèces en Afrique de nord, dont l'une *Z. simplex* est aisément reconnaissable à ses feuilles simples et sa racine grêle, et les six autres étant par contre difficiles à distinguer entre elles. Leur morphologie est en effet très analogue, les seuls caractères distinctifs valables reposent sur la forme de fruit, les échantillons sont à peu près toujours indéterminables et comme la forme de fruit se modifie sensiblement au cours de son développement. Les échantillons présentant des fruits immatures sont eux-mêmes d'une détermination délicate ; il paraît d'ailleurs exister de nombreux termes de passage entre ces espèces, dont certaines sont probablement des hybrides (Ozenda, 1977).

I.1.3. Modél végétal *Zygophyllum album*

a. Définition

Zygophyllum album connu sous le nom « aaggaya, agga », ou zygophyllum blanc est une espèce du genre *Zygophyllum* de la famille des Zygophylaceae (Figure 2) (El Ghouli et al ; 2011). Ce sont des plantes très adaptées au milieu désertique par leur système de racines horizontales qui parcourent de longues distances et absorbent la moindre goutte d'eau (Smati, 2009).



Figure 2 : *Zygophyllum album* L (Anonyme)

b. Position systématique

D'après **Judd et al; 2002** :

Règne : Plantae

Sous embranchement : Angiospermes

Superdivision : Spermatophyta (seed plant)

Division : Magnoliophyta (flowering plants)

Classe : Magnoliopsida (Eudicotylédones)

Sous-classe : Rosidae II

Ordre : Zygophyllales

Famille : Zygophyllaceae

Genre : *Zygophyllum*

Espèce : *Zygophyllum album* L.

c- Répartition géographique de *Zygophyllum album*.

Cette espèce colonise les sols à encroûtements gypseux des bordures des chotts et des sebkhas. Cette plante est également liée aux sols à alcalis ou salins. Elle présente une grande amplitude écologique. Elle pousse sous des précipitations allant de 3mm/an à 158 mm/an (**Fahmy et Ouf, 1999**).

Zygophyllum album est une espèce saharo-méditerranéenne commune dans le sud tunisien, moins fréquente en Algérie (**Ozenda, 1977**). On la trouve principalement dans les régions arides du Sahara septentrional au Tidikelt et au Touat. Au Sahara central, il est signalé dans l'Ahaggar, à Fort-Polignac (Illizi) et dans la région d'El Goléa (**Sahki et Sahki, 2004**). Cette espèce est commune dans tout le sud saharien notamment à Tamanrasset et Bechar (**More et White, 2005**)

d. Description botanique

Les espèces du genre *zygophyllum* se présentent souvent sous forme de buissons bas, ramifiés de 20 à 30 cm de hauteur dont les feuilles petite opposées, composées en général de 2 folioles cylindriques, charnues et gorgées d'eau (**Figure 3**)(**Smati., 2009**). Le pétiole est aussi long et charnu que les deux folioles Les feuilles deviennent oranges en séchant. Les fleurs sont petits blanc-jaune ou crème (**Quezel et Santa, 1963**), axillaires ont 10 étamines à base élargie (**Figure 4**). Le fruit de *Z. album* est une capsule portée par un pédoncule court (**Figure 05**). Elle est formée d'une partie inférieure soudée et d'une partie supérieure dont les 5 lobes libres ont à peu près la même longueur que la partie soudée (**Smati, 2009**). Parfaitement adaptée à la

sécheresse, *Z. album* présente un réseau racinaire important sous forme de rhizomes et de fines soies sur les feuilles qui permettent de retenir la vapeur d'eau.



Figure 3 : Feuilles de *Z. album* (Anonyme).



Figure 4 : Fleurs de *Z. album* (Anonyme).



Figure 5: Fruits de *Z. album* (Anonyme).

e- Propriétés et usages thérapeutiques

Comme la plupart des plantes appartenant au genre *Zygophyllum* cette espèce possède plusieurs effets biologiques. Elle est employée pour traiter le diabète, les spasmes, les coliques (Ould El Hadj et al; 2003 à ourgla ; Smati et al ; 2004 à Sahara Algérien; Hammiche et Maiza, 2006 à Tassili).

Elle a un intérêt en Pharmacopée : est utilisée, en décoction, en poudre ou en pommade pour les traitements des diabètes, des indigestions et des dermatoses (Chehema, 2006).

Aussi cette plante est utilisée dans la médecine traditionnelle comme un remède pour les rhumatismes, la goutte, asthme et comme diurétique (Amal et al ; 2007 a Egypte).

D'autres vertus telles que les activités anti- inflammatoire, antipyrétique et antivirale sont très connues à ces espèces (Saad et al; 1967 Egypte).

Z. album a été décrite comme une espèce d'intérêt pastoral vu qu'elle soit considérée une plante bien broutée par les dromadaires (chehema, 2006).

I.2. Les métabolites secondaires

I.2.1. Définition

Le terme «métabolite secondaire », est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique, indirectement essentielles à la vie des plantes. (Guillaume, 2008).

Par opposition aux métabolites primaires (glucides, lipides et protéines) qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (Cuendet, 1999 ; Gravot, 2008). Les métabolites secondaires, issus de métabolites primaires (figure 6), interviennent dans la structure des plantes mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (Gravot, 2008; Kansole, 2009). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés, par action anti-herbivore, inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et lumière ultra violet « UV ». Mais elles peuvent être anti-nutritives, Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (Gravot, 2008). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (Boukri, 2014).

Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante ; dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

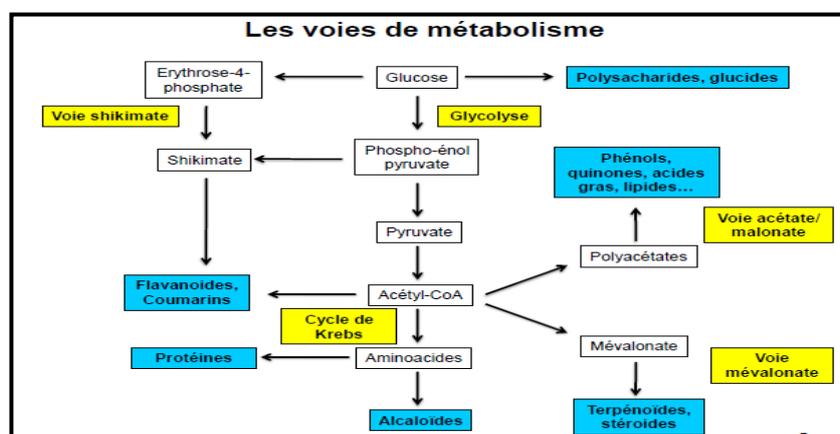


Figure 6: Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Bruneton, 1993).

I.2.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006).

I.2.2.1. Polyphénols totaux

Les polyphénols constituent un groupe largement distribué des substances dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales, la voie de shikimate et d'acétate (Hopkins, 2003 ; Lugasi *et al* ; 2003).

- ✓ La voie de l'acide shikimique conduit aux acides cinamiques et à leurs dérivés : acides benzoïques et phénylpropanoïques, acétophenones, lignanes et lignines, coumarines.
- ✓ La voie de l'acétate conduit par cyclisation d'un polyacétate aux chromones, orcinols et autres quinones.
- ✓ La participation simultanée de ces deux précurseurs à un même processus conduit pour sa part (Belguidoum, 2012).

Les composés phénoliques présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Crozier *et al* ; 2006).

La classification de ces substances a été proposée par Harborne (1980). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, principales classes sont largement répandues (Macheix *et al* ; 2006).

A. Polyphénols monomériques

a. Acides phénoliques

Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (Haslam, 1994). Ils se divisent en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (Pandey et Rizvi, 2009).

✓ Acide phénols dérivés d'acide benzoïque

Sont des hydroxybenzoïques et ont une structure générale de base de type (C6-C1) (Figure 7), ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar,

2012). Les plus répandus sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999). Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Barboni, 2006).

✓ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (figure 8) sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide *p*coumarique et l'acide synaptique (Haslam, 1994).

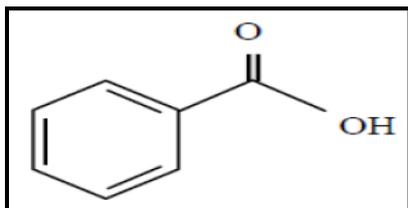


Figure 07: Acide benzoïque (Pawlowska *et al*; 2006).

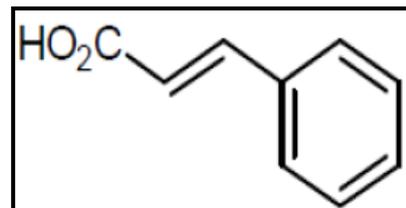


Figure 08: Acide cinamique (Gorham, 1977).

b. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) représente une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, 2006). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Fiorucci, 2008). Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (Benhammou, 2011).

Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux, ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à- dire liée à des oses et autres substances (Heller et Forkmann, 1993 in Aref et Heded, 2015). Ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (Cycle C) (figure 9) (Akroum, 2011).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronés (Wichtl et Anton, 2003 ; Medic *et al*; 2004).

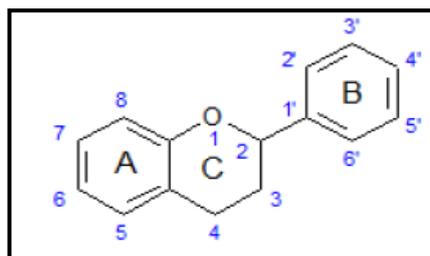


Figure 09: Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

B. Polyphénols sous forme de polymères

a. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes et hydrosolubles (**Kamra et al; 2006**).

Ils sont très répandus dans le règne végétal (**Ghestem et al ; 2001**). Ces composés peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains (**Khanbabae et Ree, 2001**).

➤ Structure et classification

La structure des tannins est complexe, formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation. On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins (**Ghestem et al ; 2001**). Qui distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (**Rira, 2006**) :

- ✓ Les tanins hydrolysables
- ✓ Les tanins non hydrolysables ou tanins condensés (**Ghestem et al ; 2001**).

b. Coumarines

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques. Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (**Bruneton, 1999**).

La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto-biologiques (**Hostettmann, 1992 in Benayache, 2005**), bactériostatiques et anti fongiques (**Rufini et Sampaolo, 1977**). Ils ont un effet anti-oedémateux (**Hoult et Paya, 1996**).

I.2.2.2. Les alcaloïdes

A. Définition

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (**Badiaga, 2011**). Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (**Krief, 2003**).

B. Classification

a. Selon l'origine biosynthétique

On distingue trois types d'alcaloïdes :

- ❖ **Alcaloïdes vrais** : d'après certains auteurs, ils sont issus seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Bruneton, 1999).
- ❖ **Pseudo-alcaloïdes** : ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (Bruneton, 1999).
- ❖ **Proto-alcaloïdes** : se sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (Bruneton, 1999).

b. Selon leur composition chimique et structure moléculaire

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes.

- ❖ **Phénylalanines**: comme capsaïcine chez piment, colchicine chez colchique.
- ❖ **Alcaloïdes iso-quinoléiques** : comme: morphine, éthyl-morphine, codéine et papavérine continues dans l'opium du pavot; et des alcaloïdes indoliques: ergométrine, ergotamine et ergo-toxine de l'ergot des céréales (Gonzalez *et al*; 1984).
- ❖ **Alcaloïdes quinoléiques**: se trouvent dans les écorces de Cinchona (Donatien, 2008).
- ❖ **Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques**: par exemple: ricinine chez ricin.
- ❖ **Alcaloïdes dérivés du tropane** : comme scopolamine et atropine chez la belladone.
- ❖ **Alcaloïdes stéroïdes**: racine de vératre, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (Gonzalez *et al*; 1984).

I.2.2.3. Les Terpènes

A. Définition

Le terme terpène ou terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène (Figure 10), ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaïssa, 2011). L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Harbone, 1998 ; Bruneton, 1999).

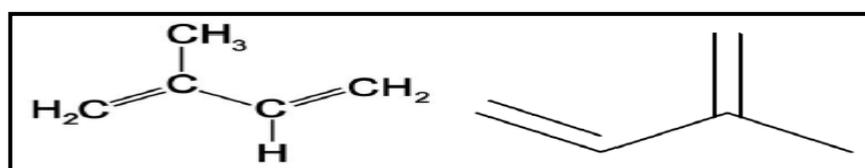


Figure 10 : structure d'isoprène (Benaïssa, 2011).

Beaucoup de terpènes servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques :

Antimicrobienne, insecticide, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, anesthésique et antihistaminique (des mono et sesquiterpènes), diurétique, neuro-protective. On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpènes (Taxol), et des activités anti-oxydantes attribuées surtout aux diterpènes phénoliques (Ayad, 2008).

B. Classification des terpènes

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C₁₀, les sesquiterpènes en C₁₅, les diterpènes en C₂₀, les triterpènes C₃₀, et les tétraterpènes C₄₀ (Ayad, 2008).

a. Monoterpènes

Les monoterpènes comportent dix atomes de carbone et sont issus de la condensation de deux unités d'isoprène, selon le mode de couplage «tête-queue». Dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des mono-terpènes). Ce sont des molécules légères, très peu fonctionnalisées et très odorantes. (Ayad, 2008)

Les mono-terpènes peuvent être acycliques (Mycènes, ocymène), monocycliques (terpinène, p-cimène) ou bi-cycliques (pinène, sabinène) (Bruneton, 1999). Ils existent sous la forme d'hydrocarbures simples (limonène, Mycènes ...), d'aldéhydes (linalal, géranial...), d'alcools (linalol, geraniol...) et d'acides (acide linalique géranique ...) voire d'esters (acétate de linalyle ...), ce sont des composés aromatiques qui constituent les essences florales, les huiles essentielles et les résines (Singh *et al*; 1989).

b. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des molécules à 15 atomes de carbone constituées de trois unités isopréniques et dérivant du Farnésyl diphosphate (FPP) (Wink, 2003); il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes.

c. Diterpènes

Les diterpènes sont formés de quatre unités isoprènes (C₂₀H₃₂) (Hernandezchoa, 2005), il comprend les gibbérellines (phytohormones du développement impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la germination (Graebe, 1987).

d. Triterpènes

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone. Ils ont comme précurseur le squalène . Ex : Le lanostérol qui est ensuite transformé en cholestérol, c'est de plus un des constituants de la graisse de la laine de mouton (Klaas, 2002 ; Belbache, 2003).

e. Tétraterpènes

Les Tétraterpènes contiennent une longue chaîne de 40 atomes de carbones, à doubles liaisons conjuguées de configuration « trans » dont les extrémités sont des chaînes ouvertes ou des cycles. Les tétraterpènes les mieux connus sont les caroténoïdes.

I.2.3. Fonction des métabolites secondaires

a. Fonctions pour la plante

❖ La coopération avec les animaux

Les métabolites secondaires peuvent être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs ou pollinisateurs : certains métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux (mono-terpènes parfumées, anthocyanes de couleur ou de caroténoïdes dans les fleurs), nécessaires à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs.

❖ Lutte contre la compétition avec d'autres plantes

Les métabolites secondaires participent à des réponses allélopathiques : compétition entre les plantes pour la germination et croissance au moyen de toxicité qui empêchent la croissance des autres plantes compétitrices (**Wink, 2003**).

b. Rôle pour l'Homme

Les métabolites secondaires végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés sont en grande mesure illustrés en thérapeutique (**Bahorun, 1997**).

❖ Utilisation en médecine

Les métabolites secondaires qui font la base des remèdes pour l'Homme :

- ✓ En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux.
- ✓ Systèmes cardiovasculaires.
- ✓ Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoire extraits des plantes *Melaleuca alternifolia* et *Echinacea angustifolia*.
- ✓ Contre le diabète (*Azadirachta indica*).
- ✓ les maladies du stress, ces métabolites ont une activité antioxydante. (**Lee et al; 2005**).
- ✓ Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire (**Mohammedi, 2006**).

c. En alimentation : Les épices et les herbes aromatiques contenant des divers métabolites sont utilisées dans l'alimentation et pour une bonne part responsables des plaisirs de la table, considérées comme condiments et aromates, ont été et restent très liées à leurs propriétés organoleptiques. Mais également ces métabolites trouvent leur utilisation comme suppléments diététiques (**Mohammedi, 2006**).

d. En cosmétique : Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (**Mohammedi, 2006**).

I.2.4. Activités biologiques et intérêt pharmacologiques des métabolites secondaires

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (**Bruneton, 1993**).

Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'aldose réductase. En effet, **Marfak (2003)**, a rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques.

A ce jour, des nombreuses plantes hypoglycémiantes ont été recensées. Les résultats sur des modèles animaux *in vitro* et *in vivo* ont montré que les extraits (aqueux, polyphénoliques, alcaloïdiques et à saponines) pouvaient agir par divers mécanismes pour abaisser la glycémie (**Masunda et al ; 2014**).

I.3. La culture *in vitro*

I.3.1. Définition

D'après **Peters, 1986** la culture *in vitro* recouvre toutes cultures de matériel végétal effectuées en conditions aseptiques. Elle fait appel aux potentialités génétiques des cellules végétales. Celles-ci renferment la totalité de l'information génétique d'une plante dans leurs noyaux et devraient, par conséquent, pouvoir reproduire cette plante. Cette aptitude des cellules à exprimer la totalité du génome est la totipotence cellulaire. Elle se manifeste lors de la mise en culture *in vitro*, l'explant étant libéré des corrélations existant dans la plante entière.

La mise en culture *in vitro* s'accompagne généralement d'une dédifférenciation et d'une reprise de l'activité mitotique. L'explant peut évoluer dans différentes directions (calogène, organogène, embryogène...) suivant certains facteurs : - le choix de l'explant

- le milieu de culture
- les conditions de culture.

La culture *in vitro* vise à orienter et à contrôler les processus physiologiques qui commandent le devenir de l'explant en modulant ces trois facteurs. (**Peters, 1986**)

I.3.2. Facteurs influençant la culture *in vitro*

La nature de l'environnement (lumière, hygrométrie, et le photopériodisme) et la nature du milieu de culture utilisé ainsi que l'équilibre hormonale jouent un rôle primordial sur le type d'organogenèse à réaliser.

I.3.2.1. Environnement

Pour une bonne réussite d'organogenèse, les conditions environnementales doivent être contrôlées périodiquement. Parmi ces facteurs nous citons :

a. Température

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (**Margara, 1989**)

En outre, une température élevée +30°C peut favoriser l'initiation des primordium racinaire alors qu'une température de +25°C favoriserait plutôt leur développement. (**Zryd et al ; 1988**)

D'après **Piatti, (1988)**, quelques expériences ont été conduites en utilisant des températures qui sont écartés sensiblement pour les phases de germination et d'embryogenèse proprement dites qui se déroule habituellement à température ambiante.

b. La lumière et la photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in vitro* des plantes, elle a une grande influence de part la durée d'exposition (photopériode), **Moret** confirme, qu'après le repiquage

dans les tubes à essai et les boîtes de Pétri, ceux-ci sont placés dans une chambre de culture où la photopériode et la température sont contrôlées, le développement des souches est optimal.

Selon **Teoule, (1993)**, la photopériode appliquée est généralement longue (16 heures d'éclairement et de 8 heures d'obscurité) et l'intensité lumineuse comprise entre 2000 et 6000 lux.

I.3.2.2. Potentiel hydrique

Le pH du milieu de culture est aussi un facteur critique. La pratique habituelle fait que l'on ajuste le pH à 5,5 – 5,8 pendant la préparation du milieu (**Boccon-Gibod, 1984**).

D'après **Boccon-Gibod (1984)**, plus le pH est bas, plus la gélose tend à devenir liquide.

I.3.2.3. Milieu de culture

Les milieux de culture choisis doivent être les plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante étudiée, afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique (**Choi et al ; 1999**).

Le milieu nutritif (ou base nutritive) doit fournir tous les éléments chimiques nécessaires au développement de la plante : carbone, azote, oligoéléments, vitamines, régulateurs de croissance (**Boulay, 1993**).

Ce milieu étant également favorable au développement des micro-organismes qui est plus rapide que celui de la plante, il convient donc de cultiver en conditions aseptiques totales (**Choi et al ; 1999**).

I.3.2.4. Composition minérale du milieu

La composition du milieu de mise en culture joue un rôle très important dans l'organogenèse.

L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement (**Brhada, 2003**).

On peut répartir les éléments essentiels en microélément et macroéléments :

a. Microélément

Ils sont nécessaires en très petites quantités sous formes de traces (Concentration -10mg/ kg de matière sèche : molybdène, nickel, cuivre, zinc, manganèse, bore, fer, chlore) (**Margara, 1989**).

b. Macroélément

Exigés une quantité plus importante que les oligoéléments (-100 mg/kg de matière sèche : soufre, phosphore, magnésium, calcium, potassium, azote, oxygène, carbone, hydrogène) (**Raven, 2014**).

I.3.2.5. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs naturels de croissances des végétaux, appelés souvent hormones de croissance, se répartissent actuellement en cinq groupes : auxines, cytokinines gibbérellines, acides abscissiques, éthylènes selon **Margara, (1989)**. Les facteurs de croissance suivants les auxines (AIA, AIB, AIP) et les cytokinines (la kinétine et la benzylamenopurine) sont des régulateurs de croissance indispensables au bon démarrage et à l'entretien de ces cultures de tissus végétaux *in vitro*. L'effet des hormones dépend à la fois de leur concentration, de leur site d'action, du stade de développement de la plante ainsi que de leur concentration relative (une hormone pouvant inhiber le rôle d'une autre) (**Figure 11**) (**Quennoz, 2001**).

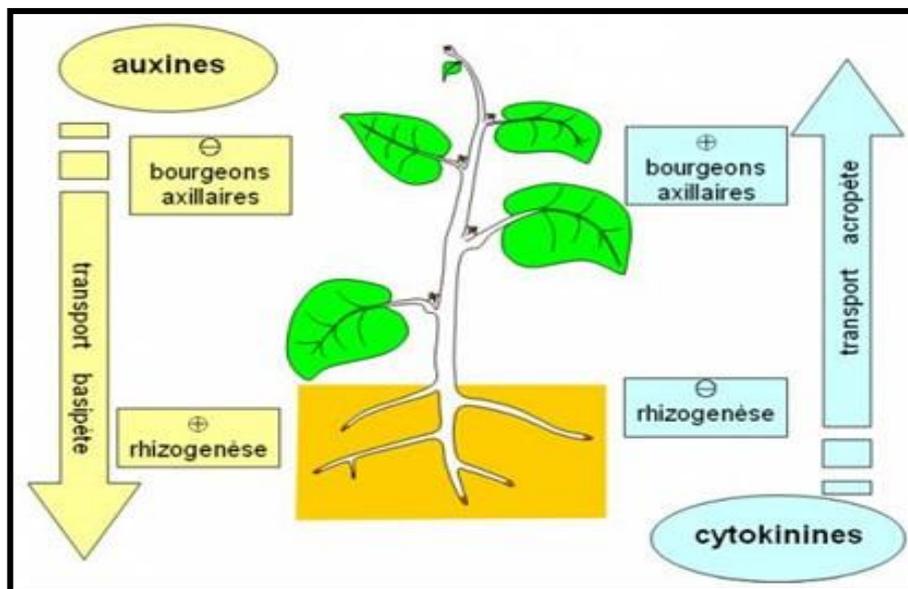


Figure 11 : Rôles des auxines et cytokinines dans le développement des plantes.

I. 3.2.6. Source de carbone

Pour la culture *in vitro* le saccharose constitue une source d'énergie car la plante n'est pas encore arrivée à satisfaire ses besoins énergétiques, on peut dans un cas particulier utiliser d'autres sources, tels, le galactose et le lactose (**Téoulé, 1993**).

I.3.2.7. Les vitamines

En culture *in vitro* certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, parmi les principales, citons : la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, leurs concentrations sont fréquemment de l'ordre de 1mg/l (**Téoulé, 1993**).

I.3.3.Culture *in vitro* de *Zygophyllum* : Etat de question

Plusieurs publications ont été faites par des chercheurs dans le monde entier, afin de montré l'intérêt de genre *Zygophyllum*, le tableau ces dessous montre ces publications (**Tableau 1**).

Tableau 1: Quelques études publiées sur le genre *Zygophyllum*.

Pays	La publication	Référence
Chine	Protoplast culture and plant regeneration of <i>Zygophyllum xanthoxylum</i>	Wang Y; Chen G; Jia, Hao J; 2009
Egypt	<i>In vitro</i> Production of callus from <i>Zygophyllum cocconeum</i> L.	Eman A et Alam, 2011
India	Salt stress enhanced antioxidant response in callus of three halophytes (<i>Salsola baryosma</i> , <i>Trianthema triquetra</i> , <i>Zygophyllum simplex</i>) of Thar Desert	Sharma V et Ramawat G K, 2014
Chine	Rapid clonal propagation of <i>Zygophyllum xanthoxylon</i> (Bunge) Maxim., an endangered desert forage species	Landi Sun ; Suiwen Hou ; Dali Wu ; Yingcong Zhang ; 2008
Egypt	Initiation of Pharmaceutical Factories depending on more Application of Biotechnology on some Medicinal Plants Review Article (In Vitro Production of some Antioxidant, Analgesic, Antibacterial, Antidiabetic agents)	Eman, A. Alam , 2012

I.3.4. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes*.

La maladie de chevelus racinaires est causée par l'infection d'une large gamme des plantes blessées par *Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie de gram négatif du sol transfère un segment d'ADN (T-DNA) de son grand plasmide induisant la racine (Ri) dans le génome de la plante infectée. Cette T-DNA comporte un ensemble de gènes qui codent pour des enzymes qui contrôlent la biosynthèse des auxines et de la cytokinine. Le nouvel équilibre hormonal induit la formation de racines adventives, appelées "hairy root", qui émergent sur le site des blessures.

Le phénotype de chevelus racinaire se caractérise par une croissance rapide, une autotrophie aux régulateurs de croissance, l'absence de géotropisme, une ramification latérale et une stabilité génétique (Guillon et al ; 2006).

I.3.4.1. Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T.

Le mécanisme d'infection par cette bactérie se fait en trois étapes (Figure 12) :

- a. **Adhésion bactérie-plante :** Cela nécessite d'abord une reconnaissance de la cellule végétale par la bactérie qui s'attache à la paroi de celle-ci. Les reconnaissances sont portées par le chromosome bactérien. (Casse-Delbart, 1990).

b. Activation des gènes vir : L'activation du processus d'infection est régulé par les gènes *virA* et *virG* situés sur le T-DNA et certain gènes chromosomiques. Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure Les composés phénoliques de types d syringone, les monosaccharides (tels que le glucose) et le pH acide. (Giri et Narasu, 2000)

c. Insertion du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte : au cours de cette étape le T-DNA entre les régions TR (Right) et TL (Left) du plasmide Ri s'intègre au génome nucléaire de la plante hôte. L'expression des gènes portés par le T-DNA conduit à la formation de chevelus racinaires au niveau de site d'infection et la production des opines qui servent de substances de croissances pour la bactérie (Zhi-Bi et Min; 2006).

Les chevelus racinaires formés comme réponse à l'infection par cette bactérie peuvent être isolés de la plante et cultivés en conditions axéniques sur milieu sans hormones. Le caractère transgénique des chevelus racinaires peut être confirmé par la détection des opines ou des fragments d'ADN dérivé du T-DNA intégré dans le génome de la plante hôte. Morphologiquement les chevelus racinaires sont reconnaissables par une croissance plagiotrope, une forte ramification et développement des poils absorbants à haute densité (Zarouri,2012).

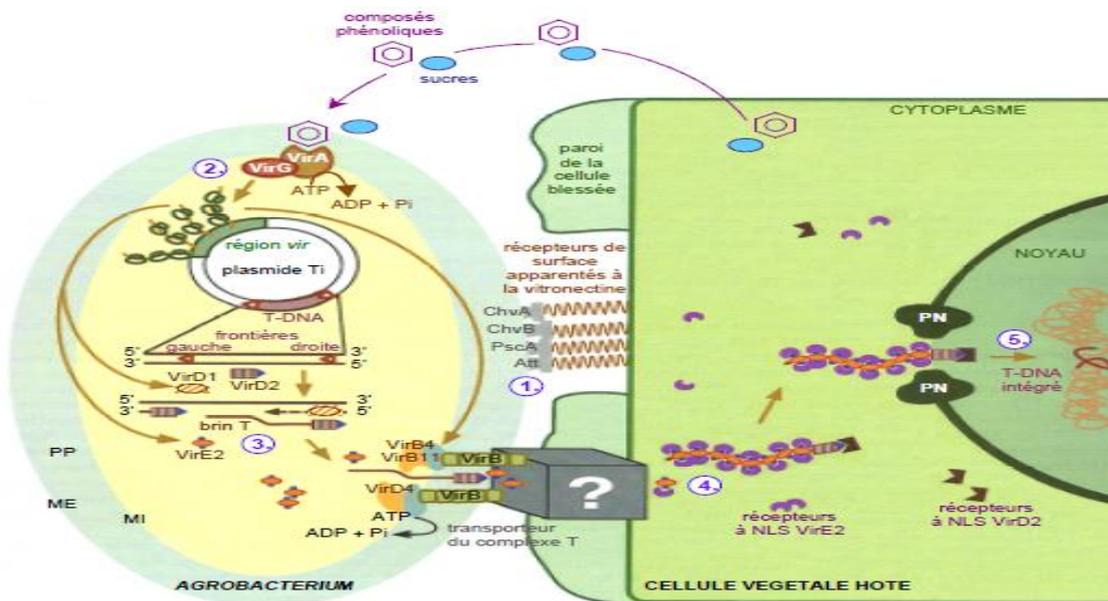


Figure 12 : Représentation schématique d'une infection par *Agrobacterium* (Umber, 2004)

1 : Attachement de la bactérie à la surface de la cellule hôte grâce à l'ensemble des gènes *chv* (chromosomal virulence) présents sur le chromosome bactérien ; **2 :** Induction des gènes *vir* par des signaux de la plante. ; **3 :** Production du brin T et assemblage du complexe T. **4 :** Exportation et transport vers le noyau de la cellule végétale ; **5 :** Intégration du T-DNA dans un chromosome de l'hôte ; **ME :** membrane externe ; **MI :** membrane interne ; **PN :** pore nucléaire ; **PP :** périclasme.

I.3.4.2. Co-culture bactérie- plante et Isolement des racines induites.

L'infection se fait par dépôt à l'aide d'une seringue contenant la suspension bactérienne (0.5 à DO = 600 nm) au niveau des hypocotyles (**Figure 13**). Les vitro-plants âgés de 8 semaines et d'une longueur de 4 à 5 mm sont infectés au niveau de la tige (hypocotyle) qui a été coupée par un ciseau stérile afin de provoquer une blessure. La co-culture est réalisée à l'obscurité, à une température de 26 ± 1 °C jusqu'à apparition du cal.

L'isolement des racines néoformées est réalisé lorsqu'elles atteignent 2 cm de longueur (**Figure 13**). Elles sont repiquées sur un milieu Murashige et Skoog (MS) gélosé, dépourvu de régulateurs de croissance et contenant 0,25 g/l de céfotaxime pour éliminer la prolifération bactérienne. Chaque racine isolée est considérée comme lignée unique (**Tikhomiroff, 2002**).

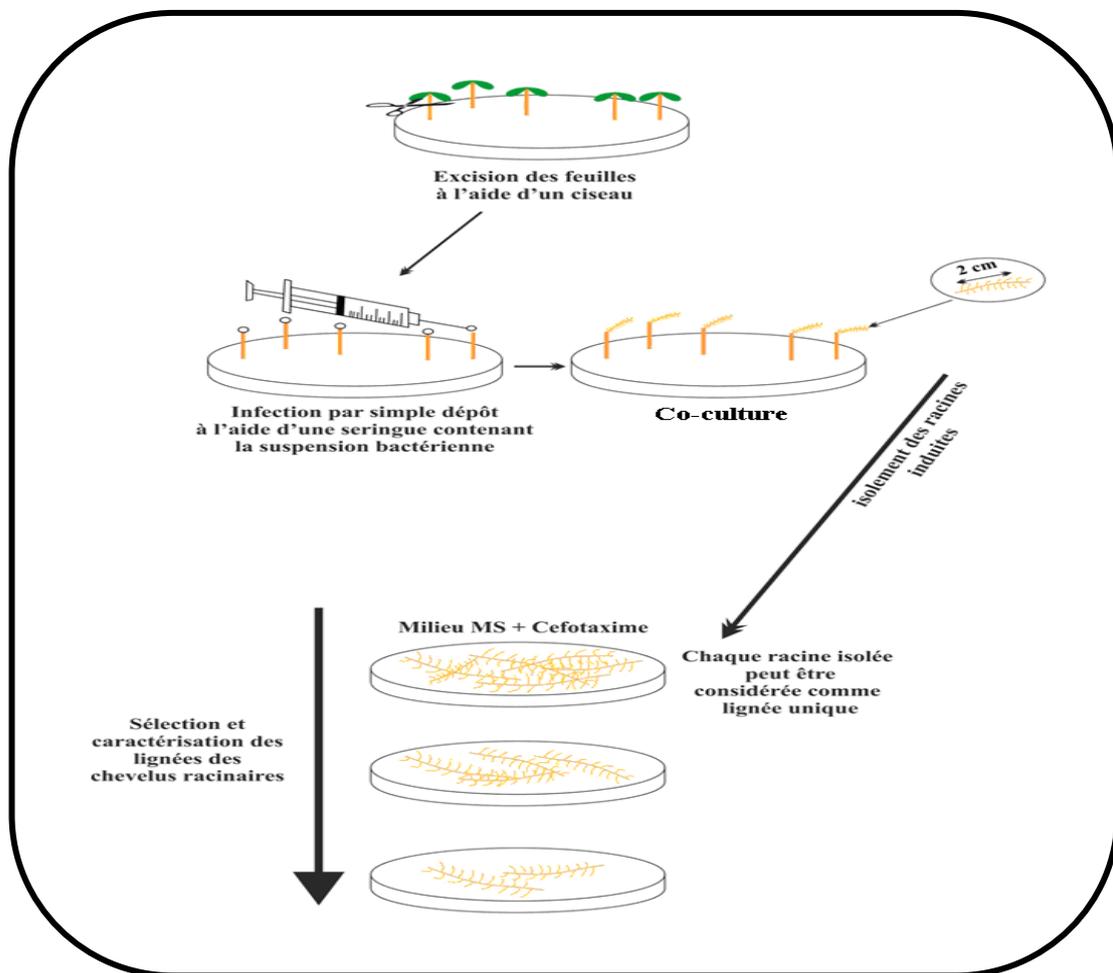


Figure 13: Méthode de l'infection, de la co-culture et de l'isolement des racines induites.

I.3.4.3. Caractérisation biochimique des lignées de CRs.

Après isolement et mise en culture des racines induites dans le milieu MS sans régulateurs de croissance et supplémenté de 0,25 g/l de céfotaxime, certaines racines ne démarrent plus alors que d'autres se développent à une vitesse variable (**Sahli et Gadiri, 2015**).

La sélection des lignées racinaires par **Sahli et Gadiri (2015)** est basée sur deux critères : les caractéristiques phénotypiques et la vitesse de croissance. On distingue deux groupes :

1. Le premier, regroupe des racines grêles, peu ramifiées à croissance faible ou callogènes. Les racines de ce groupe sont éliminées.
2. Le deuxième groupe comporte des racines avec des ramifications latérales abondantes, et une croissance plagiotropes plus ou moins rapide (**Tepfter, 1982**). Les racines de *Z. album* qui ne montrent pas des caractéristiques d'un chevelu racinaire décrit par **Tepfter (1982)** sont considérées comme racines non transformées. Le choix des lignées racinaires est limité donc à ce groupe.

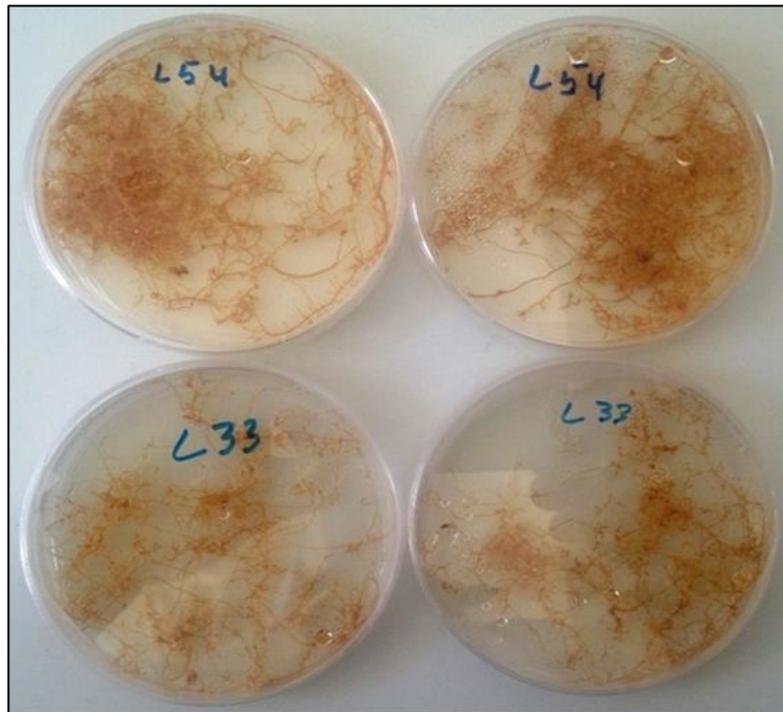


Figure 14 : Deux lignées de CRs sélectionnées par **Sahli et Gadiri (2015)**.

II. Matériel et méthodes

Notre stage pratique a été réalisé durant 08 mois (Février à Septembre 2017) aux laboratoires de physicochimie et de pharmacotoxicologie à SAIDAL BIOTIC de Semmar. Pour réaliser les tests phytochimiques, dosage quantitatif des polyphénols totaux ainsi que l'étude pharmacologique. L'étude biotechnologique a été effectuée au niveau du laboratoire de projet de fin d'études (PFE) « laboratoire d'amélioration des plantes et laboratoire de physiologie végétale » de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (BLIDA 1).

Les objectifs de notre stage sont les suivants :

- Etude phytochimique qualitative "screening phytochimique" de la partie aérienne de *Zygophyllum album* L.
- Dosage quantitatif des teneurs en polyphénols totaux d'un extrait méthanolique de *Zygophyllum album* L, obtenus par spectrophotométrie.
- Etude pharmacologique pour tester l'effet anti-hypoglycémique et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album* L.
- Etude de la germination *in vitro* des graines de *Zygophyllum album* et comparaison de différentes doses d'hormones de croissances "auxines et cytokines" : (AIA / BAP et 2,4D / BAP).
- Optimisation des conditions de culture des chevelus racinaires, obtenus par **Zaidi et Masmoudi (2016)** via la transformation génétique par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*.

II.1. MATERIEL :

II.1.1. Matériel biologique

A. Matériel végétal

Notre étude est réalisée sur différentes parties la plante de *Zygophyllum album* L.

a) Partie aérienne de *Z. album* (**Figure 15.A**) (tige, feuille, fleur, fruit) récoltée dans la région de Adrar en Avril 2017, séchée à l'ombre et broyée sous forme de poudre (**Figure 15.B**). Nous l'avons utilisé pour préparer l'infusé (**figure 15.C**) afin de réaliser le screening phytochimique.

L'identification botanique de cette plante a été effectuée par Madame Bradea M.S maitre de conférence (A) et Monsieur MATTAI maitre-assistant (B) du laboratoire de biologie végétale du département d'Agronomie de l'Université de Blida.

b) Graines de *Z. album* (**Figure 15. D**) sont obtenus à maturité au mois d'Avril 2017, dans la région de Bechar.

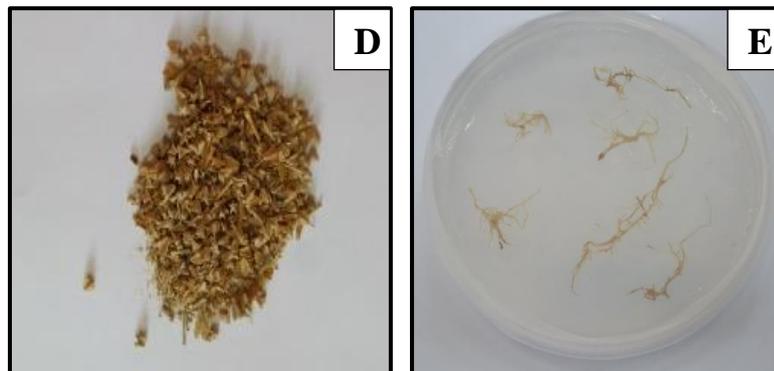
c) Les chevelus racinaires (hairy roots) (**Figure 15. E**) obtenus par transformation génétique via la souche A₄ d' *Agrobacterium rhizogenes*. Ils sont obtenus par Sahli et Gadiri (2015) et Zaidi et Masmoudi (2016) au niveau de l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF) de Bainem à Alger.



A : Partie aérienne

B : Poudre de la partie aérienne

C : L'infusé



D : Graines

E : Chevelus racinaires

Figure 15 : Différentes parties de la plante *Zygophyllum album L.*
(Originale, 2017)

B. Matériel animal

L'évaluation des deux activités biologiques (Activité anti-hypoglycémiant et anti-inflammatoire), est réalisé sur des souris Albinos (**Figure 16**), de souche *N.M.R.I.* (*Naval Medical Research Institute*), de sexe mâle et femelle, de poids corporel variant entre 24 à 30g, au nombre de 20, provenant de Saïdal (Semmar).

➤ **Condition d'élevage :**

- Nourriture : granulée
- Boisson : eau de robinet
- Température : 20 à 25 °C
- Taux d'humidité : 50%
- Eclairage : 10h/ jour



Figure 16: Souris albinos utilisées pour l'étude des activités biologiques (Originale, 2017).

II.1.2. Matériel non biologique (Annexes 1,2)

a. Culture *in vitro*

Milieux de culture : Milieu MS solide et liquide

Verrerie : Erlenmeyer, tubes à essai, pipettes pasteur...etc

Appareillage : Hotte à flux lumineuse, Autoclave, Etuve, pH mètre...etc

b. Screening phytochimique

Produits chimique et réactifs : Nous avons utilisé, Acide gallique, Réactif de stiany, Réactif de folin ciocalteu ...etc

c. Activités biologiques

Accessoires : Sondes de gavage, seringues de 2.5 ml, Flacon ambré... etc

II.2. Méthodes

II.2.1. Tests phytochimiques

Le but de ces tests, est de vérifier la composition en métabolites secondaires de notre espèce. Ils sont effectués soit sur la poudre obtenus après broyage de la partie aérienne séchée de *Z. album*, soit sur l'infusé ou soit sur la partie aérienne concassée.

II.2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux (infusé) :

Après séchage, dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière du soleil, la plante est broyée entièrement, puis pesée (M = 500 g).

La préparation de l'extrait aqueux à 20 % de *Z. album* est réalisée en additionnant une quantité de 20 g de poudre de la partie aérienne (tige, feuille, fleur, fruit) à un volume de 100ml d'eau distillée bouillit. Ce mélange est laissé pendant 30 minutes en infusion, avec agitation. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tour/ min pendant 10 minutes pour le faire débarrasser des débris de plante puis filtré sur papier de type Wattman. Le filtrat est ensuite mis dans des petits flacons en verre.

II.2.1.2. Screening phytochimique

C'est un ensemble de réactions colorimétriques qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans une plante. Ces dernières se manifestent soit par la présence ou l'absence du métabolite secondaire recherché.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut en citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols totaux (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages).

a. Flavonoïdes

On met 10 g de poudre végétale dans 150 ml d'acide chlorhydrique (HCl) concentré (37 %) (1g dans 100), pendant 24h, ensuite on filtre la solution sur papier Wattman.

On prend 10 ml du filtrat et on ajoute 5 ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH₄OH) concentré (30%) (30 g de soluté dans 100 g d'ammoniac) dans le but de rendre le milieu basique.

Un test est considéré comme positif, par l'apparition d'une couleur jaune, dans la partie supérieure du tube à essai (N'Guessan *et al* ; 2009).

b. Polyphénols totaux

La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) a permis de caractériser les polyphénols totaux. A un volume de 2 ml de l'extrait aqueux, on ajoute une goutte de solution alcoolique de chlorure

ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée serait le signe de la présence des poly phénols (**Gherib, 1988**).

c. Dérivées phénoliques

On ajoute une goutte de la solution chlorure ferrique (FeCl_3) (5%) à l'extrait aqueux. L'apparition d'une coloration verte ou bleue indique la présence des dérivées phénoliques (**Gherib, 1988**).

d. Coumarines

On fait bouillir 2 g de poudre végétale avec 20ml d'éthanol absolu ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) pendant 15 min en agitant. On laisse le mélange refroidir puis on le filtre.

On ajoute au 2 à 3 ml du filtrat, 10 gouttes d'hydroxyde de potassium (KOH) dilué dans l'éthanol 10% (10 g de poudre de carbonate dans 100 ml d'éthanol) et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré (37%) dilué à (10%). Le test est positif par l'apparition d'une couleur rouge (**Gherib, 1988**).

e. Alcaloïdes

On ajoute à 1 g de poudre végétale 10 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) (10%) dans un tube à essai. Puis on Agite énergiquement pendant 2 min ensuite on filtre, et on ajoute 2 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes.

f. Anthocyanes

On prend 5 ml d'extrait aqueux à 20 % que l'on mélange avec 4 ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH_4OH) concentré (30 %). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des anthocyanine (**Gherib, 1988**).

g. Anthracénosides

❖ Formes aglycones oxydées

Une quantité de 0.2g de poudre végétale est mise à macérer pendant 15 min, en présence de 5 ml de chloroforme (CHCl_3). Après filtration, on ajoute au filtrat un volume de 2 ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH_4OH) diluée au demi $\frac{1}{2}$. On laisse décanter le mélange et on observe que la phase aqueuse se colore en rouge pourpre indiquant la présence des formes aglycones oxydées.

❖ Formes combinées

On infuse une quantité de 0.025 g de poudre végétale au bain marie pendant 15 min, en présence de 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique (HCL) concentré. Après la

filtration, on ajoute 5 ml de chloroforme (CHCl_3) et on agite. On laisse décanter et on prélève la phase chloroforme (trichloro-methan) que l'on évapore à sec.

On ajoute au résidu 2 ml d'ammoniaque dilué au demi ($1/2$). Une coloration jaune qui se développe en vire au rouge par chauffage au bain marie indique la présence des formes combinées (**Paris et Moyse, 1965**).

h. Tanins

La présence de tanins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait aqueux à 20%, 1 à 2 gouttes de solution de chlorure ferrique (FeCl_3) diluée 10 % (10 g dans 100 ml d'eau distillée). L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins. (**karumi et al, 2004**)

❖ **Tanins galliques**

A 5 ml de l'infusé, on ajoute 2 g d'acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) et quelques goutte de chlorure ferrique (Fe Cl_3) à (1%). La réaction donne une coloration une coloration bleue foncée en la présence des tanins gallique.

❖ **Tanins catéchiques**

On additionne 15 ml d'infusé (20%) à 7ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol (CH_2O) à 40 % et 5 ml d'HCl concentré) que l'on chauffe au bain marie à 90°c . La réaction donne une coloration rouge brique en présence des tanins catéchiques.

5 ml de l'infusé (10 %) avec quelque goutte de solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 5 %. La réaction donne une coloration bleue noire en présence des tanins catéchiques.

i. Saponosides

On prend 2 ml d'extrait aqueux à 20 % , on ajoute 2 ml d'une solution à 1 % (1 g d'acétate de plomb $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ dans 100 ml d'eau). Le test est considéré comme positif par l'apparition d'un précipité (**Gherib, 1988**).

On s'est basé sur l'indice de mousse, on relève la hauteur de la mousse en **cm**. Si elle est supérieur à 1 cm cela indique la présence de saponosides (**N'Guessan et al, 2009**). On verse 80 ml d'eau distillé à 2 g de poudre végétale et on laisse jusqu'à l'ébullition, puis on filtre et le refroidi la solution. On agite le filtre verticalement. L'apparition d'une mousse qui dure quelque instantes.

j. Quinones

Les substances quinoniques ont été recherchées à partir du réactif de Bornstraegen. On évapore à sec 2 ml de l'extrait aqueux. On traite le résidu dans 5 ml d'acide Chlorhydrique (HCl) au $1/5$. On verse le triturât dans un tube à essai, puis on le porte au Bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme (CHCl_3). On ajoute 0.5

ml de l'ammoniaque (NH_4) diluée 2 fois à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette constituait le signe de la présence des quinones (**Gherib, 1988**).

k. Terpènes

On mélange 5ml d'extrait aqueux (20%) avec 5 ml d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) (couleur verte : dissolvez 4g d'acide phosphomolybdique R dans R de l'eau R et complétez a 40 ml avec même solvant, puis ajoutez prudemment et en refroidissant 60 ml d'acide sulfurique R préparer extemporanément (**pharmacopée Européen, 2017**)) et 5 ml d'acide sulfurique concentré(H_2SO_4) (96%).

L'apparition d'une couleur bleue révèle la présence des terpènes (**Gherib, 1988**).

l. Irridoïde

On ajoute 1 ml d'acide chlorohydrique (HCl) concentré à l'extrait aqueux. La formation de précipité noire après chauffage de cet extrait caractérise la présence des irridoides (**Paris et Moyse, 1965**).

m. Hétérosides cardiotonique

A 1ml d'extrait aqueux à 20%, on ajoute 1ml de solution de sulfate ferrique ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) (5%) et 100ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4), selon la réaction de Keller- Kiliani on obtient une coloration en fonction de la structure des hétérosides cardiotoniques mise en jeu à savoir (**Parekh et al ; 2006**).

n. Glucosides

On mélange 2 g de poudre végétale avec quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4), Concentré (96 %). Le test est considéré comme positif quand le mélange prend une couleur rouge-bleue (**Gherib, 1988**).

o. Mucilage

On introduit 1ml de l'infusé à 10% dans un tube à essai et on ajoute 5ml d'alcool absolu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), on attend 10 min. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilage. (**Gherib, 1988**).

p. Acides aminés

On met 1 g de matériel végétal concassé dans un tube à essai contenant de l'eau distillée chaude. On agite le mélange, puis on le filtre.

On ajoute une quantité de la solution de ninhydrine ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) au filtrat. Une coloration rouge indique la présence des acides aminés (**Paris et Moyse, 1965**).

II.2.1.3. Dosage des polyphénols totaux

A. Préparation de l'extrait végétal brut

Dans un bécher, on additionne 1 g de poudre végétale (drogue) à 100 ml d'éthanol 70% qu'on laisse pendant 48h. On filtre le mélange puis on le sèche dans un rotavapeur. Le résidu sec est récupéré avec 100 ml d'eau distillée bouillante. Après refroidissement, le mélange est décanté avec 50 ml de n-butanol (Figure 17)(Harborne, 1973).

Deux phases apparaissant (Figure 18):

- Hypo-phase aqueuse : de couleur brunâtre est éliminé
- Epi-phase butanolique : de couleur verdâtre contenant les polyphénols totaux, est évaporée à sec hotte ventilée. L'extrait est récupéré avec 5 ml de méthanol puis conservé aux frais pour être utilisé pour les analyses quantitatives par spectrophotomètre.

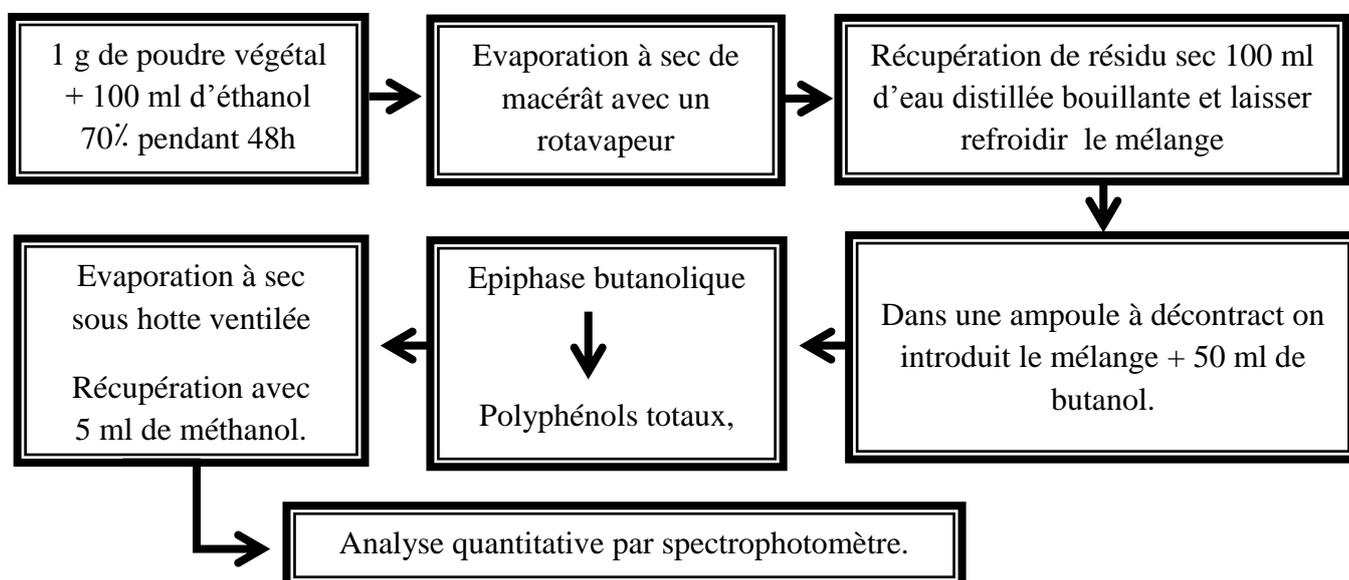


Figure 17: Protocole expérimental d'extraction, dosage et identification des polyphénols totaux de la partie aérienne de *Z. album*.

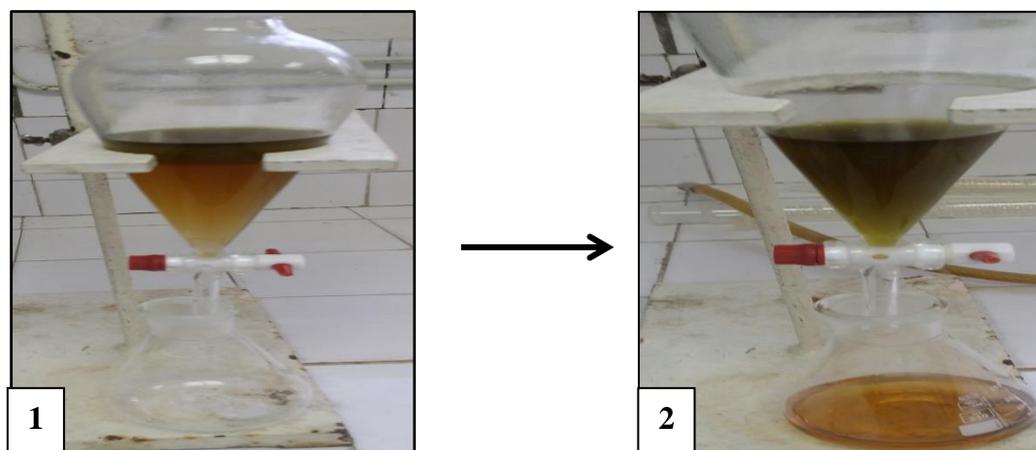


Figure 18 : Récupération de La solution aqueuse obtenue par le méthanol (Originale, 2017).

B. Dosage quantitatif des polyphénols totaux par spectrophotométrie

➤ Principe

Le principe repose sur l'absorbance de la lumière par les espèces chimiques. L'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance. Ceci se traduit par une loi d'absorption appelée loi de Beer-Lambert (**Di denedetto et al., 2007**).

$$\text{Log } I_0 / I = \text{DO} = \text{K.e.C}$$

C : la concentration de l'espèce absorbante, exprimée en (moles. l⁻¹), de l'espèce absorbante.
l : le trajet optique, exprimé en (cm). **e** : le coefficient d'absorption molaire, exprimé en (l.mol⁻¹.cm⁻¹) ou coefficient d'extraction molaire (cm².mol⁻¹)

a. Dosage des polyphénols totaux

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux.

L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée (**Chouih, 2012**).

➤ Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₃). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits végétaux. (**Boizot, 2006**)

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie ultraviolet-visible, suivant le protocole appliqué par **Miliauskas et al (2004)**.

➤ Mode opératoire

Nous mélangeons 0,5 ml de l'extrait méthanolique de *Z. album* à 2,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué à 10% et 5 ml d'eau distillée. Après 1 min, nous ajoutons 7,5 ml de carbonate de sodium (20%).

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0.06, 0.12, ..0.3 mg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage (les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / gE). La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un Spectrophotomètre ultraviolet-visible, à une longueur d'onde de 765 nm après 2h d'incubation, à l'obscurité et à température ambiante contre un blanc préparé de la même manière sauf qu'il ne contient pas d'acide gallique mais de méthanol. Les valeurs de l'absorbance de chaque concentration nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La concentration des polyphénols totaux présents dans l'extraits méthanolique exprimée en mg équivalant d'acide gallique par g d'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols totaux}] = a. f / b$$

a = concentration des polyphénols en mg/ml déterminée à partir de courbe étalon.

f= facteur de dilution.

b= Concentration initiale de l'extrait méthanolique (Mechernene, 2014).

II.2.1.4. Etude des activités biologiques de la partie aérienne de *Zygophyllum album* L.

A. Etude de l'activité hypoglycémiant de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album* L.

Nous avons suivis la méthode décrite par Skima *et al* ; (1999)

➤ Principe

Consiste à provoquer une hyperglycémie temporaire chez les animaux non diabétiques et ensuite vérifier l'effet de nos extraits de *Zygophyllum album* produits en étude sur l'hyperglycémie.

➤ Préparation de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album*

Pour la dose 1: On infuse 0.025 g de poudre végétale avec 10 ml de l'eau bouillante, on laisse la solution infuser, puis on filtre sur papier Wattman. donne un infusé dosé à 0.25g/ml.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ g} \\ X \longrightarrow 25 \text{ g} \end{array} \quad \boxed{X = 0.025 \text{ g}}$$

Pour la dose 2 : le même protocole appliqué pour l'obtention d'une dose de 0.125g/ml

➤ **Préparation de la solution médicament**

On utilise le médicament **Metformine (850 mg)**, qui traite le diabète II. On prépare une solution de 10% (10g de médicament en poudre sont dissous à 100 ml d'eau).

➤ **Mode opératoire**

Pour appliquer les traitements, les souris sont réparties en 4 lots de 5 souris. Elles sont soumises à un jeun, non hydrique pendant 18h. Nous avons mesuré la glycémie de base et provoqué une hyperglycémie temporaire chez les souris en administrant par gavage un volume de 0,5 ml de glucose à 10% (1g de glucose dilué dans 10ml de l'eau distillée) (**Figure 19.A**). Nous avons mesuré la glycémie au bout de 30min (**Figure 19.B**).

Pour appliquer des traitements, les souris sont réparties en **4 lots de 5**. Ils ont été traités comme suit :

Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau physiologique

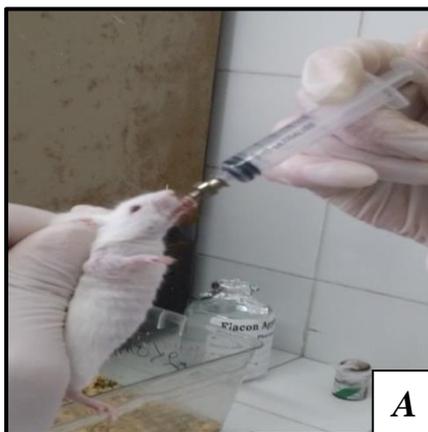
Lot essai 01 : référence, les souris reçoivent 0,5 ml d'un produit de metformine 0.5g/kg

Lot essai 02 : traité avec 0,5 ml de l'extrait aqueux de *Z album*. A une dose de : 0.5g/kg

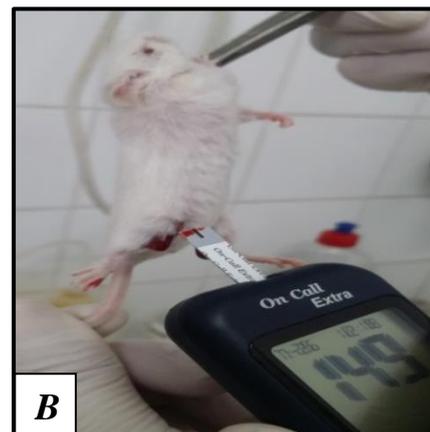
Lot essai 03 : traité avec 0,5 ml de l'extrait aqueux de *Z album*. A une dose de : 1g/kg

L'administration des solutions a été faite par le gavage à l'aide d'une sonde gastrique par voie orale.

La glycémie des quatre lots est évaluée à l'aide d'un glucomètre pendant 3 heures.



A : Administration par gavage des suspensions



B : Mesure de glycémie

Figure 19 : Administration des suspensions par gavage et mesure du taux de glycémie à l'aide d'un glucomètre (**originale, 2017**).

Le protocole expérimental utilisé dans l'activité anti-hypoglycémiant est résumé dans le diagramme représenté sur la **figure 20** :

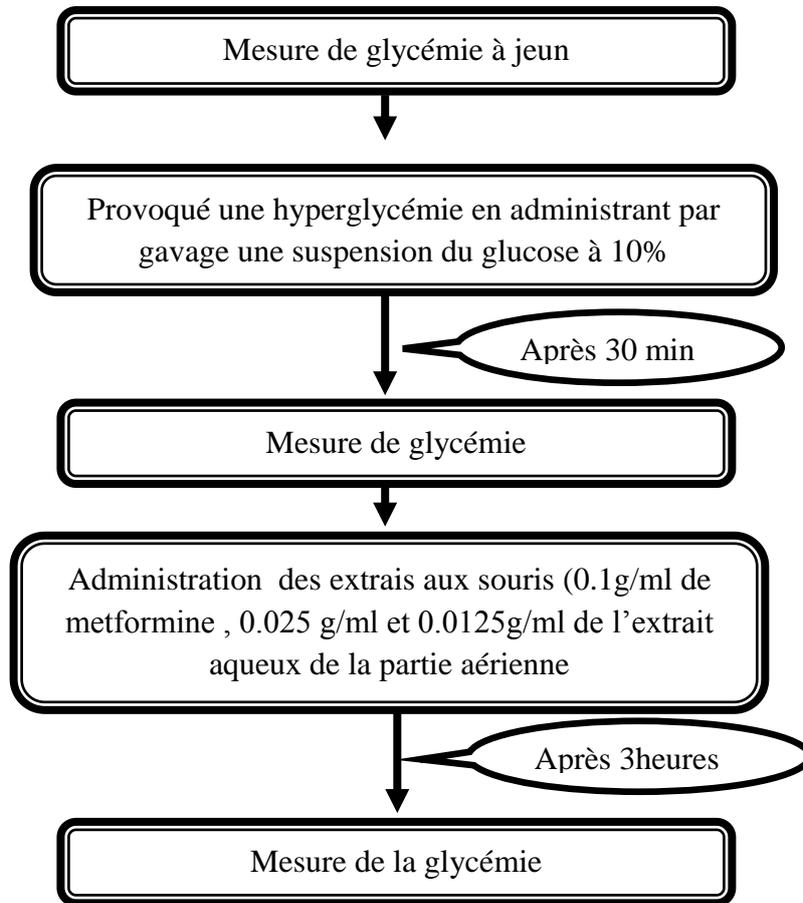


Figure 20: Diagramme expérimentale de l'activité anti-hypoglycémiant de l'extrait aqueux de *Z. album*.

B. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Zygodhylum album*.

L.

La mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de **levy, (1969)** citée par **Touari, (2012)**.

➤ Principe

Le principe général consiste à réduire expérimentalement chez l'animal de laboratoire un processus inflammatoire qui sera antagonisé par des substances censées être douées d'une activité anti-inflammatoire ; administrées préalablement (extrait aqueux de la partie aérienne de *Z album*).

➤ Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux à (0,2 ; 0,4 et 0,8mg/ml) sur l'œdème des pattes postérieures après injection d'une solution de carragénine à 1% chez les souris.

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire.

La préparation de la solution carragénine (1%), a été faite par une dilution de 50mg de la carragénine dans 5ml d'eau physiologique.

Les souris sont réparties en 5 lots de 4 souris chacun, un lot témoin et 4 lot tests. Les souris des 5 lots ont été mises à jeun pendant 18 heures avant l'expérience.

Au temps T_0

Les souris ont reçu par gavage les suspensions suivant à l'aide d'une sonde gastrique (**figure 21**).

Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau physiologique

Lot essai 01: les souris reçoivent 0,5 ml d'un produit anti-inflammatoire diclofénac 1%

Lot essai 02: les souris reçoivent 0,5 ml de l'infusé à une dose de 0,2 mg/ ml.

Lot essai 03: les souris reçoivent 0,5 ml de l'infusé à une dose de 0,4 mg/ ml.

Lot essai 04: les souris reçoivent 0,5 ml de l'infusé à une dose de 0,8 mg/ ml.



Figure 21 : Administration des suspensions par gavage (**originale, 2017**)

Après 30minutes

L'inflammation est provoquée par l'injection de 0,025 ml d'une solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de chaque souris (**figure 22**).



Figure 22 : Injection de la carragénine (1%) par voie sous cutanée (**Original, 2017**).

Après 4 heures de réaction

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Zygophyllum album* a été évaluée en sacrifiant les souris par l'utilisation d'éther éthylique puis en coupant les pattes postérieures gauches et droites à la hauteur de l'articulation (**figure 23**). Les pesées sont faites sur une balance analytique.



Figure 23 : Coupure des pattes postérieures au niveau de l'articulation (**Originale, 2017**).

➤ Expression des résultats

Nous avons calculé les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite pour chaque lot. Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% œdème) a été exprimé en appliquant la formule suivante :

Pourcentage œdème =

$$\left\{ \frac{\text{La moyenne des poids de la patte gauche} - \text{la moyenne des poids de la patte droite}}{\text{la moyenne des poids de la patte droite}} \right\} * 100$$

Calcul de pourcentage de réduction d'œdème :

Le pourcentage de réduction d'œdème est calculé selon la formule suivante :

Pourcentage de réduction d'œdème =

$$\left\{ \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème d'essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \right\} * 100$$

Le protocole expérimental utilisé dans l'activité anti-inflammatoire est résumé dans le diagramme suivant (**figure 24**) :

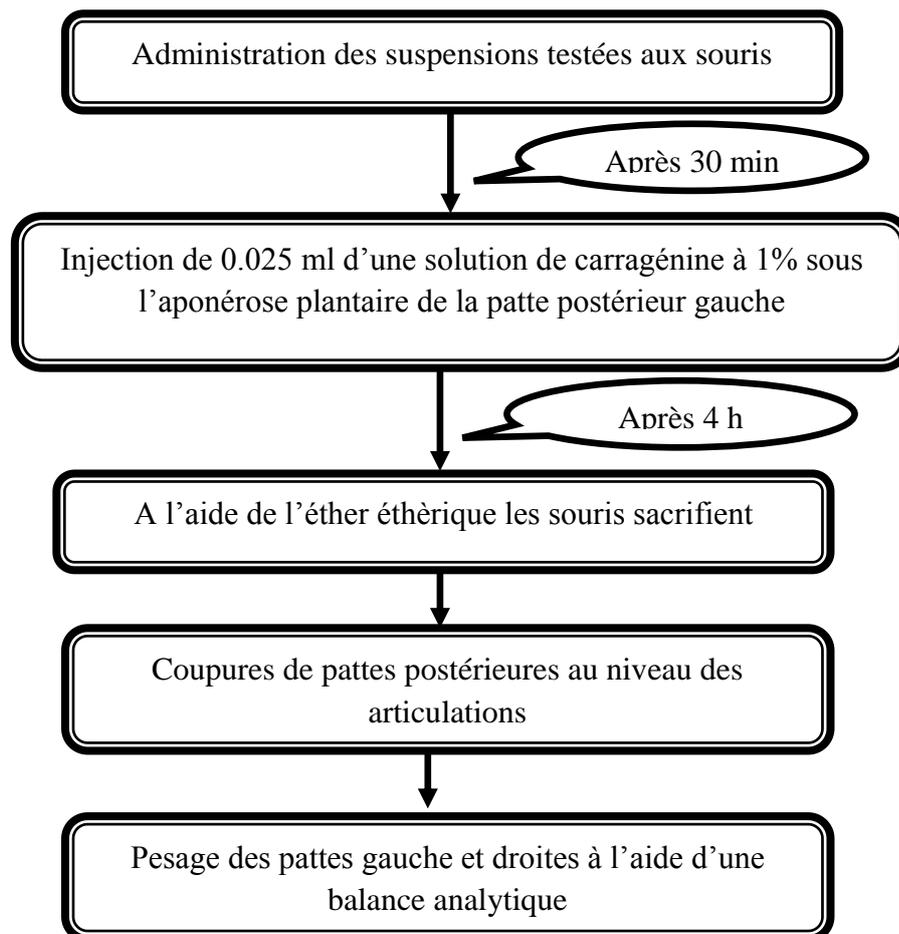


Figure 24: Diagramme expérimentale de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Z. album*

II.2.2. Culture *in vitro*

L'objectif recherché de cette partie est double :

- En premier, l'obtention de vitroplants de *Z. album* à partir de graines mises à germer *in vitro*. Pour cela plusieurs balances hormonales sont testées. Le but est d'essayer de produire *in vitro*, de la biomasse et d'acquérir par conséquent une disponibilité de matériel végétal.
- En second, l'optimisation des conditions de culture *in vitro* de chevelus racinaires de *Z. album* obtenus via transformation génétique par la bactérie du sol (*Agrobacterium rhizogenes*). Ces cultures ont été obtenues par **Sahli et Gadiri (2015)** et **Zaidi et Masmoudi (2016)**.

L'optimisation est recherchée à travers l'étude de deux facteurs :

Salinité (Na Cl) à plusieurs concentrations, constance du milieu de culture (liquide ou solide)

Nous avons pratiqués toutes les manipulations en condition stériles, sous une hotte à flux laminaire horizontale. Le matériel utilisé (verrerie, pinces,...) est stérilisé soit à l'autoclave à 120°C ou par chaleur sèche dans un étuve à 180°C. Les milieux de culture, les différentes solutions (l'eau distillés, les solutions de Na Cl,...) sont également stérilisées par passage à l'autoclave à 120°C. Excepté pour les solutions thermolabiles comme les solutions d'antibiotiques ou régulateurs de croissances où ils sont stérilisés par un passage sur un filtre stérile de 0,2µm de porosité et ajoutées au milieu de culture après autoclavage.

II.2.2.1. Essai d'obtention de vitroplants de *Z. album*

A. Désinfection des graines

Les capsules de *Zygophyllum album*. (**Figure 25**) sont obtenus de Bechar à maturité.

Les graines de *Z. album* sont récupérées après dessiccation des capsules à l'aide d'un scalpel. Ensuite, on les met dans l'éthanol à 96° pendant 20 secondes puis trempées dans l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérilisée et enfin un séchage sur papier filtre stérilisé (**figure 26**).



Figure 25: les capsules de *Z. album*
(Original, 2017)



Figure 26 : les graines de *Z. album* après désinfection sous la hotte (Original, 2017)

B. Conditions de culture

a. Milieu de culture

Nous avons préparés 1L de milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) additionné de 7 g/l d'agar et de 30 g/l de sucre (glucose). Le pH est ajusté à 5,8 puis distribué dans 10 erlenmeyer et stérilisé à autoclave.

- **Préparation des milieux de culture**

Un milieu de culture est constitué d'eau, d'éléments minéraux macro et micro-éléments et une source de carbone. A ces éléments de base s'ajoutent des vitamines (Thiamine, Pyridoxine, Glycine...).

Nous avons utilisé le milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) dont la composition est formulée dans le **tableau 02**.

Tableau 2 : Composition du milieu de culture MS (**Murashige et Skoog, 1962**).

Constituant	Eléments chimique	Concentration (mg/l)
Macro-éléments	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
	MgSO ₄	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micro-éléments	KI	0.83
	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ , H ₂ O	16.9
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.6
	Na ₂ MoO ₄ , H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025
	COCl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Fer	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.2
Vitamine	Inositol	100
	Acide Nicotinique	0.5
	Pyridoxine HCl	0.5
	Thiamine HCl	0.1
	Glycine	2

Les proportions de milieu MS est indiqué dans le **tableau 3**

Tableau 3 : les différentes proportions du milieu

Le composant	La quantité (ml) pour un L
Macro- éléments	100
Micro-éléments	10
Fer chélaté	10
Vitamine	1

Le pH est ajusté à 5,8 avec une solution d'Hydroxyde de sodium (NaOH) ou l'Acide Chlorhydrique (HCl) 1N après l'ajoute d'une quantité (g) de source de carbone telle que le Saccharose, glucose; le milieu est solidifié par l'agar-agar puis stérilisé dans l'autoclave.

b. Balances hormonales

Après autoclavage et sur les mêmes milieux de culture, nous avons ajoutés différentes concentrations de régulateurs de croissance : Auxines (ANA, 2,4D) et Cytokinine (BAP). Les solutions de régulateurs de croissances sont préalablement stérilisées par passage sur des filtres stériles de porosité (0.20 µm) Les tableaux suivants (**Tableaux 04 et 05**) résumé les différentes concentrations testées.

Tableau 4: condition hormonales ANA / BAP **Tableau 5** : condition hormonales 2,4D / BAP

	ANA (mg / L)	BAP (mg / L)
A x 3	0	0
B x 3	0.5	2
C x 3	0	2
D x 3	0.1	0.5
E x 3	0.2	0.3

	2, 4D (mg / L)	BAP (mg / L)
F x 3	0	0
G x 3	0.5	2
H x 3	0	2
I x 3	0.1	0.5
J x 3	0.2	0.3

C. Mise à germination des graines

Après la stérilisation, nous avons mis à germer les graines dans des tubes à essai contenant environ 20 ml de milieu MS solide supplémenté de régulateurs de croissance (**Tableaux 4 et 5**) à raison de 3 graines par tube. Nous avons réalisé 10 traitements et chaque traitement est répété 3 fois. Les cultures sont placée dans une chambre de culture à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une photopériode de 16 heures de lumière/ 8 heures d'obscurité.

La germination des graines de *Zygophyllum album* est contrôlé chaque 4 jours pendant 2 mois. Les différentes étapes d'obtention de vitroplants à partir de graines de *Z. album* sont résumées sur la **figure 27**.

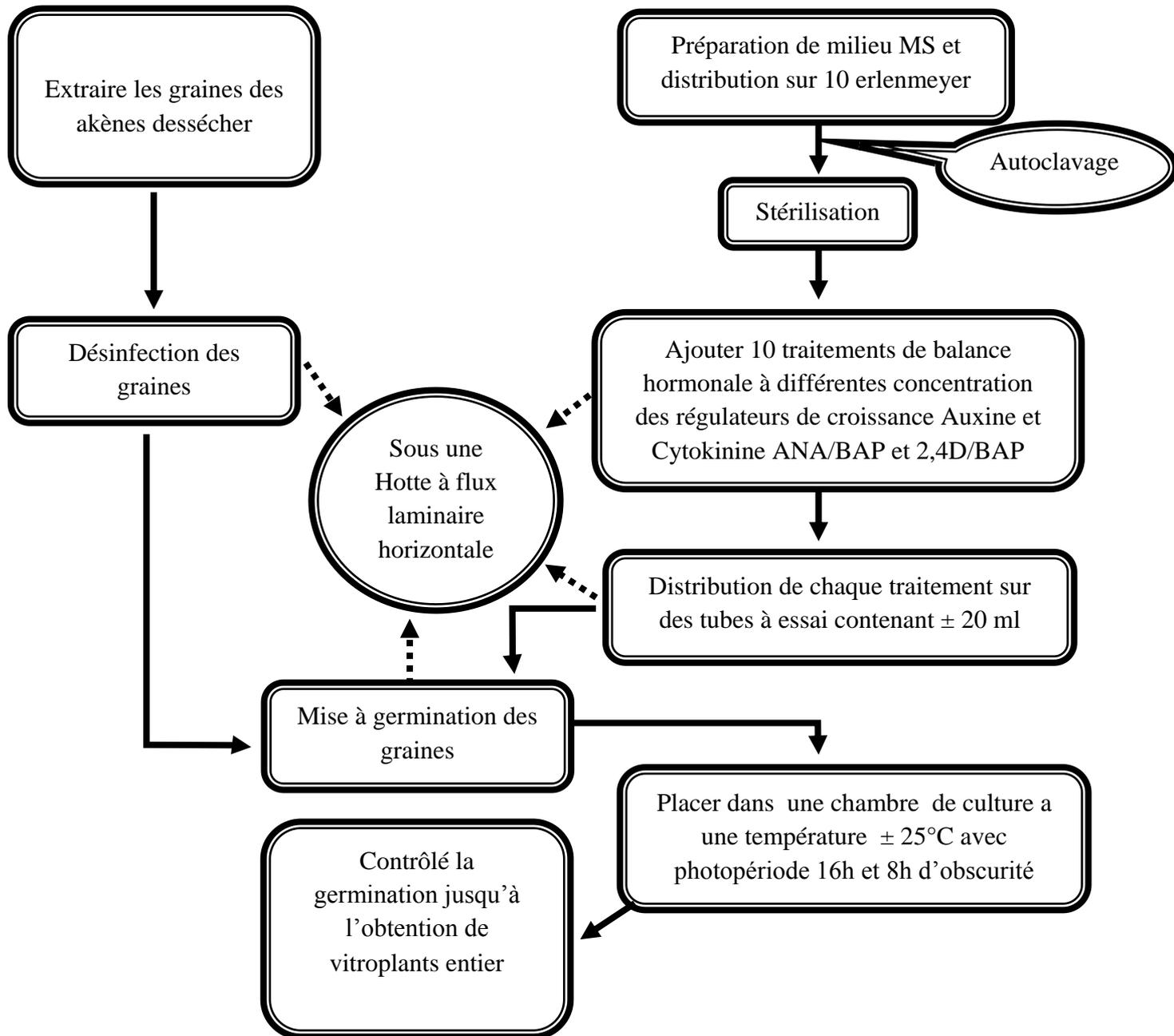


Figure 27 : Diagramme d'essai d'obtention des vitroplants.

II.2.2.2. Essais d'optimisation des conditions de culture de chevelus racinaires de *Z. album* obtenus après transformation génétique via l'*Agrobacterium rhizogenes*.

Etant donné la croissance, très lente des chevelus racinaires obtenus via la transformation génétique des explants de *Z. album* par la bactérie du sol (*Agrobacterium rhizogenes*), (**Sahli et Gadiri, 2015**) et (**Zaidi et Masmoudi, 2016**), nous avons pensé à faire varier les conditions

de culture *in vitro* de ces racines transformées en vue d'améliorer leur croissance et ceci dans un but d'obtenir suffisamment de biomasses pour pouvoir :

- ✓ Analyser leurs contenus en métabolites secondaires
- ✓ Comparer ces contenus avec ceux trouvés chez la plante entière de *Z. album* et tenter par conséquent, de vérifier l'hypothèse qui stipule que les chevelus racinaires obtenus après transformation génétique via la bactérie *Agrobacterium rhizogenes.*, accumulaient des métabolites secondaires à des quantités qui dépassaient celles trouvées chez la plante entière (Ahn et al; 1996).

A. Culture des chevelus racinaires sur milieu liquide

Les expériences de **Zaidi et Masmoudi, (2016)** ont portés sur la transformation génétique des tiges de *Z. album* par la bactérie du sol (*Agrobacterium rhizogenes.*). Ils ont obtenus différentes lignées de chevelus racinaires (L33, L51 et L54).

Un volet de notre étude biotechnologique. Sur *Z. album* consiste à tester l'effet de deux facteurs (différentes concentrations de NaCl et consistance du milieu de culture) sur la vitesse de croissance des différentes lignées de CRs. Ces dernières sont récupérées de l'IRNF dans des boîtes de pétri contenant le milieu MS solide, sans régulateur de croissance et supplémentés de Céfotaxime (0,25 g/l).

a. Préparation de milieu MS liquide et solide

Nous avons préparé un milieu MS à des proportions identiques à celles utilisés pour la germination des graines. Ce milieu est supplémenté de 20g/l de saccharose. Le pH est ajusté à 5,8. Aucun régulateur de croissance n'est utilisé.

Un milieu solide de même composition que le milieu liquide, additionné de 9g/l d'agar est préparé pour le repiquage des CRs chaque 21jours dans le but de renouveler leur milieu nutritif.

b. Mise en Culture des chevelus racinaires

Après la préparation de milieu MS liquide et solide et leur stérilisation à l'autoclave à (120°C), les CRs sont mis en culture dans des erlenmeyer de (300 ml) contenant 100 ml de milieu MS liquide. Chaque condition expérimentale est répétée 3 fois (**figure 28**). Les chevelus racinaires sont mise en agitation à 110 rpm et reste fixer de 24/ 24 heures sur une plaque d'agitation « innova 2300 » à l'obscurité et à une température de 25 ±1°C.

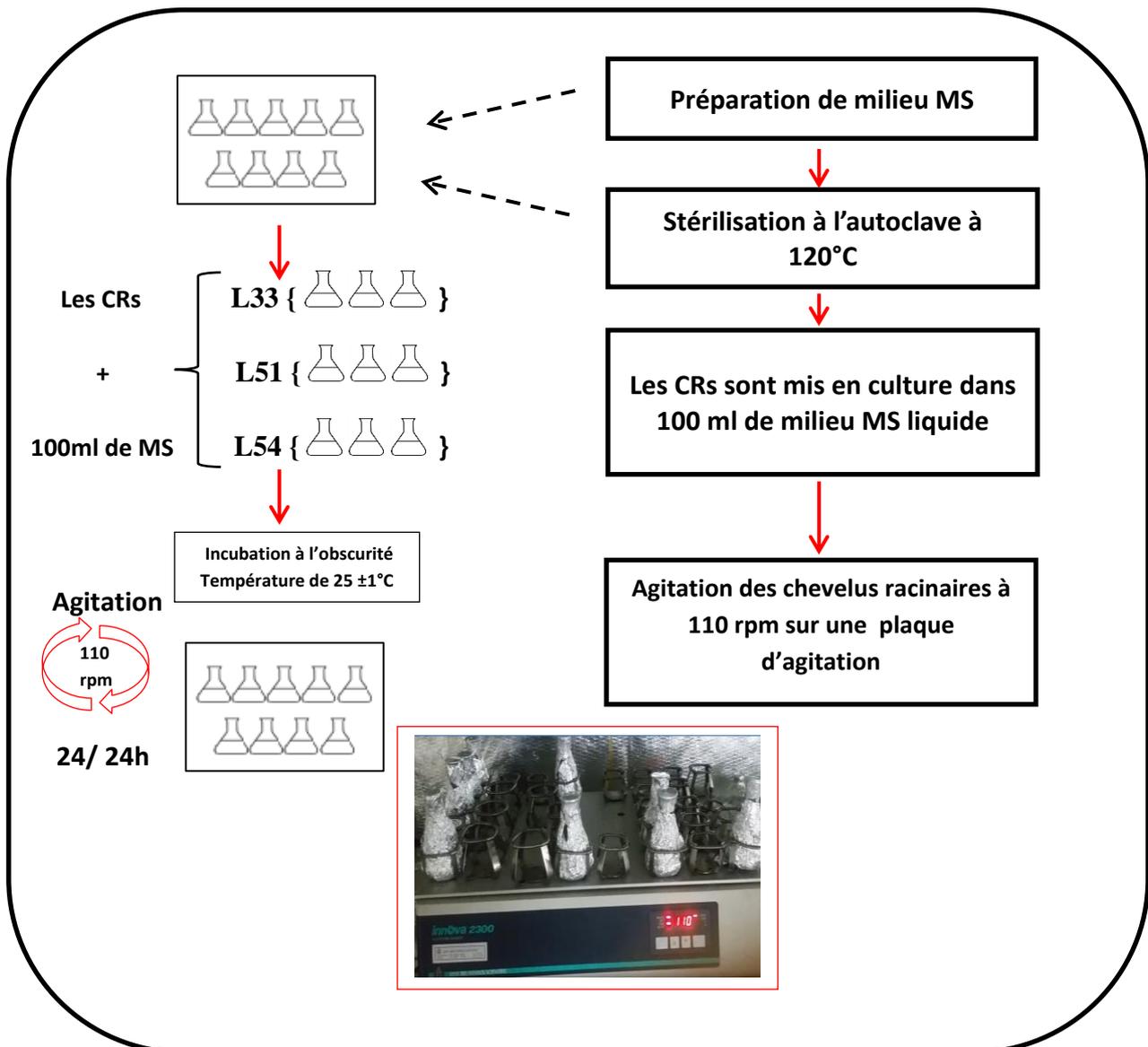


Figure 28 : Mise en culture des chevelus racinaires dans un milieu MS liquide.

B. Effet du Na Cl sur la croissance des chevelus racinaires

Afin d'évaluer l'effet de la salinité sur le processus de croissance de différentes lignées des chevelus racinaires (L54, L51 et L33) cultivées dans des erlenmeyers de (300 ml), contenant 100 ml de milieu MS liquide. Après 21 jours de la mise en culture des CRs on ajoute des volumes de Na Cl avec cinq différentes concentrations (1, 2, 3, 4 et 5 g/l). Les cultures témoins n'ont reçu aucun traitement. Le Na Cl est ajouté au milieu de culture à partir d'une solution mère (100g/l) préalablement préparé puis autoclavée.

Le diagramme suivant résume les différentes méthodes expérimentales utilisées (**figure 29**):

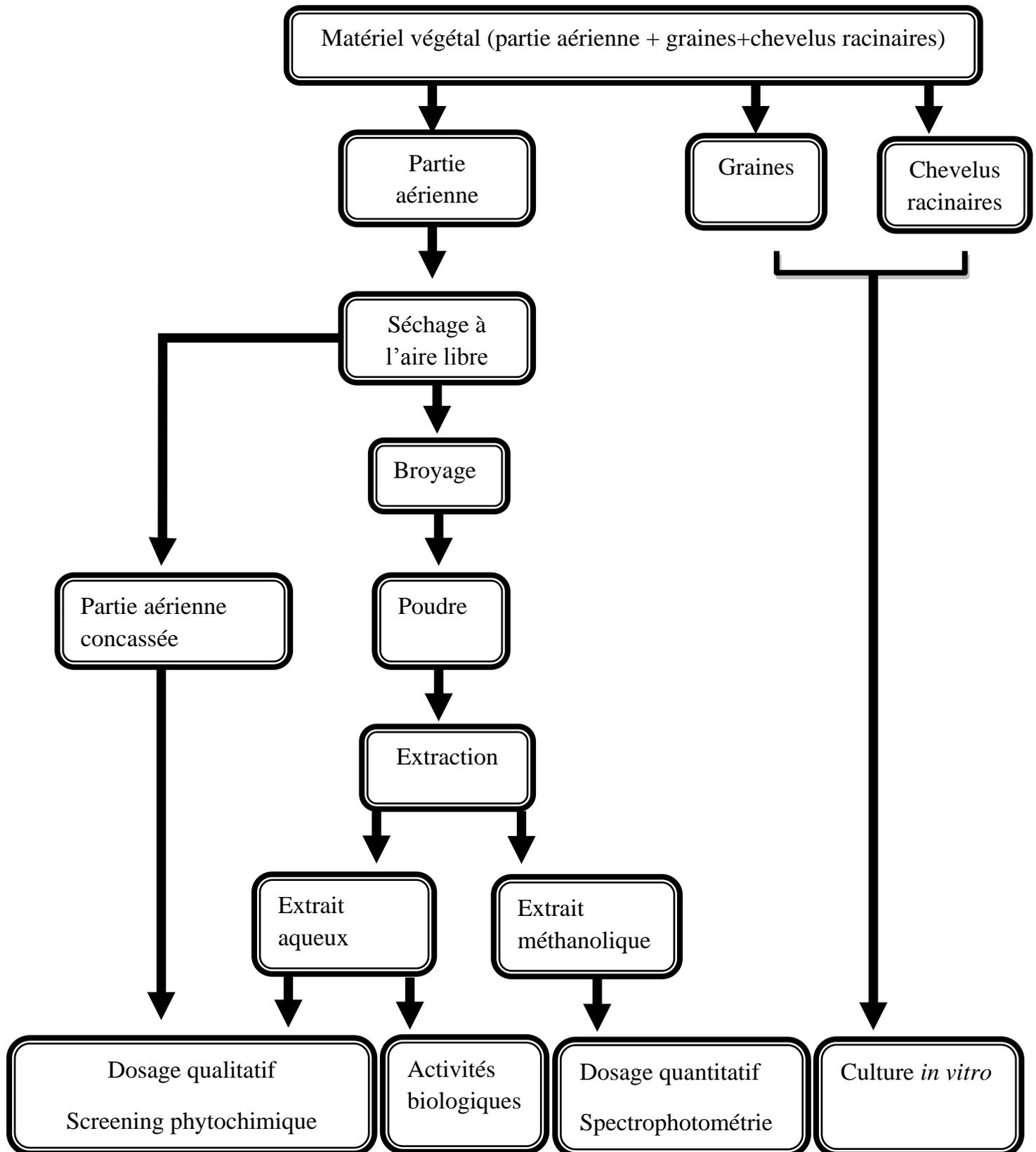


Figure 29 : Diagramme des différentes méthodes expérimentales.

Le présent travail a pour double objectif, premièrement :

- L'étude phytochimique de la partie aérienne de *Zygophyllum album* ainsi que l'évaluation de ses activités biologiques : anti-hyperglycémiant et anti-inflammatoire.
- L'étude biotechnologique de *Zygophyllum album* qui consiste, en premier à optimiser les conditions de culture *in vitro* de lignées de chevelus racinaires "Hairy root" obtenus après transformation génétique d'explants de cette espèce par **Zaidi et Masmoudi, (2016)**. Cette optimisation a concerné d'une part à l'étude de l'effet de concentrations variées de Na Cl (0,1,2,3,4,5 mg/l) sur la croissance des CRs. L'effet de milieu MS liquide a été également testé d'autre part.

En second, cette étude biotechnologique a porté sur des essais d'obtention de vitroplant à partir de graines de *Z. album*, soumise dans le milieu de culture solide avec différentes concentrations de régulateurs de croissance (ANA, 2,4 D et BAP).

L'analyse phytochimique qualitative a révélé la présence de flavonoïdes, Tanins Catechique, Saponosides, Dérivés phénolique, Terpènes, Mucilage, Glucosides, et absence des dérivés anthracéniques libres et combinés, Coumarines, Tanins Galliques, Irridoïdes, Acides Aminé, formes aglycones oxydé, Quinones et Anthocyanines.

Quant à l'analyse quantitative (dosage des polyphénols totaux) de l'extrait méthanolique macéré de notre plante, celle-ci a révélé la présence d'une quantité de 3.88 mg EAG/ g d'extrait méthanolique .

En ce qui concerne le volet portant sur l'étude des activités biologiques de notre extrait, celle-ci a montré que l'extrait aqueux de *Z. album* est doté d'une activité anti-hyperglycémiant, estimée des pourcentages de 5,15% et 6,14% de réduction de la glycémie, après 60 min de traitement et ceci respectivement aux doses 0,125g/ml et 0,25g/ml.

L'extrait aqueux de *Z. album* a montré un effet anti inflammatoire à une dose de 0,8 mg/ml. Puisque le pourcentage de réduction de l'œdème correspondent atteint 53,63%.

L'étude biotechnologique a consisté à réaliser sur une culture des chevelus racinaires dans un milieu de liquide, ce qui a permis de développer des ramifications plagéotropiques des poils absorbants au niveau des CRs . Un effet remarquable de la salinité de milieu par les concentrations 4 et 5 g/l de Na Cl sur la l'amélioration des ramifications des CRs.

L'autre part de cette étude était de réaliser une germination *in vitro* des graines de *Z. album*, Dans des conditions hormonales variables. Les résultats étaient différents selon les conditions

De ce fait les graines traitées par la condition C avaient une tendance vers la caulogénèse par contre celles traitées par les conditions D et J avaient une tendance vers la calogénèse.

A travers ce travail, nous avons pu confirmer scientifiquement que l'extrait aqueux de l'espèce *Z. album* est bien doté d'effets anti-inflammatoire et anti-hyperglycémiant non négligeables. Ceci justifie son utilisation par les populations locales du Sahara pour traiter certains pathologies, telles que le diabète (**Maïza et al ; 2003**). D'autres effets curatifs ont été recensés, qui sont relatifs à l'indigestion, dermatoses, eczéma, abcès, soin du visage, fièvre, brûlures de soleil, maux d'estomac, infection microbienne, gastrites (**Ould El Hadj et al ;2003**)

Ainsi, comme perspectives de recherche, l'étude soulève les points suivants :

- Analyser chimiquement «screening phytochimique » et d'une manière comparative les chevelus racinaires transformées optimisées *in vitro*, la plante entière récoltée *in vivo* et les plantes obtenues et ceci dans un but de vérifier les données de la bibliographie qui stipulent que les cultures organisées telles que les chevelus racinaires sont génétiquement stables et accumulent des métabolites secondaires à des niveaux parfois plus élevés que ceux rencontrés chez la plante sauvage (**Ahn et al ;1996**) ou dans des cultures de racines non transformées (**Yoshikawa et al ;1987**)

- Caractériser d'une part, les teneurs en métabolites secondaires (polyphénols ,terpènes, alcaloïdes , stéroïdesetc.) en utilisant des techniques de pointe telles que l'HPLC et la spectrofluométrie synchrone et d'associer, d'autre part , la nature des métabolites isolés avec les différentes activités biologiques (définir clairement quel métabolite est responsable de quelle activité biologique) surtout en ce qui concerne l'activité anti-hyperglycémiant.

Quant aux perspectives, relatives à la partie biotechnologique ;on peut dire que vu les contraintes rencontrées durant notre expérimentation par rapport à la croissance , très lente , de cette espèce *in vitro* il conviendrait d'étudier tout d'abord son comportement *in vivo* a fin d'optimiser son milieu de culture *in vitro*.

III.1. Etude phytochimique

III.1.1. Analyse qualitative par Screening phytochimique) des extraits de *Zygothymum album*.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires qui constituent une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Le **tableau 6** résume les différents tests phytochimiques réalisés sur la plante testée : *Zygothymum album*. (La poudre et l'extrait aqueux de la partie aérienne).

Tableau 6: Résultats du screening Phytochimique de la partie aérienne de *Zygothymum album*.

Métabolites secondaires	Résultat	Métabolites secondaires	Résultat
Flavonoïdes	++	Terpènes	+++
Alcaloïdes	+	Quinones	-
Tanins	+	Coumarines	-
Tanins Galliques	-	Anthocyanines	-
Tanins Catechique	++	Anthracyanines A	-
Saponosides	+++	Anthracyanines B	-
Irridoïdes	-	Dérivés phénolique	++
Hétérosides cardiotonique	+	Polyphénol	+
Acides Aminé	-	Mucilage	+++
Les formes aglycones oxydé	-	Glucosides	++

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -.

Selon le screening phytochimiques, nous avons cité quelques résultats illustré dans la (Figure 30).

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de la partie aérienne de *Zygophyllum album*. par screening chimique sont repris dans le **tableau 6**, dans lequel on remarque la présence de flavonoïdes, Tanins Catéchique, Saponosides, Dérivés phénolique, Terpènes, Mucilage, Glucosides. On note également la présence des alcaloïdes, polyphénols et des tanins.

Par contre, les tests de recherche de dérivés anthracéniques libres et combinés, Coumarines, Tanins Galliques, Irridoides, Acides Aminés, formes aglycones oxydé, Quinones et les Anthocyanines se sont révélés négatifs.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Touari (2013)** sauf qu'on note la présence des polyphénols dans nos résultats, ainsi que les études de **Belmimoune (2016)** sur les métabolites secondaires de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album*. montrent la présence des flavonoïdes, Tanins, Saponosides, et l'absence des dérivés anthracéniques libres et les Alcaloïdes. Alors que, **Benmaawer et Bouafia (2015)** citent des résultats positifs pour les Alcaloïdes, Coumarines, Anthocyanines, Flavonoïdes, Tanins, Saponosides et l'absence des terpènes.

Les travaux de **Ksouri et al., en 2013** ont pu démontré l'absence des dérivés anthracéniques libres, et les anthraquinones dans l'espèce de *Z. album*, ce qui est en accord avec nos résultats.

La présence de Tanins, Saponosides, Flavonoïdes, Glucosides cardiotonique et Mucilage a été mise en évidence chez une espèce appartenant au même genre *Zygophyllum* qui est *Z. geslini coss* (**Medjdoub et al., 2013**)

III.1.2. Analyse quantitatives des polyphénols totaux

Les composés phénoliques végétaux (polyphénols totaux) représentent les principaux groupes de constituants de plantes qui sont principalement de puissants antioxydants ou piègeurs de radicaux libres. Ils jouent un rôle bénéfique dans la santé humaine et la guérison, ils préviennent les maladies telles que les troubles inflammatoires, le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète qui se produisent en raison de la déréglementation du libre génération de radicaux dans les cellules (**Middleton et al., 2000 et Chouhan et Singh, 2011**) *in Belmimoune, 2016*).

➤ Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/gE), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 31**)

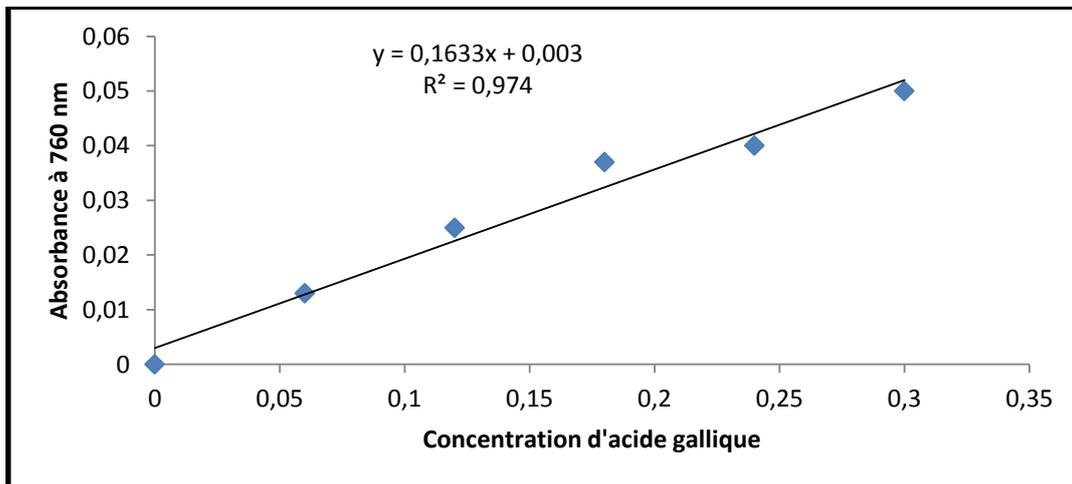


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le résultat de teneur des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique de *Zygophyllum album*. est exprimé en mg équivalent d'acide gallique par g d'Extrait méthanolique est défini dans le **tableau 7**.

Tableau 7: Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique de *Zygophyllum album*.

	Teneur des polyphénols totaux (mg E AG/g EM)
Extrait méthanolique de <i>Zygophyllum album L.</i>	3,88

Le spectrophotomètre a permis de quantifier le taux des polyphénols totaux dans l'extrait brut méthanolique de *Zygophyllum album*.

La plante contient **3,88 mg EAG /g EM** (mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait méthanolique), des polyphénols totaux.

D'après le résultat obtenu dans le **tableau n°7**, on remarque que le contenant de polyphénols totaux est comparable à ce que trouvé par **Belguidou, (2012)** a une valeur de **2.355 mg EAG /g** de matière végétal sur la même espèce provenant de Ouargla, mais reste inférieure par rapport au résultat trouvé par **Belmimoune, (2016)** qui donne une quantité de **6.7 mg EAG /g d'extrait sec méthanolique** et note que ces résultats est inférieure par rapport à celle de **Ksouri et al. (2013)** pour l'extrait méthanolique. Aussi, la teneur des polyphénols totaux est nettement supérieure à celle rapportée par **Chouih (2012)** d'une valeur de **1.9 mg EAG /g EM** sur l'espèce *Z. album* provenant de la région de Dbila de wilaya d'El-Oued.

Toutefois, il est difficile de comparer notre résultat avec ceux de la bibliographie, car plusieurs facteurs peuvent influencer la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques (polyphénols totaux) dans notre extrait, essentiellement les facteurs climatiques et environnementaux: la zone géographique, sécheresse, sol ...etc. (**Ebrahimi et al., 2008**) ainsi que la période de récolte, le stade du développement et la partie de la plante utilisée (**Miliauskas et al.,2004**), de plus, la méthode d'extraction, de quantification et la sélectivité du solvant utilisée peuvent également influencer sur la teneur en polyphénols totaux (**Lee et al., 2003**).

III.1.3. Activités biologiques

III.1.3.1. Activité anti hypoglycémiant

➤ L'effet de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album* L. sur la glycémie de base

Les résultats de l'administration de l'eau physiologique, de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album*. et de la Metformine sur les souris, sont rapportés sur le **tableau 1(Annexe3)** et la **figure n° 32**.

Les résultats de l'évolution de la glycémie (les concentrations moyennes de glycémie de chaque lot (lot = 05) chez les souris sont exprimés en (g / l) signifiés par le temps (minutes).

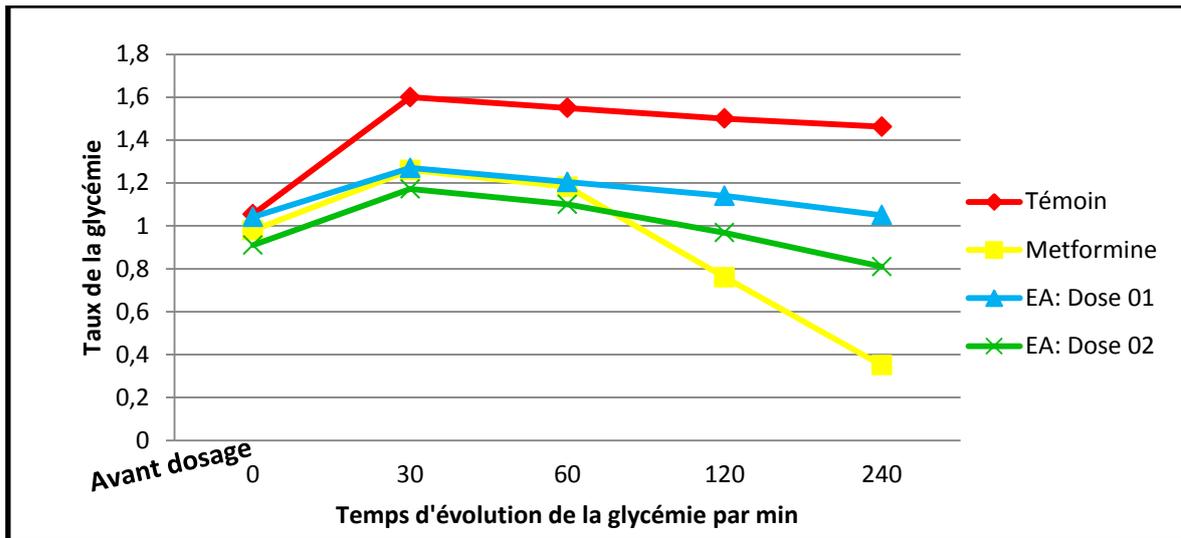


Figure 32 : Evolution de la glycémie moyenne enregistrée chez les souris.

A travers ces observations, nous avons constaté que l'administration de l'extrait aqueux de *Z. album* à des doses de 0,125 g/ml (lot 03) ; 0,25 g/ml (lot 04), et l'administration de la Metformine pour lot 02, induisent une chute du taux de glycémie moyenne des souris traité par rapport au témoin. Ainsi que les souris traité par le médicament de 0,25 g/ml et par l'extrait aqueux de dose 02 (0,25 g/ml) au cours des 60 min par rapport à ceux de glycémie des souris de dose 01 (0,125 g/ml) et les souris témoin non traites.

La diminution du taux de glycémie moyenne des souris de dose 0,25 g/ml est plus efficace par rapport à la dose 0,125 g/ml.

D'après les résultats obtenus, l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Zygodphyllum album*. a un effet hypoglycémiant mais à des dose respective.

Pour valoriser l'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux, on calcule le pourcentage de réduction de la glycémie moyenne des souris traité (**Tableau 2 (Annexe 3)**) par la formule ci-dessous :

% de réduction de la glycémie

$$= (\text{Glycémie de témoin} - \text{Glycémie d'essai}) / \text{Glycémie de témoin} \times 100$$

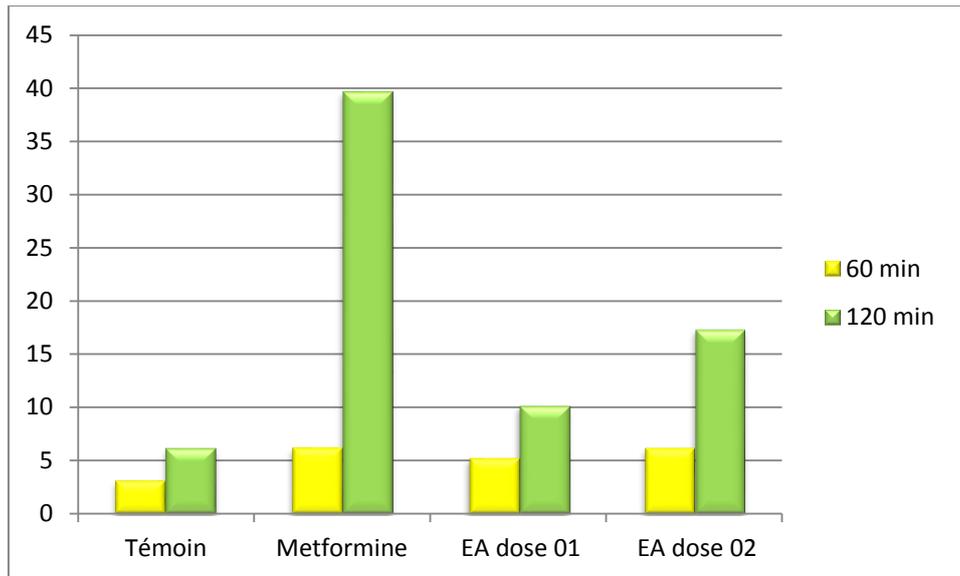


Figure 33 : Pourcentage de réduction du glycémie moyenne chez les souris.

Le **tableau 1 (Annexe3)** et le diagramme montrent que la glycémie des souris traitées par l'extrait aqueux de dose 01 et dose 02, est réduite par un pourcentage de 5,19 et 6,14% après 60 min de temps d'opération c'est à dire 30 min après l'administration des traitements.

Cependant chez les souris traitées par Metformine, la glycémie a été réduite par un pourcentage de 6,19 % après même temps.

Après 120 min du temps d'opération : Notre résultat montre que le témoin a un pourcentage de réduction 6,25%, les souris traitées par l'extrait aqueux de dose 01 et dose 02, sont réduits par un pourcentage de 10,24% et 17,4%, et chez les souris traitées par la Metformine, la glycémie diminué par 39,68%.

Ces résultats sont comparables à ceux **Jaouhari et al., (2000)** qui montrent que l'extrait aqueux des feuilles de *Zygodium gaetulum*. à une dose de 1 g/l a diminué le taux de glycémie des rats diabétiques par Alloxane.

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons dire que la partie aérienne de *Z. album* a une action sur la glycémie,

Ces résultats permettent de déduire que la consommation de tisane sous forme d'infusion de *Z. album* présente une activité anti hypoglycémiant. D'ailleurs les autochtones du Sahara consomment cette plante sous formes d'infusé ou des graines pour baisse la glycémie.

III.1.3.2. Activité anti- inflammatoire

➤ L'effet de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Zygodium album* L. sur la réduction de l'inflammation

L'induction de l'inflammation après 30 min de l'administration des suspensions (Diclofénac à 10% et l'extrait aqueux des doses 0.2, 0.4 et 0.8 mg/ml) par gavage suit à l'injection de 0,025 ml d'une solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de chaque souris, on a observé la formation des œdèmes et une augmentation des épaisseurs chez toutes les souris des 5 lots

Quatre heures après l'injection de la carragénine 1%, les pattes des souris ont été coupées et pesées. Nous avons calculé par rapport au poids de la patte saine selon la formule de **Levy (1969)**.

Les résultats des moyennes de poids (g) de la patte gauche et la patte droite des lots traités par différentes solutions (**tableau 3 (Annexe 3)**), et le pourcentage de réduction des œdèmes est indiquées dans le **tableau 3 (Annexe 3)** et la **figure n° 34** suivante :

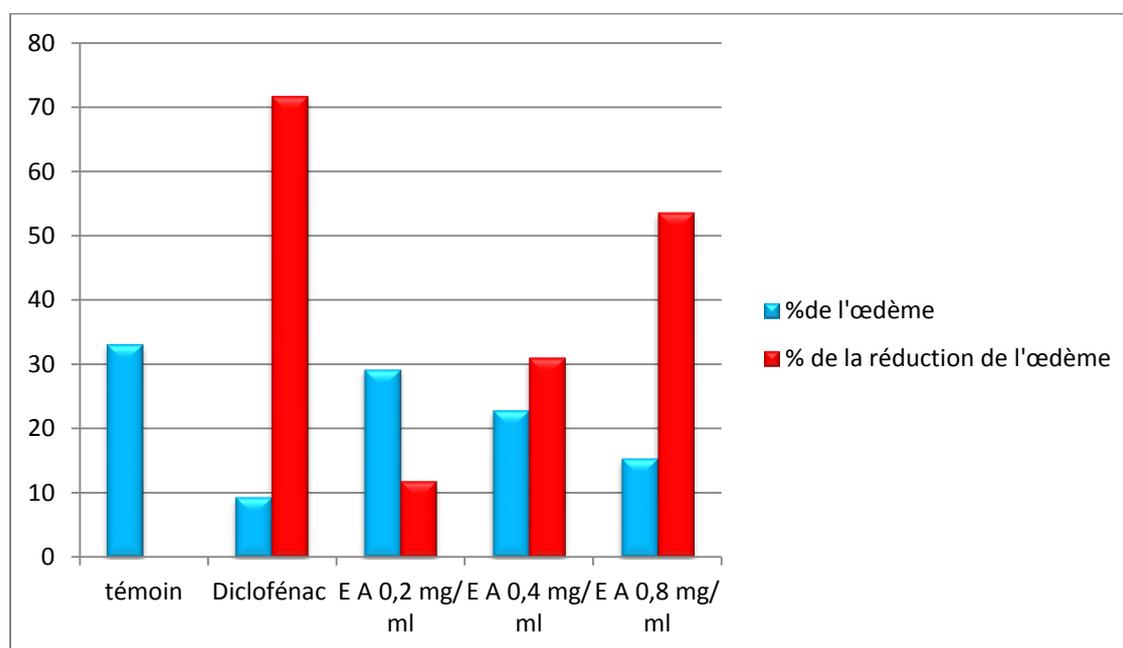


Figure 34 : Evolution de l'inflammation chez les souris pour chaque lot.

D'après le **tableau 10** et la **figure 34**, nous remarquons que le poids et le pourcentage de l'œdème induit par la carragénine (1%) augmentent avec le temps chez toutes les souris des 5 lots.

Après 30 minute de l'administration de carragénine, nous notons une légère baisse des œdèmes chez le lot témoin traité par l'eau physiologique, la réduction de ces œdèmes est très lente dans le temps car il n'atteint le point de stabilisation qu'après 210 min de l'injection.

Quatre heures après l'injection des souris par la carragénine (1%), la différence entre le poids moyen des pattes gauche et droite est de 0,043 g chez les souris du lot témoin. Le lot traite par un anti-inflammatoire (Diclofénac) est de 0,0131 g, et respectivement de 0,0384 g, 0,0279 g et 0,0202 g pour les doses de 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 0.8mg/ml de l'extrait aqueux.

Nous observons aussi que la réduction du poids de l'œdème augmente avec l'augmentation de la dose. Ces valeurs correspondent à des pourcentages d'augmentation qui sont 33,17% pour le lot témoin, 9,38% pour le lot anti-inflammatoire (Diclofénac) et 29,24% pour la dose 0.2 mg/ml, 22,88% pour la dose 0.4 mg/ml, et enfin 15,38% pour la dose 0.8 mg/ml comparativement au poids de la patte saine.

L'administration de la carragénine (1%) à 30 minutes après celle de l'extrait aqueux et de médicament réduit l'œdème.

Le pourcentage de la réduction du poids de l'œdème est plus important pour le lot traité par le médicament Diclofénac a une valeur de 71,72% et pour le lot des souris traité par l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Z. album* de la dose 0,8 mg/ml = 53,63% , aussi que le pourcentage de réduction est de 11,85% et 31,02% respectivement au doses de 0.2 mg/ml et 0.4 mg/ml.

Nous pouvons prétendre que notre extrait, à des doses efficace particulièrement à 0.8mg/ml, présente un effet anti-inflammatoire pouvant être comparable à ceux du médicament Diclofénac. Ce qui explique, en partie, l'utilisation massive de cette espèce, par les populations locales pour traiter les inflammations.

Quelques études ont confirmé l'effet anti-inflammatoire des extraits du genre *Zygophyllum*, et qui sont comparables avec nos résultats tels que celle de **Touari, 2013** et **Chouih, 2012** qui ont testés l'effet anti-inflammatoire sur des souris traités par l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante de *Zygophyllum album* en utilisant différentes doses, ainsi que les études de **ksouris 2013** qui a rapporté une activité anti-inflammatoire marquante des extraits méthamnoliques de *Z. album*. De même cette activité a été décelée dans les extraits aqueux de *Z. album* (**Mait El Kadi et al., 2011**)

D'après **Bahorun, (1997)** ; l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Zygophyllum album* peut être due à la présence des flavonoïdes qui sont principalement responsable de l'activité anti-inflammatoire.

Il est à souligné que la carragénine provoque un œdème de la patte qui est décrit comme événement diphasique. Une phase initiale est observée durant la première heure qui est attribuée à la libération de l'histamine et de la sérotonine, et une deuxième phase de gonflement qui est due à la libération de prostaglandine-like (**Crunkhorn et Macock, 1971**).

Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant aux effets de ses médiateurs chimiques.

L'activité anti-inflammatoire de la partie aérienne de *Z. album* est liée selon **Guinard (2000)**, **Middleton et al. (2000)** et **Bruneto (1993)** à sa richesse en composées phénoliques (polyphénols totaux).

III.2. Résultats et discussions des essais de culture *in vitro*

III.2.1. Essai d'obtention des vitroplants de *Zygophyllum album*.

Après la mise en germination des graines de *Z. album* dans différents milieux de culture l'un, un milieu MS avec source de carbone glucose et qui testé avec différentes condition hormonale ANA/BAP et 2.4D/BAP et l'autre, le milieu MS avec source de carbone saccharose, nous avons observé l'apparition des vitroplants à différente stade de développement. **La figure 35** résume le résultat global.

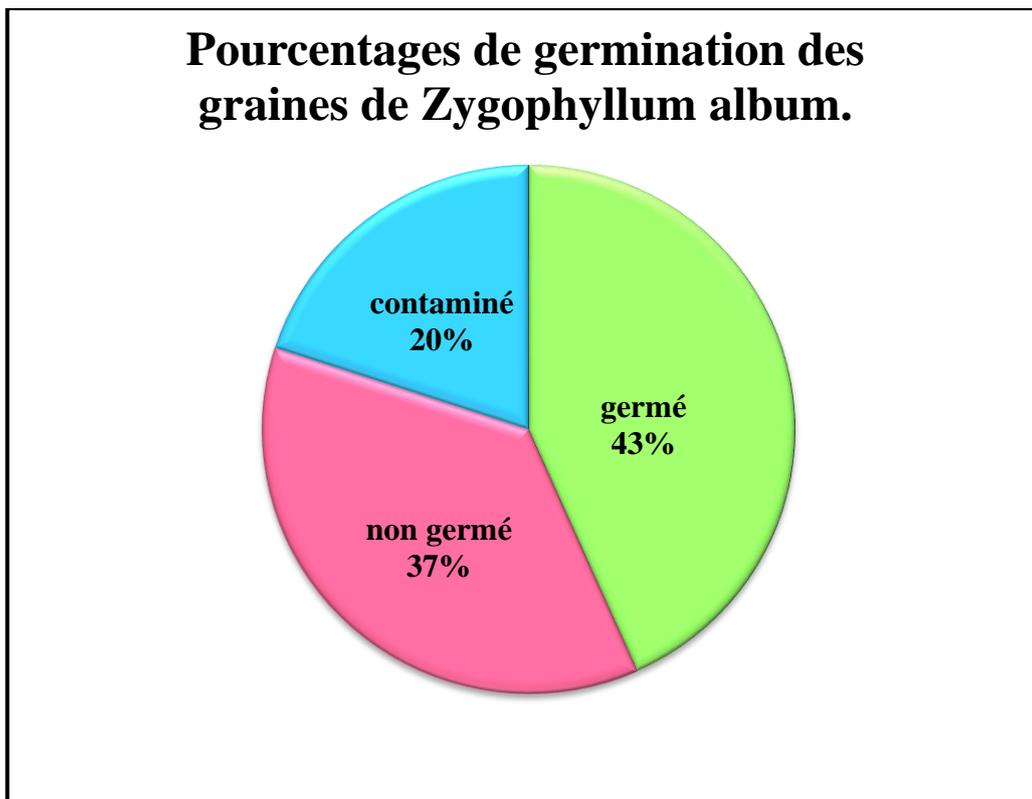


Figure 35 : Résultat global du germination des graines de *Zygophyllum album*.

Les résultats de germination des graines de *Zygophyllum album* cultivés dans un milieu de culture contenant un source de carbone « glucose » et qui sont testé avec différentes condition hormonale ANA/BAP (B. C. D. E), 2.4D/BAP (G. H. I. J), le A témoin (sans régulateur de croissance), et un autre milieu de culture contenant le saccharose et sans régulateur de croissance (tube As). Les observations sont notées par rapport le temps et les résultats obtenus sont résumé dans la **figure 36**.

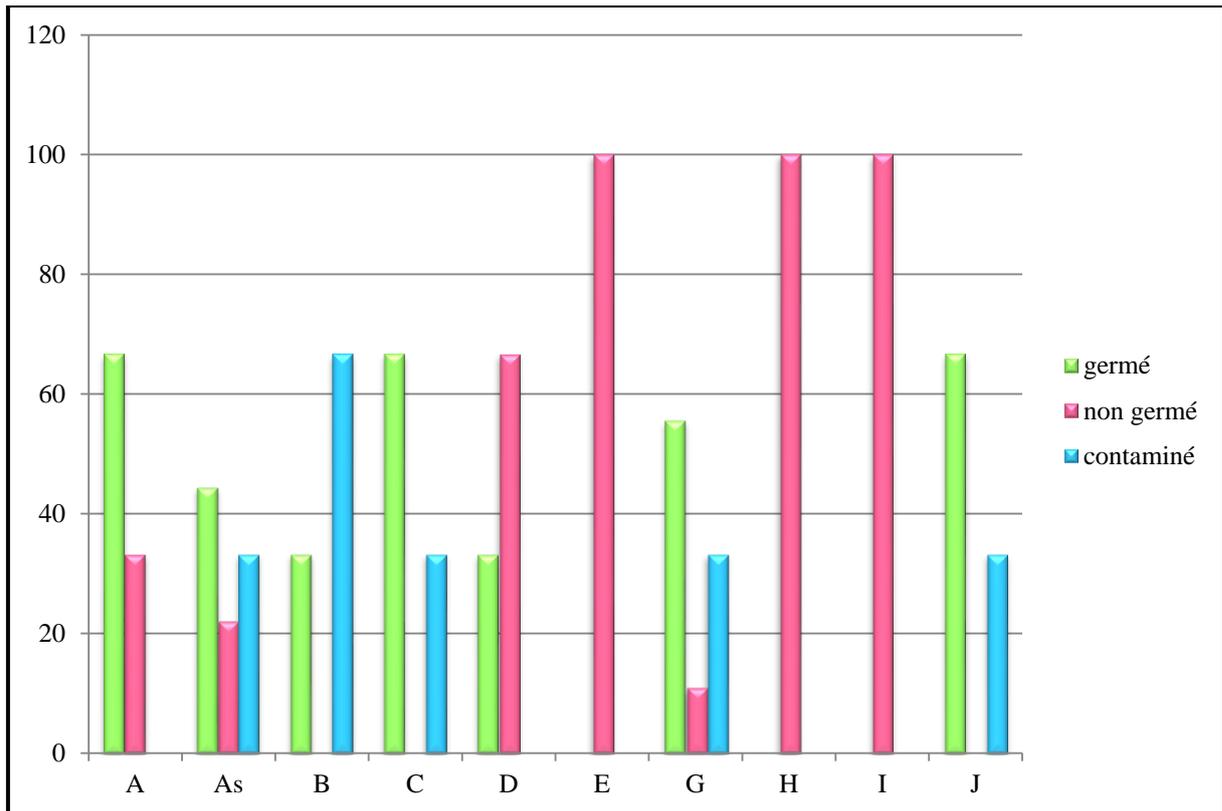


Figure 36 : résultats de germination des graines de *Zygothlyllum album*. Traités par différentes balances hormonales

D'après Le résultat global de la germination des graines de *Zygothlyllum album*. (**Figure 35**), nous avons constaté un pourcentage de germination à **43%** c'est-à-dire 13/30 de tubes testés, par contre le pourcentage des graines non germé est de **37%** signifier 11/30 de tubes testés, et nous avons noté aussi **20%** de contamination.

Le pourcentage de germination (43%) n'est pas vraiment positif par rapport le pourcentage des graines non germé (37%) et le pourcentage de contamination (20%). Ceci capable est dû aux conditions de culture, la maturité des graines et la qualité industrielle des produits utilisés.

Nous avons noté les résultats de germination des graines de *Zygothlyllum album*. Obtenus après traitement par différentes balances hormonales (**figure 35.**) par rapport le temps.

Après 4 jours de mise à germination, des graines des cultures témoin A (glucose) et témoin As (saccharose) ont germés.

Les plantules obtenues possèdent des organes bien distingués (feuille cotylédonaire, tige et racine). A 21 jours de culture, la majorité des graines ont germé.

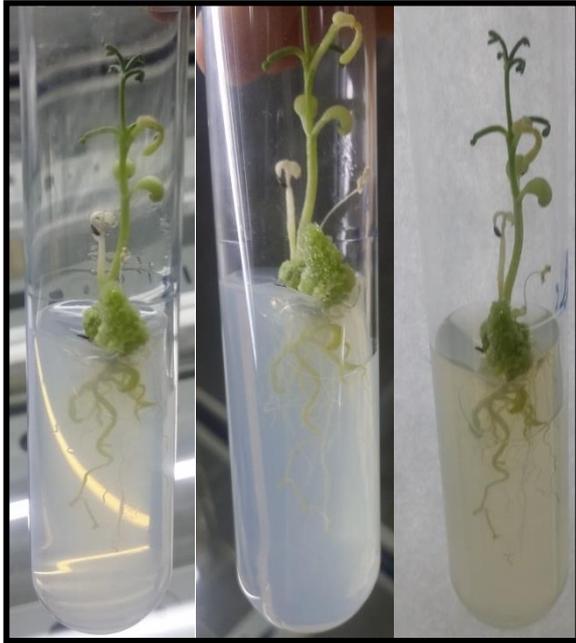


Figure 37 : Les plantules (condition As)
(saccharose) après 08 semaines



Figure 38: Les plantules (condition A)
(glucose) après 08 semaines

Nous avons remarqué que le système racinaire de la condition As est plus développé (ramifié) que la condition A (**figure 37 et 38**).

Nous pouvons dire que la présence du saccharose dans le milieu de culture MS, a un effet plus efficace par rapport au glucose, tout en sachant que le glucose est un sucre simple alors que le saccharose est un glucide composé d'une molécule de glucose associée à une molécule de fructose.

Après 8 jours, nous avons noté la germination des graines chez les tubes **G: 0,5/ 2 (mg/ml)** et **J: 0,2/0,3 (mg/ml)** traités par **2,4 D / BAP**. De même, on note aucune germination pour les conditions **B: 0,5/ 2 (mg/ml)** et **E : 0,2/0,3 (mg/ml)** traités par **ANA / BAP**.

20 jours plus tard, nous avons observé la germination des graines chez les tubes **B : 0,5/ 2 (mg/ml)**, **C : 0/ 2 (mg/ml)** et **D : 0,2/ 0,5 (mg/ml)** traités par **ANA/ BAP**. De même, les doses (**H : 0/ 2 mg/ ml** et **D : 0,2/ 0,5 mg/ ml** et **(I)** traités par **2,4 D / BAP**, n'induisent aucune germination au cours de 08 semaines.

Cette différence de temps de germination peut être expliquée par la variation du pouvoir germinatif d'une graine à une autre relative aux variations des conditions externes telles que la lumière, température... et de culture comme la source de carbone et les concentrations hormonales.

La balance hormonale qui contrôle l'organogenèse de l'explant est basé sur la concentration relative d'auxine et cytokinine, sachant que : lorsque la quantité de Cytokinines est plus supérieure (>>>>) que l'Auxine, nous avons obtenir une formation de bourgeonnement axillaire (caulogenèse). Si la quantité de cytokinine est faible (>) par rapport à l'auxine, nous obtenons une Callogénèse, et lorsque la quantité de cytokinines est inferieure par rapport à l'auxine, on obtient une Rhizogenèse.

D'après la **Figure 36 et tableau 4 (Annexe 3)**, nous constatons que les résultats obtenus sont comparables à ceux cités dans la littérature puisque, la dose **C : 0/2 (mg/ml)** traité par **ANA/BAP** a donné la formation de bourgeons (caulogénese) ce qui signifie que la [Cytokinine] >>>> [Auxine], (**figures 39**).

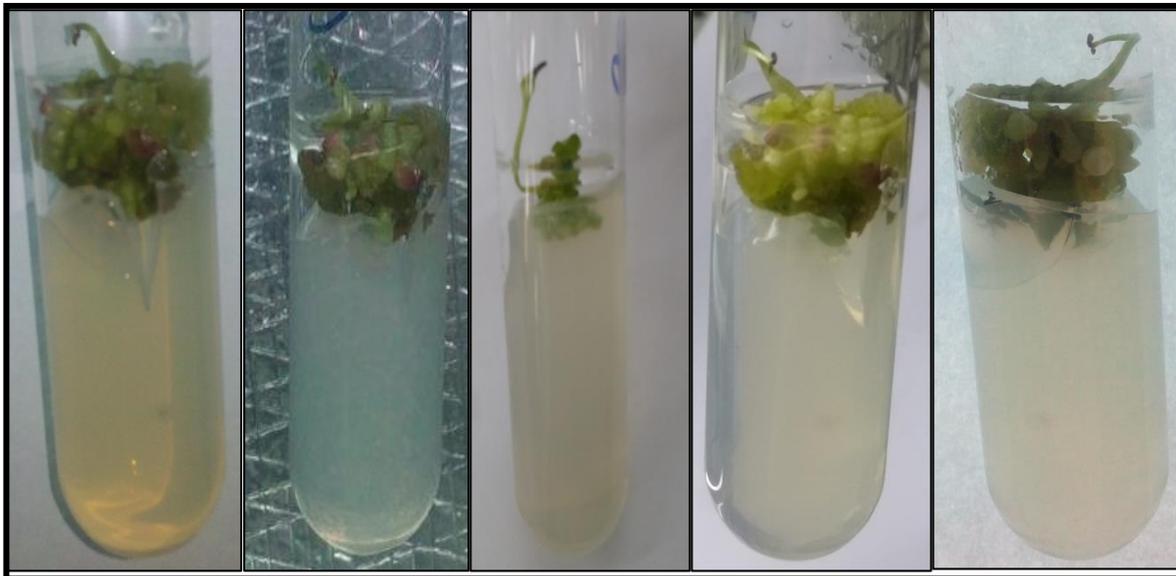


Figure 39: formation de bourgeons dans la condition C

Ainsi, les doses {**B: 0,5/2 (mg/ml)**, **D: 0,1/0,5 (mg/ml)** traités par **ANA/ BAP**} et {**G: 0,5/2 (mg/ml)**, **J : 0,2/ 0,3 (mg/ml)** traités par **2,4D/ BAP**} ont donné la formation de bourgeons (callogénese), signifiant toujours que [Cytokinine] > [Auxine]. Ces observations sont illustrées sur la **figure 40**.

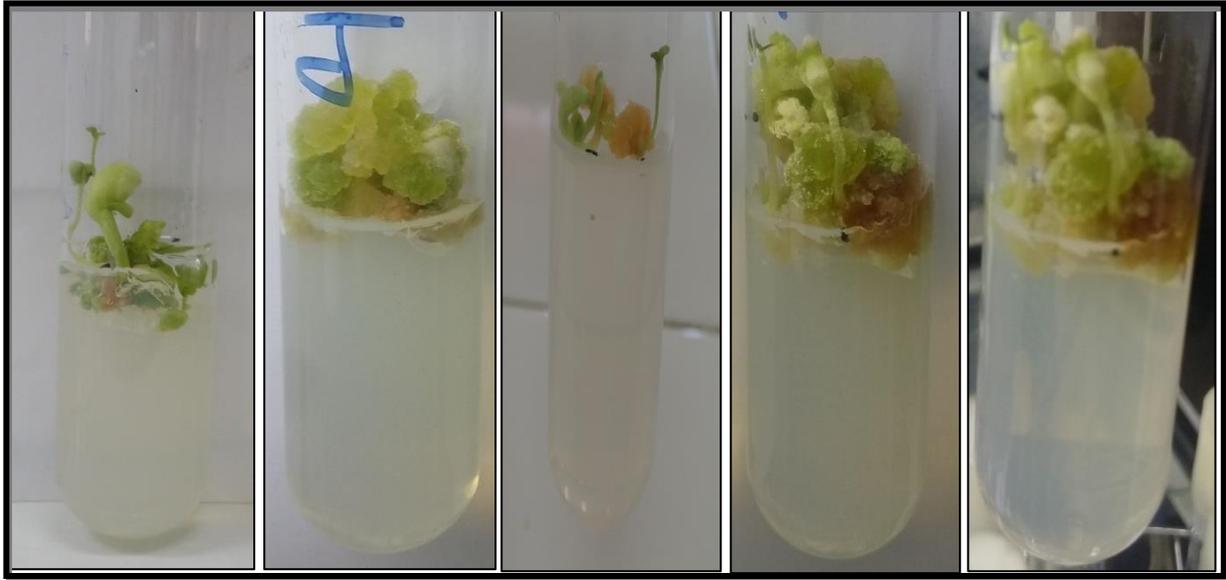


Figure 40: formations de Callogenèse des plantules de dose D et J

Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par **Touari (2013)** sur des vitroplants de *Zygophyllum album*. Traitée par différentes concentrations de régulateurs de croissance (AIB/ BAP). Elle a noté que l'apparition des cals est obtenue à la concentration de 0,1 AIB/ 0,5 BAP (mg/ ml)

De même, **Emane et Alam (2011)** ont montré que la production de cals de *Z. coccineum* L. est obtenue à partir des explants de tige, cultivée sur le milieu MS supplémenté de **2mg/ ml de 2,4 D**.

Cependant, la production des cals de *Z. xanithaxylan*. est obtenue par la mise en culture de leur graine sur milieu Ms incorporé de **4,4 µM BAP** et **2,7 µM ANA (Lundi et al ; 2008)**

III.2.2. Culture des chevelus racinaires de *Z. album* obtenus après transformation génétique dans le milieu liquide

Le même milieu de culture (MS) qu'était utilisé par **Sahli et Gadiri (2015)**. Et **Zaidi et Masmoudi (2016)**. Pour influencer l'induction de CRs chez *Z. album* L. infectée par la souche sauvage *A₄* d'*Agraobacterium rhizogenes*. Sont préparés afin d'obtenir la prolifération des CRs dans le milieu liquide.

Après 15 jours de mise en culture nous avons observé quelques ramifications au niveau des racines transformées des lignés **L 54** et **L 51**. Une croissance lente a été notée pour la ligné **L 33**. Les figures **41.42.43** et **44** illustrent ces différentes observations :

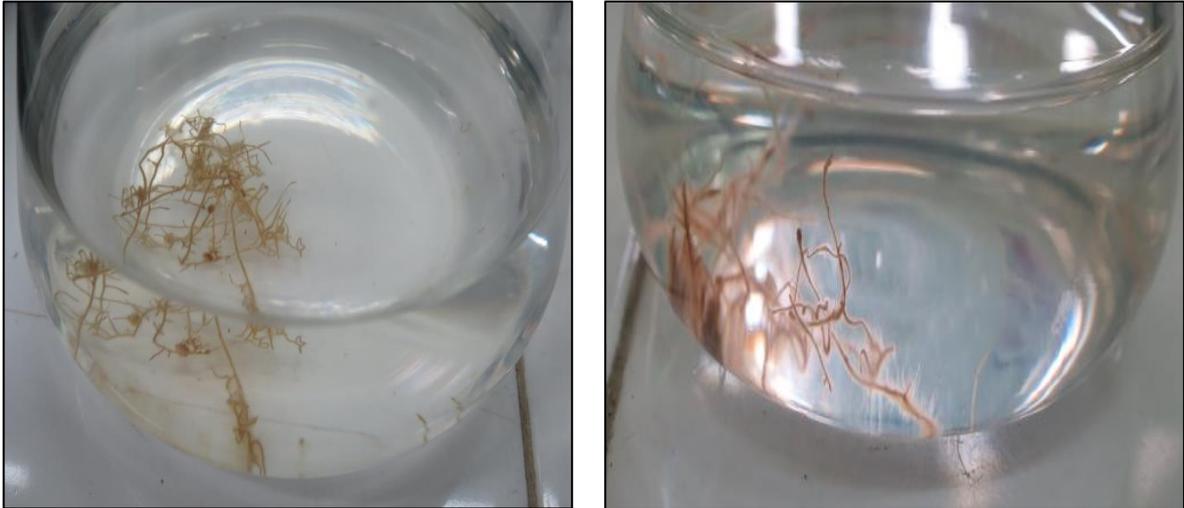


Figure 41: Chevelus racinaires de *Z. album* au T_0 de mise en culture

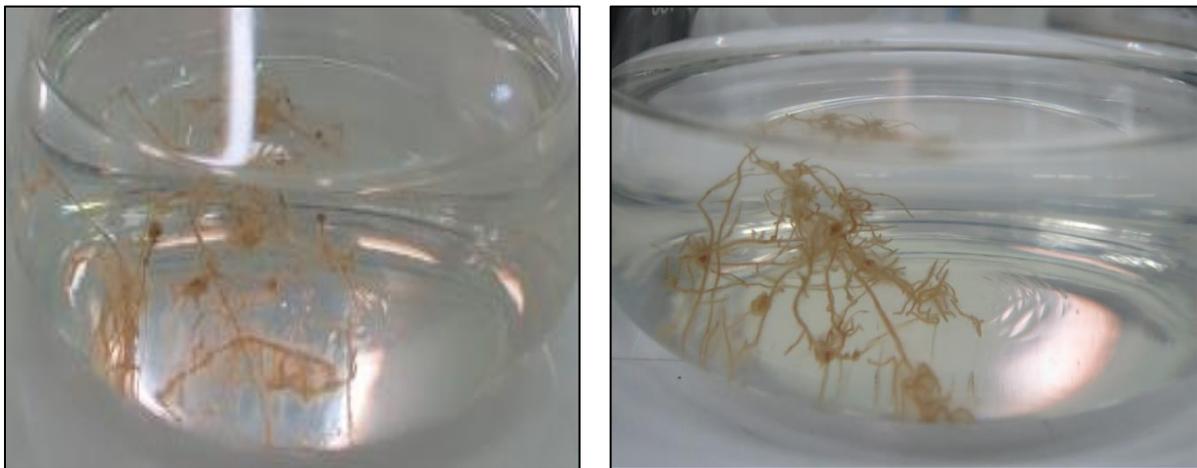


Figure 42: Chevelus racinaires de *Z. album* après 15 jours de mise en culture

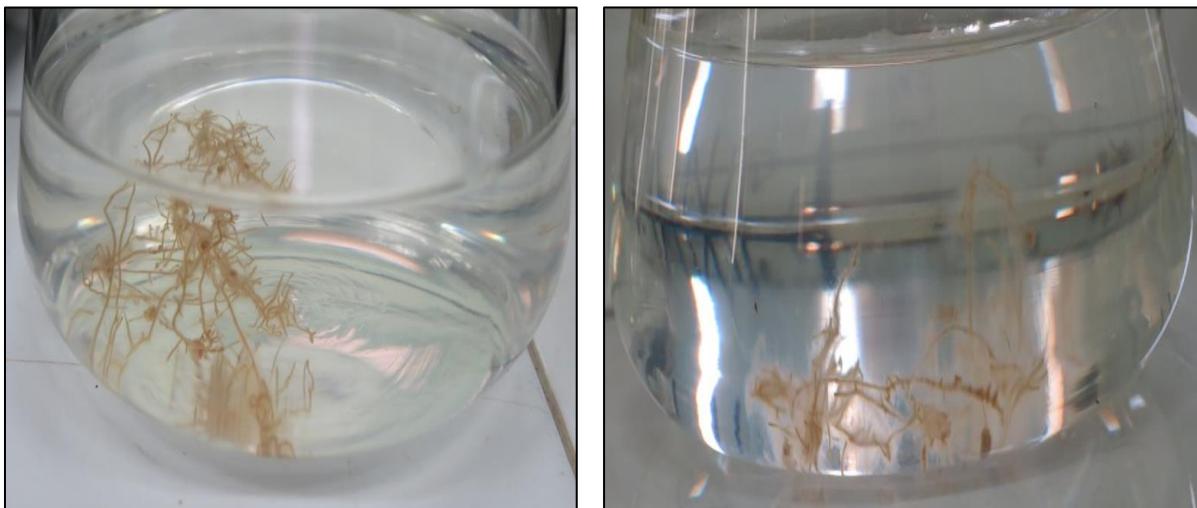


Figure 43: Chevelus racinaires de *Z. album* après 1 mois de mise en culture



Figure 44: Chevelus racinaires de *Z. album* après 2 mois de mise en culture

a. Effet du milieu liquide et les conditions de culture sur la croissance des chevelus racinaires

D'après les observations obtenues, nous avons constaté que les conditions de culture (l'obscurité, la température à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et le milieu Ms liquide) avec le système de rotation continu réglé à 110 rpm jouent un rôle positif sur la croissance des chevelus racinaire, car :

L'utilisation du milieu sous forme liquide et sous une agitation continu permet la mobilisation libre des CRs et la valorisation de l'oxygénation dans le milieu de culture.

Les chevelus racinaires présente un aspect typique pour les racines transformés via *Agrobacterium rhizogenes* par l'apparition de plagéotropie, Autotrophie au réulateurs de croissance et une croissance rapide.

Aucune différenciation cellulaire n'a été notée au niveau des CRs. Ceci est dû à l'effet de l'obscurité sur les chevelus racinaires.

Etant donné que *Z. album* est une plante saharienne et nécessite donc une température plus au moins élevée, nous avons opté pour une température de 26°C .

b. Effet de NaCl sur la culture des CRs

Les chevelus racinaires âgés de 21 jours ont été mis en contact avec cinq concentrations différentes de NaCl (1. 2. 3. 4 et 5 g/l). Un effet marquant des concentrations 4 et 5 g/l de NaCl a été enregistré sur la biomasse des chevelus racinaires par rapport à celui de concentrations 1 et 2 g/l où nous n'avons remarqué aucune amélioration des ramifications racinaires.

III. Résultats et discussions

La plante saharienne *Zygophyllum album*. est une plante aussi halophyte et selon nos résultats, on note que la salinité appliquée par NaCl entraîne une variation significative sur la production de biomasse des CRs alors, ce dernier est un facteur bénéfique pour la croissance et la prolifération des chevelus racinaires cultivés dans le milieu MS liquide.

A

Ahn K., Angulo A., Ghazal P., Peterson P.A., Yang Y et Fruh K., (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10990–10995.

Akroum S., (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en sciences, Université Mentouri de Constantine, Algérie. p 113.

Amal M.Y., Moustafa A., Khodair A.I., Hamouda F.M; Husseiry A., (2007).

Phytochemical and toxicological studies of *Zygophyllum album* L. Journal Pharmacol and Toxicologie. Faculty of Science, University Ismailia, Egypt. 2(3): 220-237.

Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.-H., Thi D.V., Assaf-Ducrocq C et E. Gontier., (2009). Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science*. 177: 81–87.

Anonyme. *Zygophyllum album* L. (Source [www.arkive.org /image](http://www.arkive.org/image)).

Anonyme. Feuilles de *Zygophyllum album* –Fleurs de *Zygophyllum album* (Source [www.arkive.org /image](http://www.arkive.org/image)).

Anonyme. Fruits de *Zygophyllum album* (Source [www.sahara-nature.com /album](http://www.sahara-nature.com/album))

Ayad R; (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Zygophyllum cornutum*. Mémoire de Magistère, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri, Constantine, Alger. Pp:124.

B

Badiaga M., (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nuclea Latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctora, Universit de bamako . p 137.

Bahorun T., (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Food and Agricultural Research, council Mauritis. p83-94.

Barboni T., (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat, Université de Corse. P 26.

Belbache H., (2003). Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf* . Thèse de magister en chimie organique. Université Mentouri Costantine, Algérie . Pp 16-20.

Belguidoum M., (2012) Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. Mémoire master Chimie. Université Ouargla .P :36-39.

Belmimoun A., (2016). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. Thèse Doctorat en sciences biologiques, Université Mustapha Stambouli, Mascara. Pp 164.

Benaissa O., (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique. Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine, Algérie. P : 63.

Benhammou N., (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en biologie, Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen, Algérie. p 113.

Boccon- Gibod J., (1984). La nouvelle botanique : la production du saint Paulia, Ed. science et vie .Paris. p56-63.

Boizot N., Charpentier J.P., (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. P: 79-82.

Bouakazi I., (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Thèse de magister, Université El Hadj Lakhdar, Batna. P 124.

Boukri N.E., (2014). Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout. Thèse de Master, Université KASDI MERBAH Ouargla, Alger. Pp 63.

Boulay J., (1993). La culture in vitro et ses applications à la culture des plantes carnivores . Labo de biologie des ligneux, université de Nancy. pp 62-70.

Brhhada N., Abousalim A., Dou EL Macane W.L., Ben Ali Doha., (2003). effets du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Oléa europea* L.) cv. Picholine marocaine .Bitetechnol.argon, Maroc. 7(3-4) :177-182.

Bruneton J., (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Technique et documentation Lavoisier, Paris. P 915.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales. Editions Tec & Doc Lavoisier. France. P: 1120.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition. Tec & Doc (Ed). Paris. P: 575.

C

Chaabi K. F., (2004). Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) Rutaceae. Thèse de doctorat, Université de Lausanne, Suisse. Pp 199.

Casse-Delbart F., (1990). Utilisation d'Agrobacterium pour l'obtention de plantes transgéniques. Cinquantenaire de la culture in vitro chez les végétaux Colloques de l'INRA n°51, Versailles. Ed clair doré, Paris. Pp : 219-230.

Chehma A., (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, Ed Dar El Houda, p. 140.

Choi Y.E., Kim Y.N., Yoon E.S., (1999). Height frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension culture in *Eleutherococcus Senticosus*. Rev. Annals of botany. pp 309-314.

Chouih K., (2012) contribution à l'étude phytochimique et biologique de *zygophyllum album* L. (Aggaya). Mémoire de master Biologie. Université Blida. P : 33.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., (2006). Plant Secondary Metabolites. Blackwell, Oxford. p 353.

Crunkhorn P., Macock S.C., (1971). Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. J Pharmacol. 42. Pp : 392-402

Cuendet M., (1999) : Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *fagraea blumel* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude: « *Bartsia alpina* », « *Loiseleuria procumbens* » et « *Campanul abarbata* ». Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université de Lausanne. p 24.

D

Dacosta E., (2003). les phyto-nutriments bioactifs. Yves Dacosta, Paris. p 317.

Di denedetto D., Breuil., (2007) Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, technique d'ingénieur. P: 1-20.

Donatien K., (2008). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes extraction, Identification d'«alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de Doctorat en chimie organiques, Université Paul Verlaine de METZ – UPV- M, France. pp 150.

E

Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefadi M., (2008). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chemistry. 110: 927-931.

El Ghou J., Ghanem-Boughanmi N., Ben Attia M., (2011). Biochemical study on the protective effect of ethanolic extract of *Zygophyllum album* on streptozotocin-induced oxidative stress and toxicity in mice and preventive Nutrition Vol. 1, Issue 2. 79-83.

F

Fahmy G.M., Ouf S.A., (1999). Significance of microclimate on phylloplane mycoflora of green and senescing leaves of *Zygophyllum album* L. *Journal of Arid Environments*, University of Cairo, Egypt. 41(3), 257-276.

Fiorucci S., (2008). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat, Nice. p 211.

G

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., (2001). Le préparateur en Pharmacie. 2ème ed.. Tec et Doc, Paris. France. p 275.

Giri A. M., Narasu L., (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. N°18. Pp : 1-22

Gonzalez A.G., Barrera J.B., Garcia T.Z., Rosas F.E., (1984). Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Phytochemistry*. Vol. 23(9): 2071–2072.

Gorham J., (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*. University of London. England . Vol. (16):249-253.

Graebe J.E., (1987). Gibberillin biosynthesis and control. *Annu. Ruv. Plant physiol*, Germany, Vol. (38): 419-465.

Gravot A., (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, Université de Rennes 1. P 15.

Guignard, J.L., (1998). Abrégé de botanique, Masson (Ed). Paris. p 212.

Guillaume Y., Guinchard C., (1996). Method to study the separation of eight phydroxybenzoic esters by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 727 : 93 – 99.

Guillaume D., (2008). Étude biomécanique de la distraction ostéogénique et de sa mise en œuvre en chirurgie maxillo-faciale. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz. P263

H

Hammiche V., Maiza K., (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol*, 105 : 358–367.

Harborne JB., (1973). *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, Ltd., London, pp. 49-188.

Harborne JB., (1980). In *Secondary plant products*. *Encyclopedia of plant physiology*. Bell EA, Charlwood BV, Eds.; Springer-Verlag: Berlin- Heidelberg, 8: 329-402.

Hartmann T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Institut fur Pharmazeutische Biologie der Technischen. Phytochemistry. Science direct. Germany. 68, 2831 - 2846.

Harrar A.E.N., (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. p 73.

Haslam E., (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat Prod.* Vol. (11): 41-66.

Heller W., Forkmann G., (1993). The flavonoids. Advances in research since 1986. In **Aref M et Heded M., (2015).** Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). Thèse de Master Académique, Université Echahid Hamma Lakhdar, EL-OUED. P 106.

Hernandez-ochoa L.R., (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat, Institut national plytechniques, Toulouse, France. Pp 255.

Hopkins W.G., (2003). Physiologie végétale. Boeck, Bruxelles. p 276-280.

Hostettmann K., (1992). Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Zyma SA, Nyon. Switzerland. p 25. In **Benayache F., (2005).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri- Constantine. Algérie. p 199.

Hoult J. R. S., Paya M., (1996). Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* Spain. Vol (27): 711-722.

J

Jaouhari J.T., Lazrek H.B., Jana M., (2000). The hypoglycaemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hypoglycaemic rats. *Journal of Ethanopharmacology.* P 69, 17-20.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J., (2002). Plant systematics : a phylogenetic, approche Sinauer, Sunferland, Massachusetts, USA. p 576

K

- Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., (2006).** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, India. Vol. (1293): 156–163.
- Khanbabaee K., Van Ree T., (2001).** Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18(6): 641-649.
- Kansole M., (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A). Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugb uaja VO.,(2004).** Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien.* 4 : P : 179 – 182.
- Klass C., Wagner G., Laufer S., Sosa S., Loggia R., Bomme U., Pahl H., Merfort I., (2002).** Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Med, Germany.* 68 :385-391.
- Kreif S., (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. P 349.
- Ksouri Megdiche W., Medine F., Mkedmini K., Legault J., Magné C., Abdelly C., Ksouri R., (2013).** LC-EST-TOF-MS identification of bioactive secondary involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf.

L

- Ladouari A., Harkouk Y., (2012).** Effet du décocté de *Zygophyllum album* Coss sur le diabète et le stress oxydant associé. Mémoire de biologie de l'université d'Alger.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., et Lee C.Y., (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry,* 51: 7292-7295.
- Lee K.W., Hur H.J., Lee C.Y., (2005).** Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemsty, Cornell University, Geneva, New York.* 53 (6), pp 1990–1995.
- Levy L.,(1969).** Carrageenan paws ordema in the mousse, *life science.*8. pp 601-606.
- Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L., (2003).** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientis. National Institute of Food-Hygiene and Nutrition, Budapest, Hungary.*47 (1-4): 119-125.

M

- Macheix J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2006).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, Lausanne . p 4-5.
- Medjdoub H., (2013).** Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. Thèse, Doc. Univ. Tlemcen. p 127.
- Malecky M., (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins. Thèse doctorat, l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Agro Paris Tech, Paris . P : 13.
- Marfak A.,(2003).** Radiolyse Gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, université de Limoges. P187.
- Margara J., (1989).** Bases de multiplication végétatives les méristèmes et l'organogénèse, Ed INRA. Paris. P 230.
- Masunda T.A., Mbala M.B., Kayembe S.J., Longoma B.F., Ngbolua K.N., Tshibangu D.S.T., Mpiana P.T., (2014).** Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild. (Arecaceae). Biol. Chem. Sci. Congo. 8(6): 2441-2451.
- Medic S. M., Jasprica I., Smolcic B. A., Mornar A., (2004).** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoides and phenolic acids, Croatica Chemica Acta, Croatia. 77 (1-2). p 361-366 .
- Mechernene B., (2014)** Évaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits de la racine de *Bryonia dioica*.Thèse de master Biologie. Université Tlemcen. P : 26.
- Middelton I,J., Kandaswami C., Theoharide,T,C., (2000).**The effects of plants flavonoids on mammalian cells:implication for inflammation,heart disease and cancer,Pharmacological reviews.52:673-751. **In Belmimoun A., (2016).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. Thèse Doctorat en sciences biologiques, Université Mustapha Stambouli, Mascara. Pp 164.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Beek T.A., (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85, 231-237.
- More D.,White J., (2005).** Encyclopedie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde Flammarion, pp. 18-797.
- Moret D.** culture *in vitro* évolution des techniques Boutures –Microbouture Minituberisation : La pomme de terre française. Pp 43-46.

Mohammedi Z., (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire magister, Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen. p 155.

Muanda F. S., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydant et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz. Pp 238.

Murashige M., Skoug., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

N

N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., Aké-Assi L., (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sci Nat.* 6 (1) : P : 1 – 15.

O

Ould el hadj M.D., Hadj-mahammed M., Zabeirou H., (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara Septentrional Est). *Courrier du Savoir*, Université de Ouargla, Algérie. N°03, P : 47-51.

Ozenda P ; (1977). Flore et végétation du Sahara, Deuxième Ed. CNRS. Paris, France. P:662.

P

Pandey K.B., RIZVI S.I., (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Landes. Vol. 2 (5) : 270 – 278.

Paris M., Moyse H., (1965). Matière médicinale, I, 2^e édition. Masson, Paris. Phenolic compounds of *pistacia lentiscus L.* and *Pistacia atlantica Desf.*, *advances in food sciences*, 29(3), 155-161.

Pawlowska A.M., De Leo M., Braca A., (2006). Phenolics of *Arbutus unedo L.* (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem. Italy*. Vol. 54 (26): 10234-10238.

Peters A., (1986). Quelques Aspects De La Morphogénèse Des Ignames Cultivées *in vitro*. Mémoire de fin d'études de l'ISTOM, INSTITUT SUPERIEUR DES TECHNIQUES D'OUTRE-MER, France. pp 61

Piatti M.F., (1988). Embryogénèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Paris VI. p 130.

Q

Quennoz M., (2001). La culture *in vitro* premiers pasEncyclopédie au cactus Francophone. pp51-54.

Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. Paris. P : 1170.

R

Raven P.H., Eichhom S., Bouharmont J., (2014). Biologie végétale, Boeck Supérieur. Bruxelles, Belgique. p778.

Rira M., (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister, Université Mentouri- Constantine, Algérie. p 95.

Rufini L., Sampaolo G., (1977). Plants Off. Aromi. Saponi, *Cosmétol. Aerosol.* Vol. (59):975.

S

Saad S.F., Saber A.H., Scott P.M., (1967). Pharmacological studies on zygophyllin and quinovic acid. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 6: 253–263.

Sahki A., Sahki R., (2004). Le Hoggar, promenade Botanique, Ed Esope .Chamonix, France. P: 311.

Sahli F., Gadiri M. N., (2015). Etude de la sensibilité de *Zygophyllum album* L. aux souches de *Agrobacterium rhizogenes* en vue d'induire, par Co-culture, le chevelu racinaire (hairy root). Thèse de Master II en Biologie, Université Blida 1. Pp 54.

Skima F., Kaayaa A., Jouharib J. T., Lazrekb U H.B., El Amrie H., (1999). Hypoglycaemic activity of globulariaalyum leaves in rats *Fitoterapia* 70. 382-389.

Smati D., Longeon A., Guyot M., (2004). 3 β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. *Journal of Ethnopharmacology.* 95(2-3): 405–407.

Smati D., (2009). Contribution to the study of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian sahara, journal of Ethnopharmacology. Vol. 95. N° 2-3. 405-407.

Shehab N.G., Gharbieh E., Bayoumi F., (2015). Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants, *BMC Complementary and Alternative Medicine* ,15:401

Sheahan M. C., Chase M. W., (1996). A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae based on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data. *Botanical Journal. Linn. Soc.* 122: 279–300.

Sheahan M. C., Chase M. W., (2000). Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae. *Systematic Botan.* 25(2): pp. 371-384.

Smati D., Longeon A., Guyot M., (2004). 3 β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*. 95(2-3): 405–407.

Singh N., Luthra R., Sangwan R.S., Thakur R.S., (1989). Metabolism of monoterpenoids in aromatics plants. *Curr. res. Med. Arom. Plants*. Vol. (11): 174-197.

T

Téoule E., (1993). Biotechnologie et amélioration des plantes ,4ème édition, technique et documentation, Paris, pp565-588.

Tepfter D., (1982). La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. Deuxième colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux, Ed. CTIFL : 46-53.

Thikhomiroff C., (2002). Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *Agrobacterium tumefaciens*. www. Tikho. com.

Touari K., (2012). Screening phytochimique et essai de culture *in vitro* de zygophylle "*Zygophyllum album*" en vue d'une optimiation de la reproduction de métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique. Thèse de Master II, Université Blida 1. Pp 64.

V

Vermerris W., Nicholson R., (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht. p 276.

W

Wichtl M., Anton R., (2003). Plantes thérapeutiques. Tech & Doc, paris.p 692.

Wink M., (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, Germany. (64): p 17

Z

Zarouri B., (2012). induction des chevelus racinaires chez trois especes de *Datura*, Selection des lignées performantes pour la production d'alcaloïde. Thèse de Magister, école nationale agronomique El-harrach. P 25.

Zaidi H., Masmoudi Z., (2016). Induction et caractérisation biochimique de chevelu racinaire de *Zygophyllum album* par co-culture via *Agrabacterium rhizogenes*. Thèse de Master II, Université Blida 1. Pp54.

Zhi-Bi H., Min D., (2006). hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology*. 48(2). pp 121-127.

Zryd J.P., Bretelle R., Derreudre J., Duhoux E., Gaspar T., (1988). Culture des cellules, tissus et organes végétaux : Fondement technique et utilisation pratique. Presses polytechniques romandes. Paris, Lavoisier. p 308.

HASSAN ALBARRE H. B. A. A., (2003). المكونات الكيميائية في نباتات جنسي البيجانم و النتراريا من العائلة القدسية الزيجوفليسية التي تنمو في المملكة العربية السعودية. الجزء الثاني, جامعة الملك عبد العزيز (المملكة السعودية), 59: 1- 22

Annexe 1

Matériel non biologique

1- Appareillage :	2- Verreries et accessoires	3- Produits chimiques et réactifs :	4- Autres matériels :
<ul style="list-style-type: none"> • Agitateur • Bec benzène • Balance analytique • Etuve • Hotte • Plaque chauffante • Spectrophotomètre de masse UV-VIS • PH mètre • Autoclave • Vortex 	<ul style="list-style-type: none"> • Tube à essai • Boîtes de pétrie • Bistouris • Fiole jaugé • Flacon ambré • Erlenmeyer • Eprouvette • Seringues de 2.5 ml • Papier wattman • Micropipette, pipette pasteur • papier Wattman 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillé • Eau physiologique • Macro-éléments • Micro-élément • FeNaEDTA • Vitamines • Agar-Agar • Sucre • NaOH 1N • HCl 1N • Acide chlorohydrique • Ethanol • Hydroxyle d'ammoniac • Chlorure ferrique • Hydroxyde de potassium • Chloroforme • Ninhydrine • Sulfate ferrique • Acétate de plomb • Acide phosphomolybdique • Acide sulfurique • Alcool absolue • Acide gallique • Acétate de sodium • Acide ascorbique • Réactif de dragen droff • Réactif de stiany • Réactif de folin ciocalteu • Carragénine 1% • Acide acétique 1% • Les hormones 	<ul style="list-style-type: none"> • Papier aluminium • Portoir pour les tubes • Sondes de gavage • Spatule • Baro • Cotton • Etiquette • Papier filtre • compresse • Gants

Annexe2 :

Appariage :



Photo 1 : pH mètre



photo 2 : Agitateur/ Plaque chauffante



Photo 3 : Balance



Photo 4 : Balance analytique



Photo 5 : Autoclave



Photo 6 : Etuve



Photo 7: Plaque d'agitation « innova 2300 »



photo 8: spectrophotomètre



Photo 9 : glucomètre « one touch »

Annexe 3

Tableau 1 : L'effet de l'extrait aqueux de *Zygophyllum album.*, et de Metformine sur la glycémie de base.

Taux de Glycémie(g/L)				
Temps (min)	Témoin	Metformine	EA: Dose 01(0,5g/kg)	EA: Dose 02 (1 g/kg)
0 min = Glycémie à jeun	1,054	0,98	1,042	0,91
30 min après l'administration du glucose	1,6	1,26	1,27	1,172
60 min = 30 min après les traitements	1,55	1,182	1,204	1,1
120 min = après 90 min	1,5	0,76	1,14	0,968
240 min = après 210 min	1,462	0,35	1,05	0,81

Tableau 2: pourcentage de réduction de la glycémie moyenne chez les souris.

	Témoin	Metformine	EA dose 01	EA dose 02
60 min	3,125	6,19	5,19	6,14
120 min	6,25	39,68	10,24	17,4

Tableau 3 : Variation de poids (g) de la patte gauche et la patte droite des lots traités par différentes solutions et le pourcentage de réduction de l'œdème des pattes postérieures gauches des souris.

	Moyenne de poids des pattes gauches	Moyenne de poids des pattes droites	%de l'augmentation de l'œdème des pattes gauches	%de la réduction de l'œdème chez les souris par rapport le témoin
Témoin	0,1726	0,1296	33,17	
Diclofénac 10%	0,1527	0,1396	9,38	71,72
E A 0,2 mg/ ml	0,1697	0,1313	29,24	11,85
E A 0,4 mg/ ml	0,1498	0,1219	22,88	31,022
EA 0,8 mg/ ml	0,1527	0,1396	15,38	53,63

Tableau 4: Résultats de germination des graines de *Zygophyllum album*. Traités par des conditions hormonales.

	Condition hormonales ANA / BAP (mg / mL)						Condition hormonales 2,4 D / BAP (mg / mL)			
	Témoin :A (glucose) 0 / 0	Témoin : As (saccharose) 0 / 0	B 0,5/2	C 0/2	D 0,1/0,5	E 0,2 /0,3	G 0,5/2	H 0/2	I 0,1/0,5	J 0,2/0,3
Graines germé	66,67%	44,44%	33,33%	66,67%	33,33%	0%	55,56%	0%	0%	66,67%
Graines non germé	33,33%	22,22%	0%	0%	66,67%	100%	11,11%	100%	100%	0%
Contamination	0%	33,33%	66,67%	33,33%	0%	0%	33,33%	0%	0%	33,33%