

**UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques**  
Département de Biologie

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Biotechnologies Végétales

**EXTRACTION ET CARACTERISATION DE CERTAINS  
PRINCIPES ACTIFS DE DEUX PLANTES  
A CARACTERE THERAPEUTIQUE *Cassia acutifolia* ET *Cassia  
obovata* DES REGIONS ARIDES DE LA ZONE DE  
TAMANRASSET**

Par

**BENFARES Redhouane**

Devant le jury composé de

|               |                                   |                |
|---------------|-----------------------------------|----------------|
| S. A. SNOUSSI | Professeur, U. de Blida           | Président      |
| N. BOUCHENAFI | Maître de conférence, U. de Blida | Examinatrice   |
| A. BERBER     | Maître de conférence, U. de Blida | Examineur      |
| F. SAIDI      | Maître de conférence, U. de Blida | Promotrice     |
| A. ROUIBI     | Chargé de Cours, U. de Blida      | Co - promoteur |

Blida, 2009

## RESUME

Notre travail repose sur l'étude des principes actifs et des huiles essentielles de deux espèces du séné algérien, *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*.

Les méthodes et les techniques développées au cours de ce travail ont permis d'identifier, de séparer et de quantifier les différentes molécules actives des deux espèces.

Pour les principes actifs des deux espèces, nous pouvons dire que les sennosides trouvés sont analogues qualitativement aux sennosides qui existent dans la majorité des espèces du genre *Cassia*. Les sennosides B existent en proportion importante 74.04 % pour *Cassia acutifolia* et 74.4% pour *Cassia obovata*. Ces derniers ont été séparés par chromatographie sur colonne et analysés par HPLC.

L'analyse des flavonoïdes, des glucides et des minéraux a donné un rendement respectivement de 4.45%, 62% et 11.85% pour *Cassia acutifolia* et de 7.33%, 56% et 12.72% pour *Cassia obovata*.

L'extraction par entraînement à la vapeur a donné un rendement faible en huile essentielle, 0.36% pour *Cassia acutifolia* et 0.26% pour *Cassia obovata*. L'analyse chimique de ces huiles par CG/MS nous a permis d'identifier les principaux constituants des deux huiles essentielles ainsi que leurs structures chimiques. Le Carvacrol 58.02 %, le thymol 6.4 %, le Diisooctyl phthalate 20.98 % et le p-Cresol, 2,2'-methylenebis [6-tert-butyl 6.7 % pour *Cassia obovata*. Le Carvacrol 43.08 %, le thymol 4.53%, le Diisooctyl phthalate 13.60 %, le p-Vinylguaïacol 18.14 %, le Dihydroactinidiolide 7.25 % et le Dihydrocoumarin, 5, 7,8-triméthyl 4.98 % pour *Cassia acutifolia*.

L'étude de l'activité antimicrobienne a montré que les souches, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, présentent des zones d'inhibition de 15 à 20 mm. Elles sont donc considérées comme des souches sensibles à l'huile essentielle et à l'extrait éthanolique à 2g / 20ml pour les deux espèces de séné.

Mots clefs : *Cassia acutifolia*, *Cassia obovata*, principe actif, huile essentielle, extraction, identification.

## ABSTRACT

Our work is based on the study of active principle and essential oils of two species of Algerian senna, *Cassia acutifolia* and *Cassia obovata*.

The methods and techniques developed during this work made it possible to identify, separate and quantify the various active molecules of the two species.

For the active principles of both species, we can say that sennosides found are qualitatively similar to sennosides that exist in most species of the genus *Cassia*. The sennosides B exist in significant proportion 74.04 % for *Cassia acutifolia* and 74.4% for *Cassia obovata*, they were separated by column chromatography and analyzed by HPLC.

Analysis of flavonoids, glucids and minerals gave a respectively yield of 4.45%, 62% and 11.85% for *Cassia acutifolia* and of 7.33%, 56% and 12.72% for *Cassia obovata*.

The extraction Steam distillation gave a low yield essential oil, 0.36% for *Cassia acutifolia* and 0.26% for *Cassia obovata*. The chemical analysis of these oils by GC / MS allowed us to identify the main constituents of the two essential oils and their chemical structures. The Carvacrol 58.02%, the thymol 6.4 %, the Diisooctyl phthalate 20.98 % and the p-Cresol, 2,2'-methylenebis [6-tert-butyl 6.7 % for *Cassia obovata*. the Carvacrol 43.08 %, the thymol 4.53%, the Diisooctyl phthalate 13.60 %, the p-Vinylguaiacol 18.14 %, the Dihydroactinidiolide 7.25 % and the Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl 4.98 % for *Cassia acutifolia*.

Finally the study of antimicrobial activity showed that strains, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, have zones of inhibition of 15 to 20 mm. They are therefore considered as susceptible strains to the essential oil and extract ethanol to 2g / 20ml for two species of senna.

Keywords: *Cassia acutifolia*, *Cassia obovata*, active principle, essential oil, extraction, identification

## ملخص

عملنا يركز حول دراسة المواد الفعالة و الزيوت الأساسية لصنفين من نبات السنّا المكّي الجزائري، *Cassia acutifolia* و *Cassia obovata*. التقنيات المستعملة في هذا العمل سمحت لنا بتشخيص، فصل و التقدير الكمي لمختلف الجزئيات الفعالة للصنفين المدروسين. فيما يخص المواد الفعالة يمكن اعتبارها متشابهة نوعيا مع تلك الموجودة في أغلب أصناف النوع *Cassia*. أغلب السينوزيدات توجد على شكل سينوزيد B حيث بلغت نسبته 74.04% في *Cassia acutifolia* و 74.4% في *Cassia obovata*. لقد تم فصل السينوزيد B باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا العمودية و تشخيصها بالكروماتوغرافيا السائلة ذات الجودة العالية. إن معايرة الفلافينات، السكريات و المعادن بينت أن نسب هذه المواد على التوالي 4.45% ، 62% و 11.85% و ذلك بالنسبة للصنف *Cassia acutifolia* ، و 7.33% ، 56.00% و 12.72% فيما يخص *Cassia obovata*. استخلاص الزيوت الأساسية بتقنية التقطير البخاري أعطى مردودا منخفضا من الزيوت تتراوح بين 0.36% في *Cassia acutifolia* و 0.26% في *Cassia obovata*. التحليل الكيميائي بالطور الغازي المرفق بالتحليل الطيفي أمكننا من تشخيص مكوناتها الرئيسية مع صيغتها الكيميائية. دراسة الفعالية ضد المكروبات بينت أن السلالات التالية *S.aureus* ، *S.epiderridis* ، *B. subtilis* ، و *P. aeruginosa* أظهرت مسافات تثبيط تتراوح بين 15 و 20 مم ، مما يثبت أنها سلالات حساسة للزيوت الأساسية و المستخلص الكحولي بتركيز 2غ/20مل و ذلك بالنسبة للصنفين المدروسين.

- المفاتيح: *Cassia acutifolia* ، *Cassia obovata* ، المادة الفعالة، الزيوت الأساسية، الاستخلاص، التشخيص.

## DEDICACES

*Aux lumières qui ont toujours éclairé mon chemin*

*Aux sources de mon énergie*

*A ce que j'ai le plus chers au monde :*

*Mes chers parents.*

*A la mémoire de ma mère que DIEU l'accueille dans Son vaste  
paradis*

*A mes chers frères Djilali, Mohamed, Fateh et Hamza et sœurs  
Fatimazahra, Razika, Khadija et Kheira. A ma belle mère et à toute  
ma famille.*

*A toutes mes collègues Selma, Latifa, Hafidha et Sabrina, je leur dédie  
ce modeste travail en signe de ma profonde tendresse et ma sincère  
amitié.*

*A mon cher ami Nadjib*

*A toute l'équipe des enseignantes de biologie végétale  
A ceux qui ont fait preuve d'une amitié sincère : sofiane, Mohamed,  
Zakaria, Djahid, Bilel, Rachid, Omar et Tayeb  
A tous mes collègues de travail : Moussa, Hamza, Razika et Ouahiba.  
A tous mes amis et collègues.*

*Redhouane*

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord nous remercions DIEU le Tout Puissant de nous avoir montré la voie,  
guidé et donné le courage à surmonter tous les problèmes.

Je tiens à remercier ma promotrice Madame SAIDI, qui m'a dirigé tout au long de ce travail, pour ses conseils, sa confiance et pour ses directives les plus précieuses.

Mon co-promoteur M<sup>r</sup> ROUBI pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils.

J'exprime mes sincères remerciements à M<sup>r</sup> SNOUSSI. S. A, qui nous a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

A M<sup>r</sup> BERBER. A et Mme BOUCHENAF. N, d'avoir accepté d'examiner ce travail

Mes plus vifs remerciements vont aussi à M<sup>r</sup> BOUTOUMI.H et M<sup>r</sup> BELKACEM pour leur soutien, leur aide et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier :

Le personnel technique de l'unité ANTIBIOTICAL MEDEA pour leur collaboration et conseils.

Les chercheurs de L'INRF Alger et Tamanrasset, tout particulièrement : M<sup>r</sup> Abd Elhamid, M<sup>r</sup> Abdelaoui et Mme Sahki.

Je porte envers l'ensemble des enseignants du département de biologie qui ont contribué à notre formation, une immense gratitude.

Pour tous les ingénieurs des laboratoires de recherche de biologie végétale et pédagogique du département de biologie.

Mes remerciements s'adresse également aux personnels du laboratoire de géochimie du CRD Boumèdes.

## **TABLE DES MATIERES**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| RESUME.....              | ..... |
| REMERCIEMENTS.....       | ..... |
| TABLE DES MATIERES ..... | ..... |

|  |    |
|--|----|
| LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX .....  |    |
| INTRODUCTION.....  | 12 |
| <br>   |    |
| 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....  |    |
| 1.1. Généralités sur les plantes médicinales .....   | 14 |
| 1.1.1. Généralités .....   | 14 |
| 1.1.2. Définition .....  | 14 |
| 1.1.3. Phytothérapie .....   | 15 |
| 1.1.4. Place de la médecine traditionnelle dans le monde.....  | 16 |
| 1.1.5. Place des remèdes traditionnels dans la politique<br>pharmaceutique Algérienne .....                                  | 16 |
| 1.1.6. Récolte des plantes médicinales.....  | 17 |
| 1.1.7. Séchage et conservation des plantes médicinales.....  | 18 |
| 1.1.8. Préparation et modes d'utilisation.....   | 18 |
| 1.1.9. Les principes actifs des plantes médicinales.....   | 20 |
| 1.2. Etude botanique du séné .....   | 24 |
| 1.2.1. Généralités .....   | 24 |
| 1.2.2. Description botanique du séné .....   | 24 |
| 1.2.3. Description botanique des deux espèces étudiées.....  | 26 |
| 1.2.4. Répartition géographique du séné .....  | 30 |
| 1.2.5. Récolte et conservation du séné .....   | 31 |
| 1.3. Composition chimique du séné.....   | 32 |
| 1.3.1. Structure chimique des dérivés anthracéniques libres .....  | 32 |
| 1.3.2. Structure chimique des dérivés anthracéniques combinés en<br>hétérosides ou sennosides .....                          | 33 |
| 1.3.3. Propriétés chimiques des sennosides .....   | 36 |
| 1.3.4. Propriétés physiques des sennosides.....  | 36 |
| 1.3.5. Biosynthèse des sennosides .....  | 36 |
| 1.3.6. Localisation des sennosides dans la plante .....  | 37 |
| 1.4. Propriétés organoleptiques du séné .....  | 37 |
| 1.5. Propriétés pharmacologiques du séné .....   | 37 |
| 1.6. Effets indésirables et contre-indications du séné. . . . .  | 38 |
| <br>   |    |
| 2. MATERIEL ET METHODES.....   |    |
| 2.1. Matériel.....   | 39 |
| 2.2. Méthodes.....   | 39 |
| 2.2.1. Identification et séparation des sennosides des deux espèces.....   | 39 |
| 2.2.2. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-vis .....   | 44 |
| 2.2.3. Extraction des flavonoïdes .....  | 45 |
| 2.2.4. Détermination du pourcentage des minéraux .....   | 49 |
| 2.2.5. Extraction et dosage des glucides .....   | 49 |
| 2.2.6. Extraction des huiles essentielles du séné par entraînement<br>à la vapeur d'eau .....                                | 51 |
| 2.2.7. Evaluation de l'activité antibactérienne des l'huiles<br>essentiels et de l'extrait alcoolique des deux espèces ..... | 55 |
| <br>   |    |
| 3. RESULTATS ET DISCUSSION.....  |    |
| 3.1. Identification et de séparation des sennosides .....  | 60 |
| 3.2. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-visible .....   | 72 |

|  |    |
|--|----|
|  | 7  |
| 3.3. Résultat de l'analyse des flavonoïdes.....          | 74 |
| 3.4. Pourcentage des minéraux .....                      | 76 |
| 3.5. Teneurs en glucides solubles .....                  | 77 |
| 3.6. Résultats de l'analyse des huiles essentielles..... | 78 |
| 3.7. Activité antimicrobienne .....                      | 91 |
| CONCLUSION .....   | 97 |
| REFERENCES.....  |    |

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX**

|            |                                    |    |
|------------|------------------------------------|----|
| Figure 1.1 | Plante de <i>Cassia acutifolia</i> | 26 |
| Figure 1.2 | Fleurs de <i>Cassia acutifolia</i> | 27 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 1.3  | Gousses de <i>Cassia acutifolia</i>                              | 27 |
| Figure 1.4  | Plante de <i>Cassia obovata</i>                                  | 28 |
| Figure 1.5  | Feuilles de <i>Cassia obovata</i>                                | 29 |
| Figure 1.6  | Fleurs de <i>Cassia obovata</i>                                  | 29 |
| Figure 1.7  | Gousses de <i>Cassia obovata</i>                                 | 30 |
| Figure 1.8  | Structure chimique de l'antracène                                | 32 |
| Figure 1.9  | Structure chimique des dérivés anthracéniques                    | 32 |
| Figure 1.10 | Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques             | 33 |
| Figure 1.11 | Structure chimique des sennosides A et B                         | 34 |
| Figure 1.12 | Structure chimique des sennosides C et D                         | 35 |
| Figure 1.13 | Structure chimique de la Rhéine-8-glucose                        | 35 |
| Figure 2.1  | Schéma des différentes étapes d'extraction des Flavonoïdes       | 38 |
| Figure 3.1  | Chromatogramme des sennosides de <i>C. obovata</i>               | 61 |
| Figure 3.2  | Chromatogramme des sennosides de <i>C. acutifolia</i>            | 61 |
| Figure 3.3  | Spectre d'absorption de sennoside B                              | 63 |
| Figure 3.4  | Chromatogramme de sennoside B chez <i>C. acutifolia</i> à 270 nm | 64 |
| Figure 3.5  | Chromatogramme de sennoside B chez <i>C. obovata</i> à 270 nm    | 65 |
| Figure 3.6  | Chromatogramme de sennoside B chez <i>C. acutifolia</i> à 356 nm | 66 |
| Figure 3.7  | Chromatogramme de l'extrait éthanolique du senokot               | 68 |
| Figure 3.8  | Chromatogramme de l'extrait éthanolique du <i>C. acutifolia</i>  | 6  |
| Figure 3.9  | Chromatogramme de l'extrait éthanolique du <i>C. obovata</i>     | 70 |
| Figure 3.10 | Spectre d'absorption des flavonoïdes de <i>C. obovata</i>        | 75 |
| Figure 3.11 | Spectre d'absorption des flavonoïdes de <i>C. acutifolia</i>     | 76 |
| Figure 3.12 | Courbe d'étalonnage des glucides                                 | 77 |
| Figure 3.13 | Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>C. obovata</i>       | 81 |
| Figure 3.14 | Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i>    | 82 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figure 3.15 | Spectre de masse de thymol (référence)  | 86 |
| Figure 3.16 | Spectre de masse de thymol correspond au temps de rétention 9.25 min  | 86 |
| Figure 3.17 | Spectre de masse de carvacrol (référence)   | 86 |
| Figure 3.18 | Spectre de masse de carvacrol correspond au temps de rétention 9.47 min                                       | 87 |
| Figure 3.19 | Spectre de masse de p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl (référence)                                      | 87 |
| Figure 3.20 | Spectre de masse de p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl correspond au temps de rétention 37.72 min       | 87 |
| Figure 3.21 | Spectre de masse de Diisooctyl phthalate (référence)  | 88 |
| Figure 3.22 | Spectre de masse de Diisooctyl phthalate correspond au temps de rétention 40.43 min                           | 88 |
| Figure 3.23 | Spectre de masse de p-Vinylguaiacol (référence)   | 88 |
| Figure 3.24 | Spectre de masse de p-Vinylguaiacol correspond au temps de rétention 9.72 min                                 | 89 |
| Figure 3.25 | Spectre de masse de Dihydroactinidiolide (référence)  | 89 |
| Figure 3.26 | Spectre de masse de Dihydroactinidiolide correspond au temps de rétention 15.78 min                           | 89 |
| Figure 3.27 | Spectre de masse de Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl (référence)   | 90 |
| Figure 3.28 | Spectre de masse de Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl correspond au temps de rétention 21.66 min              | 90 |
| Figure 3.29 | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>  | 92 |
| Figure 3.30 | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 94 |
| Figure 3.31 | Effet de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>    | 94 |
| Figure 3.32 | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur l' <i>Agrobacterium</i>       | 94 |
| Figure 3.33 | Effet de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur l' <i>Agrobacterium</i>         | 95 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Figure 3.34  | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 95 |
| Figure 3.35  | Effet de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i> sur <i>Bacillus subtilis</i>                                 | 96 |
| Figure 3.36  | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Bacillus subtilis</i>          | 96 |
| Figure 3.37  | Effet de l'extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> sur <i>Escherichia coli</i>           | 96 |
| Tableau 2.1  | Préparation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides   | 50 |
| Tableau 2.2  | Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne   | 56 |
| Tableau 3.1  | Représentation des Rf obtenus par CCM des deux espèces de séné algérien   | 60 |
| Tableau 3.2  | Résultats du dosage des sennosides  | 73 |
| Tableau 3.3  | Longueurs d'ondes et absorbance des flavonoïdes de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>                      | 75 |
| Tableau 3.4  | Pourcentage en minéraux de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>  | 76 |
| Tableau 3.5  | Absorbances des différentes concentrations du glucose   | 77 |
| Tableau 3.6  | Concentration en glucides solubles de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>                                   | 78 |
| Tableau 3.7  | Les caractères organoleptiques des huiles essentielles de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>               | 79 |
| Tableau 3.8  | Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>C. obovata</i>   | 84 |
| Tableau 3.9  | Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i>  | 85 |
| Tableau 3.10 | Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>                     | 91 |
| Tableau 3.11 | Activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>                   | 92 |

## INTRODUCTION

A l'heure actuelle, le médicament de synthèse prend une place importante dans la thérapie alors que le monde végétal, recèle encore bien des substances actives qu'il faudrait découvrir [1].

Dans plusieurs institutions de recherche de part le monde, des laboratoires se spécialisent dans les études phytochimiques et pharmacologiques des substances d'origine végétale. Ces recherches permettront de doter le monde médical de nouvelles molécules biologiquement actives [1].

L'Algérie possède une richesse floristique considérable. Ce potentiel de plantes comporte des milliers d'espèces présentant des intérêts divers, notamment dans le domaine de la recherche des substances biologiquement actives [2].

De nos jours la valorisation des plantes médicinales, demeure un sujet de grande envergure pour notre pays. L'une des valorisations possibles de cette richesse naturelle est l'extraction et l'application des substances actives à partir de plantes médicinales.

Notre modeste participation dans le cadre de la recherche sur les principes actifs nous a conduit à nous intéresser à l'étude du séné « *Cassia acutifolia* » et « *Cassia obovata* » ; deux espèces désertiques cultivées en Algérie qui ont été utilisées par les populations locales.

Ce travail a pour objet de contribuer à la connaissance scientifique du séné Algérien, en déterminant sa composition ainsi que ses applications. Pour cela notre étude comprend deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude théorique, traitant les caractères botaniques des plantes étudiées.

La deuxième partie englobe l'ensemble des expériences et analyses menées sur les deux plantes. Nous avons effectué :

- une identification, une séparation et un dosage du principe actif du séné,

- une extraction et dosage de certains métabolites secondaires,
- une extraction et identification des huiles essentielles par CG/SM.
- une détermination de l'activité inhibitrice envers plusieurs souches microbiennes.

## **CHAPITRE 1**

### **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.1. Généralités sur les plantes médicinales

### 1.1.1. Généralités

Plus de 800.000 espèces végétales poussent sur la surface du globe dont 250.000 sont connues. Parmi ces dernières, l'O.M.S a répertorié plus de 22.000 plantes médicinales utilisées par la médecine traditionnelle. Néanmoins certaines de ces plantes médicinales sont utilisées aujourd'hui. Environ 1.200 plantes sont inscrites à la pharmacopée. Elles ont toutes une activité pharmacologique reconnue et constituent un réservoir de matières premières à la source de presque la moitié des spécialités pharmaceutiques classiques [3].

En botanique et en pharmacie, ces plantes sont reconnues pour offrir, par leur administration, un effet thérapeutique bienfaisant, sur l'organisme. Ce sont des usines chimiques naturelles, qui produisent des substances biochimiques actives, huiles essentielles, alcaloïdes, hétérosides, flavonoïdes et tanins. L'homme en fait usage pour sa santé [4].

Citons l'exemple de l'écorce de Saule qui contient la salicyline, ancêtre de l'aspirine (acide acétyl salicylique). Les alcaloïdes de la Pervenche entrent dans la composition de plusieurs médicaments contre le cancer et on pourrait ainsi multiplier les exemples. Ainsi le savoir sur la phytothérapie a beaucoup évolué tant en ce qui concerne les connaissances sur la structure et la pharmacologie des plantes que de certain de leurs effets [5].

L'usage quotidien des plantes a permis d'observer un grand nombre de leurs effets que la science actuelle reconnaît comme des biens faits réels. Ainsi, les propriétés calmantes de l'opium issu du Pavot, étaient connues 4000 ans avant qu'on apprenne à en extraire la morphine qui reste l'un des antalgiques majeurs en oncologie. Toutes ces connaissances longtemps restées empiriques, et que le progrès des sciences modernes a rendu plus rigoureuses, témoignent de la pérennité de la phytothérapie [6].

### 1.1.2. Définition

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation [7].

Les plantes médicinales sont des végétaux dans lesquels les éléments, et les forces de la nature engendrent des substances spéciales. Certaines sont capables de vivifier et de favoriser les fonctions de l'organisme humain. D'autres peuvent exercer une action thérapeutique sur des états pathologiques de ces fonctions [8].

### 1.1.3. Phytothérapie

La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle. Elle est encore massivement employée dans certains pays dont ceux en voie de développement. C'est une médecine parallèle du fait de l'absence d'étude clinique [9].
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments. On parle alors de pharmacognosie [9].

Selon LAVERY (1999) le terme « phyto » inclut toutes les plantes ou une partie de plante que l'on peut utiliser pour fabriquer un remède tels que les fleurs, les racines, les bulbes, les écorces et les graines. On y inclut également les plantes aromatiques, les épices et plusieurs fruits et légumes [10].

### 1.1.4. Place de la médecine traditionnelle dans le monde

Pendant la dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde. En Chine, 40 % environ de l'ensemble des soins de santé relèvent de la médecine traditionnelle. Au Chili et en Colombie, respectivement, 71 % et 40 % de la population, ont recours à la médecine traditionnelle. En Inde, 65 % de la population rurale utilisent les plantes médicinales au niveau des soins primaires de santé. Dans les pays développés, les médecines traditionnelles, complémentaires et parallèles connaissent un succès croissant. Ainsi, le pourcentage de la population ayant eu recours à ces médecines au moins une fois est de 48 % en Australie, 31 % en Belgique, 70 % au Canada, 49 % en France et 42 % aux Etats-Unis d'Amérique [3].

La médecine traditionnelle a également été appliquée au traitement de maladies très graves comme le paludisme ou le SIDA. Des études menées en Afrique et en Amérique du Nord ont montré que 75 % des personnes vivant avec le VIH/SIDA ont recours à la médecine traditionnelle, exclusivement ou en complément d'autres traitements [11].

Au Ghana, au Mali, au Nigeria et en Zambie, les plantes médicinales sont le traitement de première intention pour plus de 60 % des enfants atteints de forte fièvre [11].

#### 1.1.5. Place des remèdes traditionnels dans la politique pharmaceutique Algérienne

Le territoire algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, le Sahara et autour des points d'eau. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie algérienne et pour le

maintien de l'équilibre écologique de la région. Parmi ces ressources, il existe au moins 500 espèces de plantes médicinales utilisables par les phytothérapeutes dont 100 espèces se vendent au marché chez les herboristes [2].

Selon Colette, 2004 [6] le thym, contient une essence composée de deux phénols, de plusieurs alcools, de carbures ainsi que de beaucoup de tanins. Utilisé comme aromate, le thym est un antiseptique de l'intestin et des bronches. En infusion, il combat la coqueluche et la toux [6].

L'ortie contient une saponine, une huile essentielle, des tanins, des substances mucilagineuses et un alcaloïde appelé lamine. Elle est très utilisée aujourd'hui dans les soins capillaires [6].

La menthe contient une essence douée de propriétés antiseptiques. Son principe actif, le menthol, est contenu dans toute la plante. Son contact procure une sensation de fraîcheur. Il peut agir comme stimulateur nerveux ou comme sédatif et antispasmodique [6].

La sauge est connue depuis des siècles comme une plante médicinale. Le principe actif est localisé dans les feuilles qu'il faut cueillir à la fin du printemps avant que les fleurs ne s'épanouissent totalement. Les feuilles ont une odeur agréable qui suscite leur utilisation culinaire, son usage stimule l'appétit. La sauge possède aussi un effet hypoglycémiant [6].

#### 1.1.6. Récolte des plantes médicinales

La quantité en principes actifs dans la plante dépend de son biotope, de son stade de développement et de son âge. Toutefois, il est à signaler que la quantité et la composition en principes actifs varient au cours de la croissance ainsi qu'au cours de la journée [12].

Les plantes médicinales seront donc cueillies lorsque la teneur en matières actives est la plus forte. La récolte se fait par temps sec, après le levé du soleil et la disparition de la rosée. Les parties aériennes de la plante se récoltent au moment de la floraison [12].

Quand aux parties souterraines, elles se récoltent en automne c'est-à-dire après la mobilisation des réserves [13].

Au contraire, les plantes à huile essentielle se récoltent le matin, avant le levé du soleil pour éviter l'évaporation des principes volatils [14].

#### 1.1.7. Séchage et conservation des plantes médicinales

La récolte et le séchage des plantes médicinales demandent autant de soins afin que les drogues ne perdent pas leurs qualités médicinales. Le séchage se fait à l'abri de la lumière. Les rayons solaires causent une déperdition des matières actives, un jaunissement et un brunissement rapides des végétaux, ainsi qu'une altération de leur valeur médicinale [12].

Le séchage est suivi d'une conservation. Toutes les drogues doivent être conservées à sec, et à l'obscurité, dans des récipients fermés. Elles peuvent être éventuellement conservées dans des boîtes en carton ou des sachets en papier. Lorsqu'il s'agit de quantités importantes, on emploie des sacs en toile, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les emballages dans des sachets en plastiques sont à éviter [15].

Certaines drogues sont particulièrement sensibles à l'humidité de l'air (drogues hygroscopiques). Elles sont conservées exclusivement dans des bouteilles de verre brun [16].

Pour une bonne conservation des drogues, on vérifie souvent l'état des plantes. Toute trace d'humidité, de moisissure, et d'insectes qui altèrent leur valeur médicinale est à proscrire [17].

#### 1.1.8. Préparation et modes d'utilisation

L'action des plantes médicinales ne dépend pas seulement de leurs propriétés et de leurs qualités, mais également de la manière dont elles sont appliquées. Il existe en effet de nombreux modes quant à leur utilisation: fraîches ou séchées, pour un usage externe ou interne. On peut utiliser une plante seule ou un mélange de plusieurs drogues. Parfois, la médecine utilise une combinaison de préparations traditionnelles naturelles en additionnant des composés synthétiques [12].

#### - L'infusion

C'est le mode de préparation le plus connu. Il s'obtient en versant de l'eau bouillante sur des feuilles ou des fleurs placées dans un récipient. On laisse saisir quelques secondes à l'ébullition. On couvre le récipient. Le temps d'infusion est de durée variable, suivant l'indication, de 5 à 15 minutes en moyenne [18].

#### - Macération

Certains constituants sont tellement fragiles que même l'infusion risque de les altérer. Le mode le plus adéquat de leur préparation est la macération. C'est un processus d'extraction à température ambiante [18]. Le solvant employé peut être l'eau, l'alcool et parfois le vin. Le temps de macération dépend des propriétés intrinsèques de la drogue. La macération à l'eau ne doit pas se prolonger trop longtemps pour éviter tout risque de fermentation [19].

#### - Les sirops

Il s'agit, de solutions concentrées de sucre dans l'eau ou dans des extraits de drogues pouvant contenir d'autres substances. Ils sont employés par voie orale. On peut mentionner le sirop composé de thym ou le sirop simple de guimauve, de framboise ou de plantain. Ces préparations galéniques sont surtout appréciées en pédiatrie où on les emploie souvent pour leurs vertus antitussives [20].

#### - La poudre

Les plantes séchées à l'ombre sont finement coupées puis broyées dans un mortier en porcelaine. Ces plantes seules ou en mélange sont vendues en sachets

(infusettes) pour faire des tisanes. Certains malades prennent la poudre directement sur la langue, ou la mélangent à leurs aliments [20].

#### 1.1.9. Les principes actifs des plantes médicinales

C'est à partir du début du 19<sup>ème</sup> siècle que la chimie analytique s'est emparée des plantes médicinales pour mettre à jour les principes actifs responsables de leurs effets pharmacologiques. Ainsi apparurent tout au long du 19<sup>ème</sup> siècle de très nombreuses molécules, des alcaloïdes comme la morphine, la cocaïne ou la quinine, des glucosides comme la digitaline et bien d'autres substances actives. Pour les plantes très toxiques dont les substances actives agissent à des doses de l'ordre du centigramme voire du milligramme, la thérapeutique s'est orientée vers l'utilisation directe du principe actif plus facile à doser plutôt que d'avoir recours à la plante entière [5].

Pour comprendre l'usage des plantes médicinales et leurs modes d'action, il est nécessaire d'être orienté sur leurs principes actifs et leur efficacité. Les plus significatifs parmi ces composées chimiques sont les suivants :

##### • Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont souvent amers. Ce sont des composés azotés, basiques, (d'où l'appartenance à la famille des amines). Ces derniers les rendent pharmaceutiquement très actifs. D'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes existent sous la forme de sels solubles (citrate, malate et benzoate) ou sous forme d'une combinaison avec les tanins [21].

Leur chimie est complexe et on les classe selon la composition de leur noyau en différents groupes.

On les rencontre surtout chez les angiospermes. Il sont très peu présents chez les thallophytes, les gymnospermes et les ptéridophytes. Au niveau cellulaire, ils s'accumulent dans les vacuoles, et constituent la source la plus importante de nos médicaments [22].

##### • Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des combinaisons naturelles de phénol avec des noyaux aromatiques. En fonction de leur structure et du degré d'oxydation, ils se divisent en flavonols, flavons et flavonones [22].

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet [21].

Ils ont une large gamme d'effets pharmacologiques sur l'organisme. Ils augmentent la solidité des capillaires, participent aux processus oxydants et désoxydants et produisent des effets spasmolytiques et anti-inflammatoires [22].

#### • Les glucosides

Les glucosides sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils se composent de deux parties. L'une contient un sucre, par exemple le glucose. Elle est le plus souvent inactive mais exerce un effet favorable sur la solubilité du glucoside et sur son absorption, voire même son transport vers les organes. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie, la plus active, nommée aglycone (ou aglucone). Selon leur composition chimique, on distingue plusieurs groupes de glucosides [12] :

- Les glucosides cyanogènes libère l'acide prussique (acide cyanhydrique). Ils sont présents dans l'amande amère.
- Les glucosides sulfurés présents dans la moutarde noire ont une action irritante sur la peau.
- Les glucosides anthraquinoniques ont un effet laxatif. On les trouve dans l'écorce de la bourdaine, les fruits du nerprun, les racines de rhubarbe et dans les feuilles de séné.
- Les glucosides tonocardiaques sont très toxiques même lorsqu'ils sont administrés en très faible quantité. On les tire d'une plante appelée l'adonis de printemps, du muguet et de la digitale.
- Les glucosides sudorifiques proviennent des feuilles de tilleul ainsi que de celles du sureau [12].

### • Les tanins

Ce sont des substances amorphes, extraites de plantes, utilisées principalement pour le tannage du cuir. Certains, appelés tanins condensés, sont à base de phénols, d'autres sont des mélanges d'esters, de glucose ou d'autres sucres. Les meilleurs tanins sont issus de la noix de galle du chêne et des feuilles du sumac [23].

Ils sont utilisés comme matière de construction, de réserves ou de protection. Ils se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale, ou concentrés dans des poches spéciales : les vacuoles à tanin. Ils colorent en brun rouge les organes qui les contiennent. On les utilise comme bactéricides, anti-inflammatoires ou moyens hémostatiques [24].

### • Les constituants minéraux

Il est évident que l'effet thérapeutique présumé dans la tradition est la conséquence de la composition aussi bien organique que minérale.

Ainsi, les plantes renferment les sels de potassium, de phosphore, de magnésium et de calcium. Les sels de potassium se trouvent en abondance dans toutes les plantes où ils existent en générale sous une forme soluble. Les sels de calcium sont beaucoup moins solubles [25].

### • Les acides organiques

Les plus connus sont les acides maliques, citriques, oxaliques et tartriques. Ils peuvent agir comme laxatifs légers, spécialement l'acide tartrique et ses sels [26].

### • Le mucilage

Il possède la propriété de gonfler dans l'eau avec la formation de masses plastiques ou de solutions visqueuses. C'est à cette propriété qu'ils doivent leurs

effets laxatifs. Le mucilage forme une couche protectrice sur la muqueuse intestinale contre les substances irritantes. Les principales drogues mucilages sont la graine de lin, le fenugrec et la mauve. Par cuisson prolongée, les mucilages sont dégradés en sucres et perdent leur activité [26].

- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentes dans les cellules végétales sous forme de molécules volatiles d'où le nom « essence ». Elles sont solubles dans les huiles, les graisses et les solvants organiques, d'où le nom « huile » soulignant le caractère visqueux et hydrophobe [27].

Selon Salle (1991), les huiles essentielles sont un mélange de divers produits issus d'une espèce végétale. Ces mélanges passent avec certaines proportions d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur [28].

En phytothérapie ou en Aromathérapie, les huiles essentielles ont toujours été considérées comme un puissant concentré des propriétés thérapeutiques de la plante [13].

## 1.2. Etude botanique du séné

### 1.2.1. Généralités

Le séné est probablement la plante médicinale la mieux connue depuis l'antiquité. Il est considéré comme un puissant laxatif. Les médecins arabes furent les premiers à l'employer. Il entre dans la composition de nombreux médicaments. Les parties utilisées sont les feuilles et les fruits [29].

Le séné est actuellement indiqué pour obtenir des selles molles en cas de fissure anale ou après des interventions chirurgicales abdominales ou anales. Il est également utilisé pour purger et vider l'intestin. La plante du séné pousse sur le continent africain et asiatique [30].

### 1.2.2. Systématique et description botanique du séné

On compte plus de 600 espèces dans le genre *Cassia*. Il existe sous deux formes : arbuste ou arborescente. On les classe dans la famille des *Caesalpiniaceae*, *Mimosaceae* et les *Fabaceae*, regroupées dans la superfamille des légumineuses [31].

#### 1.2.2.1. Systématique

La classification botanique du séné est la suivante [32] :

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

Les espèces les plus connues dans le commerce et ayant fait objet d'études antérieures sont [33] :

- *Cassia angustifolia Vahl* = séné de timnevelly
- *Cassia acutifolia Delile* = séné d'Alexandrie = séné de Khartoum
- *Cassia fistuls*
- *Cassia obtusifolia*
- *Cassia tora*
- *Cassia obovata* = *Cassia italica* = Cassia du Soudan ou du Sénégal

- *Cassia podocarpa* Guill
- *Cassia alata*
- *Cassia occidentalis*
- *Cassia seiberiana*
- *Cassia articulata*

#### 1.2.2.2. Description botanique

Selon Anonyme (1995) les tiges du séné sont ligneuses à la base. Elles se ramifient vers les extrémités [34].

Les feuilles sont composées et paripennées. Elles portent des folioles de couleur verte jaunâtre. Elles sont lancéolées, étroites et asymétriques à la base. Elles ont une longueur de 5 à 6 cm et 2 cm de largeur [35].

Les fleurs sont groupées en grappes dressées. Elles présentent un calice quinconce, des pétales jaunes veinés de brun en préfloraison, imbriquée et ascendante. Les étamines libres sont au nombre de 10 dont 3 stériles [35].

Les fruits sont des gousses membraneuses de couleur brun clair, plates de 3 à 5cm de longueur. Elles sont déhiscentes. Les gousses contiennent entre 6 à 8 graines [36].

#### 1.2.3. Description botanique des deux espèces étudiées

##### 1.2.3.1. *Cassia acutifolia*

- **Noms vernaculaires**
  - Arabe : Snan Elmaquie
  - Tamahaq : Tagergart
  - Français : Séné

- **Description**

C'est une **plante** ramifiée (fig.1.1). Les **feuilles** non munies de stipules basales. Elles sont composées de folioles lancéolées, étroites, trois à quatre fois plus longues que large (2 à 4 cm de longueur), d'où le nom du *Cassia lancéolata*. Leur coloration est vert jaunâtre à vert grisâtre [37].

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

Les **fruits**, sous forme de gousses aplaties sont légèrement arquées sans crête médiane (fig. 1.3) [38].



Figure 1.1 : Plante de *Cassia acutifolia* [38].



Figure 1. 2 : Fleurs de *Cassia acutifolia* [38].



Figure 1.3 : Gousses de *Cassia acutifolia* [38].

#### 1.2.3.2. *Cassia obovata*

- **Noms vernaculaires**

Arabe : Snan Elmaquie

Tamahaq : Agergart

Français : Séné

- **Description**

C'est une **plante** très ramifiée (fig. 1.4). Les **feuilles** sont munies à leur base de deux stipules. Elles sont composées de folioles obovales. Elles sont deux fois plus longues que large et de couleur vert luisant (fig. 1.5) [38].

Les **fleurs** sont abondantes en grappes, leur couleur est jaune pâle (fig. 1.6).

Les **fruits**, sous forme de gousses aplaties et arquées sont munies d'une crête dentelée centrale. Elles sont de couleur verte à l'état jeune (fig.1.7) et brun noir à maturité [38].



Figure 1.4 : Plante de *Cassia obovata* [38].



Figure 1.5: Feuilles de *Cassia obovata* [38].



Figure 1.6 : Fleurs de *Cassia obovata* [38].



Figure 1.7 : Gousses de *Cassia obovata* [38].

#### 1.2.4. Répartition géographique du séné

##### 1.2.4.1. Dans le monde

Le séné pousse dans les régions tropicales et sub-désertiques principalement dans l'Afrique orientale [39].

Les noms communs de séné sont : Cassia senna, séné d'Alexandrie, Alexandria senna [40]. Dans les pays arabes, il porte le nom de Snan Elmaquia [41].

Il est plus cultivé dans les régions du sud de l'Inde, du Pakistan, en Iran et en Arabie saoudite [42].

##### 1.2.4.2. En Algérie

Le séné pousse spontanément dans les oueds du Sahara méridional, Tindouf, Hoggar, Tassili, Illizi et Tamanrasset. Les espèces les plus connues de ces régions sont : *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* [33].

*Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*, se rencontrent sur différents types de sols. Elles poussent dans les palmeraies, les lits d'oueds, mais aussi dans des milieux rocheux comme les hamadas et les dunes des milieux ensablés [43].

### 1.2.5. Récolte et conservation du séné

Le séné cultivé en Inde et au Soudan est récolté au mois d'août- septembre. Il subit un séchage à température qui se situe entre 25 et 40°C. Après le séchage, les gousses sont séparées des feuilles et sont conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité. Une partie de cette récolte est destinée à la consommation locale et l'autre est exportée. On l'expédie en Europe et dans le monde en balles de 180Kg nommées fardes [44]. Le séné est très utilisé dans le monde entier. La production mondiale en 1986 est estimée à plus de 5000 tonnes [31].

En Algérie, le séné consommé est local (population des régions sahariennes) ou de diverses provenances de l'Égypte (*Cassia senna* = *Cassia acutifolia*), de l'Inde ou du Pakistan (*Cassia angustifolia*) [33].

### 1.3. Composition chimique du séné

Les feuilles et les gousses du séné contiennent beaucoup de composés chimiques issus du métabolisme secondaire. Les composés majoritaires sont constitués essentiellement des dérivés anthracéniques [45]. Ces derniers existent sous deux catégories :

- la première, la plus active pharmacologiquement est constituée des dérivés anthracéniques combinés en hétérosides appelés sennosides [46].
- La deuxième, inactive pharmacologiquement est constituée de dérivés anthracéniques libres, [46].

En outre, le séné renferme 10 à 12 % de matière minérale, des flavonoïdes, du polyol (le pennisol), des polysaccharides, des dérivés naphthaléniques issus de la cyclisation d'un poly-  $\beta$ -cétoester, du mucilage, de l'huile essentielle et des polyphénols résines [44].

### 1.3.1. Structure chimique des dérivés anthracéniques libres

Les différentes structures de ce groupe sont caractérisées par la présence de composés phénoliques et des dérivés de l'antracène (fig.1.8) avec différents degrés d'oxydation (anthrones, anthranols, anthraquinones) (fig.1.9) [21].

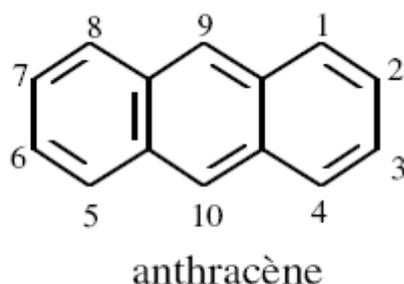


Figure 1.8: Structure chimique de l'antracène [21].

- Chez les anthrones le carbone C-10 est un carbone méthylique. Selon le pH, ces anthrones peuvent être accompagnés de leurs formes oxydées, les anthranols. Au cours de la dessiccation des feuilles et des fruits, deux processus de transformation entre en jeu : l'oxydation, qui conduit à des hétérosides anthraquinoniques et la dimérisation, qui engendre des hétérosides de dianthrones [21].

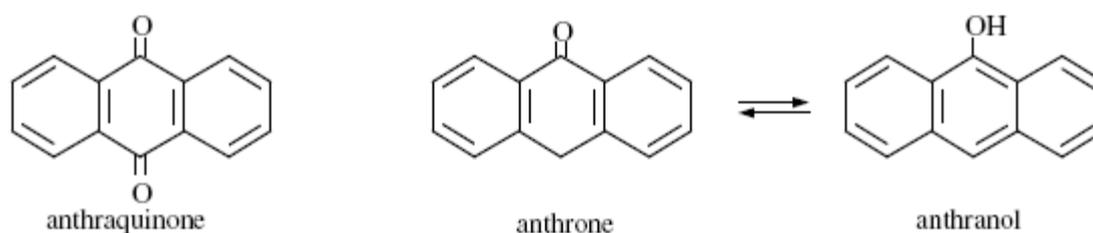


Figure 1.9 : Structure chimique des dérivés anthracéniques [21].

- Les carbones 3 et 6 peuvent être substitués. En effet, le C<sub>3</sub> est toujours substitué par un carbone de degré d'oxydation variable : méthyle, hydroxyméthyle, carboxyle (fig.1.10), et le C<sub>6</sub> n'est qu'éventuellement substitué par un hydroxyle phénolique [47].

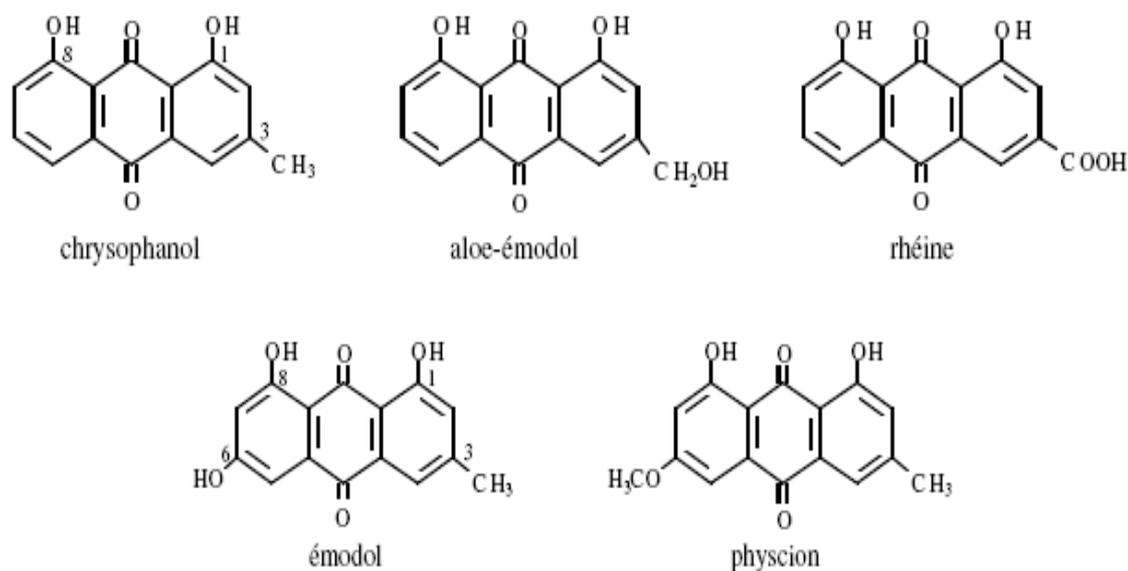


Figure 1.10 : Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques [48].

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

Les hétérosides sont composés de deux parties :

- Une contient un sucre, par exemple le glucose. Elle exerce un effet favorable sur la solubilité des glucosides ainsi que son absorption et son transport vers un organe.
- L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie, la plus active, nommée aglycone ou génine [48].

La liaison du glucose avec la génine engage normalement l'hydrolyse phénolique en C<sub>8</sub> [48].

Plus de 80% des principes actifs du séné sont représentés par des sennosides A, B, C, D et la rhéine-8-glucose [48].

### 1.3.2.1. Les sennosides A et B

Les sennosides A et B sont majoritaires. Ce sont des diglucosides d'une génine homodianthronique symétrique (fig.1.11) [49].

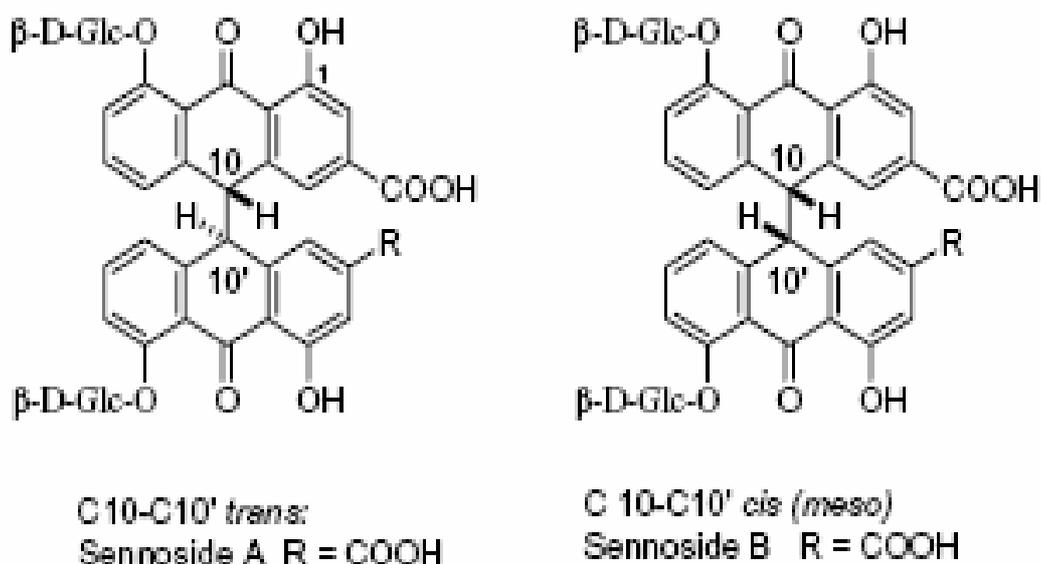


Figure 1.11 : Structure chimique des sennosides A et B [50].

### 1.3.2.2. Les sennosides C et D

Les sennosides C et D sont des composés à structure chimique analogue mais présents en faible quantité [44]. Ce sont des diglucosides d'une génine hétérodianthronique dissymétrique (rhéine-anthrone + aloé-émодол anthrone) (fig.1.12) [48].

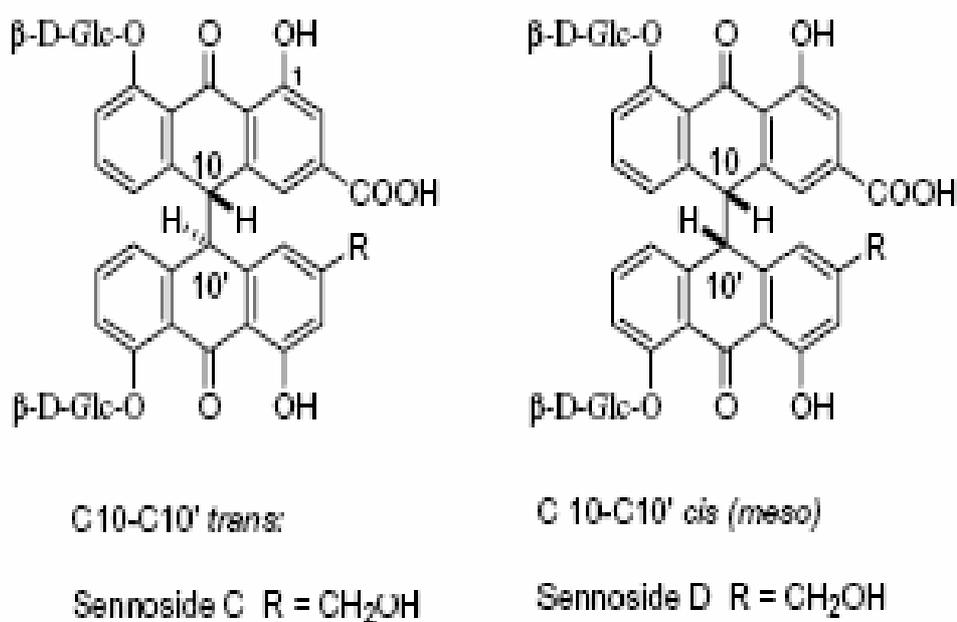


Figure 1.12 : Structure chimique des sennosides C et D [51].

### 1.3.2.3. La Rhéine-8-glucose

C'est un glucoside de naphthalène. Selon sa structure, il porte le nom de 6-hydroxymuzinine glucoside dans *Cassia acutifolia* et de glucoside tinnevelline dans *Cassia angustifolia*. (fig.1.13) [44].

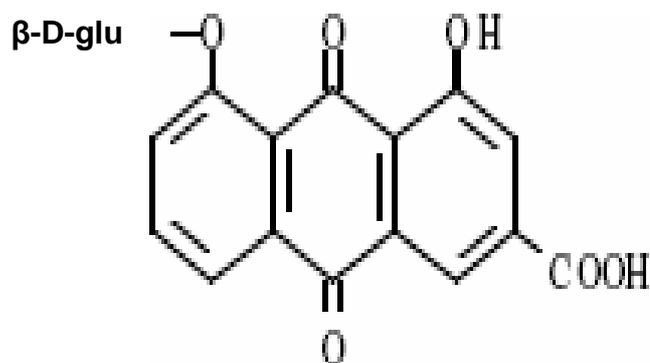


Figure 1.13 : Structure chimique de la Rhéine-8-glucose [21].

### 1.3.3. Propriétés chimiques des sennosides

Selon Budavari (1996), les sennosides présentent des poids moléculaires élevés. [52] :

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

Du point de vue réactionnel, les variations structurales observées pour ces molécules sont limitées. En dehors des deux hydrolyses phénoliques toujours présentes en C<sub>1</sub> et C<sub>8</sub>, seuls les carbones C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub> peuvent être substitués par les groupements (méthyle, hydroxyméthyle, carbonyle) [44].

### 1.3.4. Propriétés physiques des sennosides

Les hétérosides anthracéniques combinés sont souvent bien cristallisés de coloration nettement plus pâle que les génines correspondantes. Ils sont solubles dans l'eau chaude et dans les solutions hydroalcooliques mais sont insolubles dans les solvants organiques non polaires [37].

### 1.3.5. Biosynthèse des sennosides

La biosynthèse des dérivés de l'antracène a lieu dans les racines. Dans ces dernières se forme le chrysophanol qui est la première anthraquinone, ensuite l'aleo-émodol et l'émodol et finalement la rhéine [44].

La voie de la biosynthèse des molécules précurseurs est la voie de Schikimate qui est une fixation photosynthétique du CO<sub>2</sub>. Elle se déroule complètement dans le chloroplaste [53].

La formation des anthraquinols résulte de la cyclisation d'un poly-β-cétoester. Elle implique l'oxydation consécutive du groupe 3-méthyl de l'antranol (chrysophanol) en présence d'une glucosylation légère. Les glucosides formés sont transloqués aux feuilles et aux fleurs [44].

### 1.3.6. Localisation des sennosides dans la plante

Il y a des différences notables de composition entre les plantes fraîches et les plantes sèches. Dans le végétal frais les composés anthracéniques libres sont majoritaires. Dans le végétal séché, on y trouve les dérivés anthracéniques combinés [54].

Dans les racines jeunes, on trouve des dérivés anthroniques de type chrysophanol. Dans les racines âgées on trouve souvent les dérivés de type anthraquinone. Dans les graines, les composés actifs sont localisés dans le péricarpe et sont semblables à ceux formés dans les feuilles [54].

Les graines contiennent très peu de sennosides par comparaison aux feuilles mais il a été constaté que les cotylédons de plants de trois jours peuvent contenir des teneurs équivalentes à celles des feuilles [42].

La teneur des sennosides dans les graines varie approximativement de 1.2 à 2.5% dans *Cassia angustifolia* et approximativement de 2.5 à 4.5% dans *Cassia acutifolia*. Dans les feuilles la teneur en sennosides varie de 2.5 à 8% pour les deux espèces [44].

### 1.4. Propriétés organoleptiques du séné

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

### 1.5. Propriétés pharmacologiques du séné

Le séné, par ses vertus thérapeutiques et plus spécialement par son action contre la constipation, possède deux principales propriétés pharmaco thérapeutiques : laxative et purgative [56].

Les propriétés laxatives et purgatives du séné semblent avoir été découvertes par les arabes au IX<sup>e</sup> siècle et connues en Europe par leur intermédiaire [56].

Selon Leng – Peschlow (1986), les dérivés actifs des sennosides exercent leur action selon deux mécanismes [57] :

- Ils stimulent la motilité du gros intestin en augmentant les mouvements péristaltiques et donnent une accélération du transit dans le côlon.

- Inhibition de la résorption de l'eau, du sodium et du chlore et une augmentation de la sécrétion du potassium au niveau de la muqueuse intestinale.

Le séné est administré sous forme d'infusé (5 à 20g/l) ou de poudre (0.5-5g / 24 heures). Il rentre dans de nombreuses tisanes est préparations spécialisées [58].

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

L'action laxative ou purgative du séné dépend de la dose utilisée. Des doses excessives peuvent entraîner des coliques intestinales, des vomissements, une diarrhée occasionnelle, des crampes abdominales ou des flatulences [59].

Ces effets sont rares en cas d'utilisation conforme à la dose recommandée. Cette utilisation doit être de court terme (pas plus d'une journée) [60].

Comme pour les autres laxatifs stimulants, la drogue du séné est contre-indiquée dans les cas de maladies intestinales inflammatoires telle que la colite ulcéreuse, l'occlusion intestinale, le déficit en potassium ou la constipation chronique [61].

Certains auteurs rapportent une observation d'allergie professionnelle au séné. Une patiente âgée de 28 ans a développé un asthme et une rhinite à la suite d'une exposition au séné dans un laboratoire de phytopharmacie [62].

## CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matériel et réactifs : (Appendice B et C)

#### 2.1.2. Matériel végétal

##### 1. Récolte

Les deux plantes *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* ont été récoltées dans la région d'Oua-Helledjen dans les Oueds d'ahagar de la Wilaya de Tamanrasset.

La récolte a été effectuée sur les parties aériennes (tige – feuille) de la plante en fin octobre 2007.

##### 2. Authentification

Les deux espèces ont été authentifiées par Mme Sahki R, chargée de recherche, et Monsieur Abdellaoui S, responsable de la station INRF de Tamanrasset.

##### 3. Séchage et broyage

Le séchage est naturel directement après la récolte, afin de garder intacts les composés actifs de ces plantes. Il est réalisé à l'ombre à une température ambiante et une aération constante, pendant 20 jours.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Identification et séparation des sennosides des deux espèces

Nous avons utilisé trois types de chromatographie pour identifier et séparer les sennosides des deux plantes.

### 2.2.1.1. Identification des sennosides par la chromatographie sur couche mince

#### 1. Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation dans laquelle une phase stationnaire, constituée d'un matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support en plaque de verre de métal ou de plastique. Les solutions à analyser sont appliquées sur la plaque. La séparation repose sur les mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur une combinaison de ces mécanismes. Elle s'effectue par migration de solutés (solutions d'analytes) à travers la couche mince (phase stationnaire) dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile) [63].

#### 2. Mode opératoire

##### Préparation de la solution à analyser

- Dissoudre 100 mg de poudre de feuilles séchées du séné dans 5 ml d'éthanol à 50%.
- Agiter et chauffer jusqu'à ébullition.
- Refroidir le mélange et centrifuger pendant 5 mn (5000 rpm). Le surnageant est utilisé pour réaliser les analyses [63].

##### La phase stationnaire

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

##### Préparation de la phase mobile

La phase mobile utilisée est un mélange [63] :

- Acide acétique glacial : 1 V
- Acétate d'éthyle : 40 V
- Propanol : 40 V
- Eau distillée : 30 V

- 200 ml de ce mélange sont placés dans une cuve à chromatographie sur couche mince.
- Le niveau du liquide dans la cuve est ajusté à 0,5 cm.
- fermer la cuve et laisser se saturer de vapeur pendant 2 heures.
- Le dépôt de la solution à analyser s'effectue à l'aide d'une micropipette. A cet effet, 10µl sont prélevés et déposés à un point à 2 cm de l'extrémité inférieure de la plaque sur la ligne de dépôt.

### Développement du chromatogramme

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque par capillarité. Ainsi, la plaque est placée dans la cuve en position verticale, dans un récipient fermé. Lorsque le front du solvant s'est trouvé à environ 4 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et le front d'éluion est déterminé immédiatement à l'aide d'un crayon [63].

### Révélation et calcul du facteur de rétention

L'identification des constituants se réalise après séchage de la plaque à l'air. Elle est suivie d'une pulvérisation par une solution d'acide nitrique à 20% et d'un chauffage à 120°C pendant 10 mn. Une deuxième pulvérisation par une solution d'hydroxyde de potassium (50 g/l dissoute dans l'éthanol à 50%), suivie par un séchage jusqu'à l'apparition des taches [64].

Le calcul du Rf (facteur de rétention) se fait par l'équation suivante :

$R_f = d_i / D$  avec :

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

Les Rf sont comparés avec les Rf trouvés par KAREL (1972) qui correspondent aux différents sennosides [65].

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

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

#### 1. Principe

La chromatographie sur colonne est un procédé de séparation où la phase mobile est un liquide et où la phase stationnaire, contenue dans une colonne est formée par un solide de fine granulométrie.

Les principes généraux de la chromatographie sur colonne sont les mêmes que pour la chromatographie sur couche mince [66].

#### 2. Mode opératoire

- Nous avons utilisé une colonne capillaire miniaturisée munie d'un robinet. Cette dernière est remplie de gel de silice pour colonne jusqu'à une hauteur équivalente à quinze fois son diamètre ( $D = H/15$ ).
- Un papier filtre sous forme d'un cercle est déposé sur le gel de silice pour éviter la dispersion de ce dernier.
- Verser l'acétate d'éthyle qui est le solvant le moins polaire de la phase mobile. L'écoulement du solvant se fait longtemment pour éviter la formation de bulles d'air.
- Après avoir laissé décanter la phase stationnaire nous avons déposé à l'aide d'une seringue 1 ml de l'échantillon à séparer. Il est préparé de la même façon que dans la CCM et nous avons élué la phase mobile placée au-dessus de la colonne dans une ampoule à décanter.
  
- Nous avons récupéré les différentes fractions moléculaires deux heures après, dans de petits béchers en fonction de leur migration et leur séparation en différentes couches.
  
- Après avoir récupéré les fractions séparées, elles sont soumises à l'évaporation à l'air libre (élimination de la phase mobile). Ensuite on procède à des analyses par spectrophotométrie en utilisant le méthanol comme solvant.

### 2.2.1.3. Analyse qualitative des sennosides par HPLC

#### 1. Principe

La chromatographie liquide à haute performance est une méthode de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase [67].

#### 2. Les organes de l'appareil utilisé

- a) **Un réservoir de solvant (éluant)** qui contient la phase mobile en quantité suffisante.
- b) **La pompe** : permet de travailler en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- c) **Vanne d'injection** : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage
- d) **La colonne** : la colonne est un tube construit par un matériau inerte aux produits chimiques, souvent en inox, elle contient la phase stationnaire.
- e) **Détecteurs** : détecteur UV-vis, qui mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.

#### 3. Conditions opératoires

- **Colonne** : C<sub>18</sub>
- **Débit** : 0.8 ml/ min
- **Longueur d'onde**: 270 nm
- **Phase mobile** : tampon acétate de sodium (pH =6) + acétonitrile (70V/30V).

#### 4. Préparation de la phase mobile

- La phase mobile est formée de 8.2 g d'acétate de sodium dissout dans 800 ml d'eau bidistillée.

- Le pH est ajusté à 6 à l'aide de l'acide acétique. Ajouter 700 ml de ce tampon à 300 ml d'acétonitrile pour HPLC.
- Filtrer la phase mobile et dégazer à l'ultrason [55].

### 5. Préparation des solutions à analyser

- Les fractions à analyser correspondent aux sennosides des deux plantes, séparés par CC.
- L'extrait éthanolique des deux plantes est préparé comme suit :
  - Prendre 0.1 g d'extrait de feuilles du séné, ajouter 5ml d'éthanol à 50 % et porter à ébullition.
  - Refroidir et centrifuger (rpm = 5000) pendant 5 min. Après évaporation du solvant, nous utilisons la phase mobile comme solvant.
- Le témoin utilisé est un comprimé Sénokot<sup>®</sup> fabriqué par VIATRIS spa à partir de la poudre cryobroyé du séné. Ce comprimé renferme 152 mg de poudre de séné contenant 7.3 mg des hétérosides anthracéniques exprimés en sennosides B (4.8 % des sennosides). Nous l'avons préparé de la même manière que l'extrait éthanolique [63].

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

#### 1. Principe

L'absorbance (A) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (T) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation suivante [68]:

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = I/I_0$$

$I_0$  = intensité du rayonnement monochromatique incident,

$I$  = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

## 2. Mode opératoire

### Préparation des échantillons et du témoin à analyser

- Les échantillons des deux espèces sont préparés de manière identique que dans la CCM.

- Le témoin utilisé est un comprimé Sénokot.<sup>®</sup>

Le dosage des sennosides est effectué aux longueurs d'ondes, 356nm, 536nm, 608nm, 668nm et 750nm qui correspondent respectivement aux sennosides B, A, D, la Réine-8-glucose et le sennoside C.

Les longueurs d'ondes des sennosides ont été déterminées par Rouibi et *al.* 2007 [69].

### 2.2.3. Extraction des flavonoïdes

Nous avons suivi la méthode décrite par Guignard, (2000) (fig.2.1) [70].

#### 1. Macération et évaporation

- Mettre 30 g de poudre des feuilles séchées du séné, dans un Erlen Mayer, puis verser 100 ml de méthanol, et laisser macérer pendant 72 heures,
- Filtrer et évaporer le méthanol par un rota vapeur. La température d'évaporation de méthanol est de 60°C sous vide,
- Le résidu sec obtenu est traité par 50 ml d'eau tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

#### 2. Extraction liquide- liquide

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou de plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non miscibles.

### 2.1. Elimination de la chlorophylle et les lipides par le chloroforme

- Verser l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, et ajouter 30 ml de chloroforme (densité=1,476 à 1,481). Laisser décanter, jusqu'à la formation de deux phases bien séparées. La séparation se fait selon la densité de l'eau et celle du chloroforme.
- Eliminer la phase organique, refaire sur plusieurs reprises jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne.
- Récupération de la phase aqueuse.

### 2.2. Elimination des génines libres

- Ajouter à la phase aqueuse récupérée 30 ml d'éther diéthylique, et laisser décanter.
- Formation de deux phases, récupérer la phase inférieure (extrait aqueux).
- Eliminer ensuite la phase supérieure (éther diéthylique + quelque génines libres).
- Refaire sur plusieurs reprises jusqu'à élimination totale des génines.

### 2.3. Elimination des monosides

- Verser 30 ml d'acétate d'éthyle (densité= 0,898 à 0,901) dans l'ampoule qui contient l'extrait aqueux.
- Laisser décanter, suivre les mêmes démarches que celle citée ci-dessus jusqu'à l'élimination totale des monosides.

### 2.4. Récupération des flavonoïdes

Pour la séparation des flavonoides, ajouter 30ml de butanol a trois reprises à l'extrait aqueux et récupérer la phase alcoolique qui contient les flavonoides.

### 2.5. Evaporation sous vide de butanol

Pour déterminer le rendement en flavonoides des échantillons, nous avons procédé comme suit :

Après évaporation du butanol, on détermine le poids du résidu sec des flavonoides.

- Evaporer le butanol pour l'obtention des résidus des flavonoïdes.
- La température d'évaporation du butanol est de 55°C.

Calcul du poids des résidus des flavonoides

$$M_f = P_2 - P_1$$

Où :

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

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

$P_1$  : poids du ballon vide

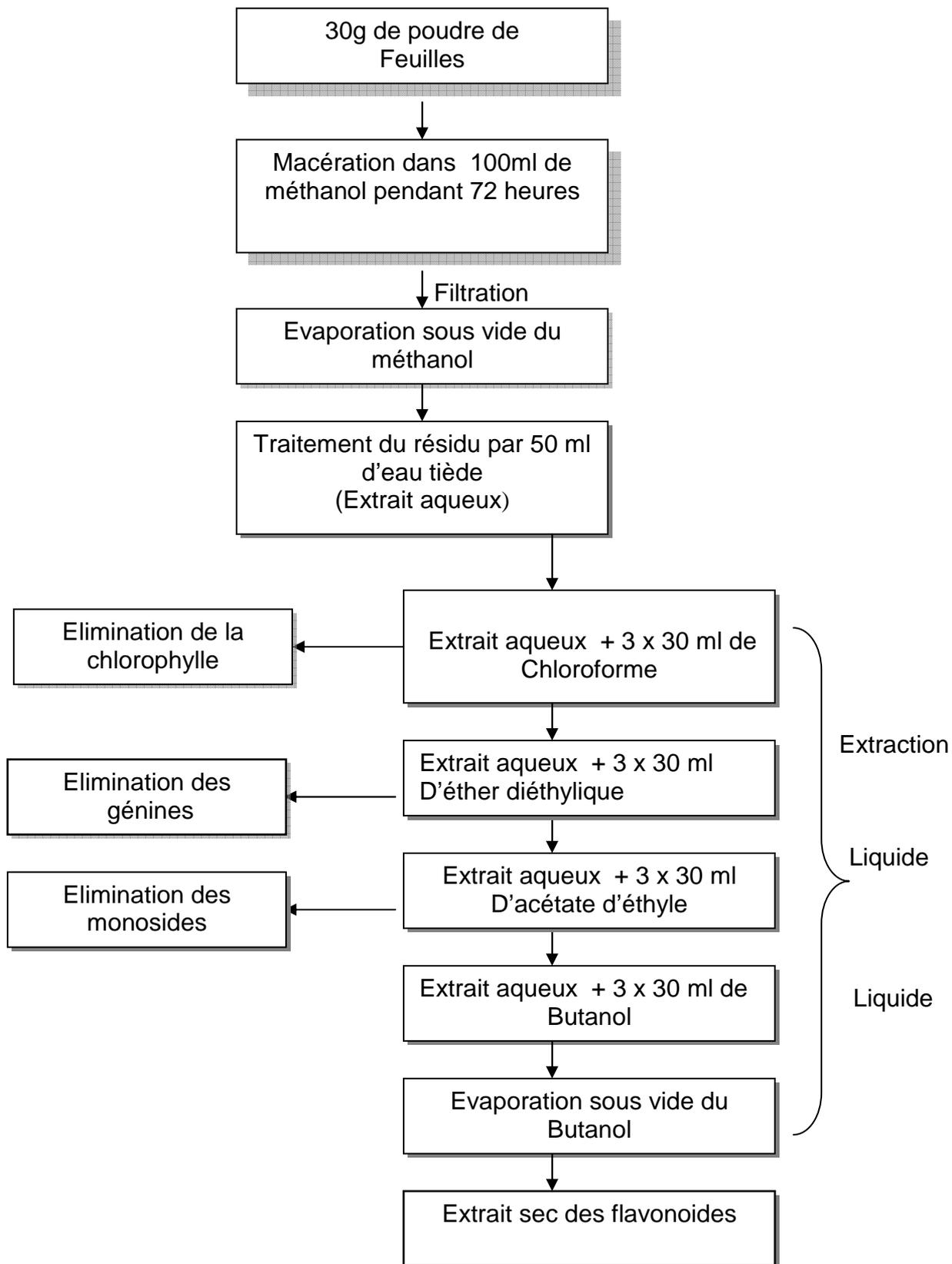


Figure 2.1 : Schéma des différentes étapes d'extraction des flavonoïdes.

## 2.2.4. Détermination du pourcentage des minéraux

### 1. principe

La détermination du pourcentage des minéraux est effectuée selon un procédé chimique dans lequel le composé est chauffé au dessus de son point de fusion. Le but est d'éliminer les constituants carboniques et de garder les éléments minéraux [63].

### 2. Mode opératoire

- Chauffer au rouge un creuset vide de platine pendant 10 min.
- Laisser refroidir dans un dessiccateur.
- Mettre dans le creuset 1g de poudre de feuilles séchées.
- Incinérer au four à moufle à une température de 400°C pendant 5 heures.
- Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser.

### Calcul

Le pourcentage des minéraux est évalué selon l'équation suivante :

$$\% \text{ du résidu} = \frac{(C + R) - C_v}{P} \times 100$$

- (C + R) : creuset + résidu
- C<sub>v</sub> : creuset vide
- P : poids de l'échantillon en gramme

## 2.2.5. Extraction et dosage des glucides

Les glucides sont dosés par la méthode colorimétrique à l'antrone.

### 1. Principe

Les sucres totaux sont dosés par la méthode de DREYOOD (1946) modifiée par SHIENDS et BURNETT (1960). Le principe de la réaction est basé sur la coloration des produits de dégradation des oses neutres par l'acide sulfurique concentré.

Il transforme à chaud les glucides en dérivés sulfuriques qui se colorent en bleu-vert par l'antrone [71].

## 2. Mode opératoire

### 2.1. Préparation de réactif d'anthrone

- 1g d'anthrone est dissout dans 500 ml d'acide sulfurique.
- Le réactif est préparé 4 heures avant le dosage car, il se dégrade au frais.

### 2.2. Préparation de l'échantillon

- 150 mg de la poudre de feuilles séchées de séné sont placés dans un tube à essai.
- Ajouter 5 ml d'éthanol à 80%. Laisser l'extrait 48 heures à température ambiante.
- Après centrifugation, prélever 1ml du surnageant dans une fiole de 25 ml et ajouter 10 ml d'éthanol à 80%

### 2.3. Courbe d'étalonnage

- 10 fioles dont la capacité est de 25 ml sont numérotées de 1 à 10. Dans chacune des fioles nous avons met respectivement de 10 mg à 100 mg de glucose. Ajuster jusqu'à 10 ml avec l'éthanol à 80%.

Nous obtiendrons ainsi 10 fioles avec déférentes concentrations Tableau (2.1).

Tableau 2.1 : préparation de la courbe d'étalonnage.

| Fioles                   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10  |
|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Quantité du glucose (mg) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| Ethanol à 80% (ml)       | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| Réactif d'anthrone       | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |     |

- Les fioles sont portées au bain marie à 92°C pendant 8 min. Une coloration bleu-vert apparaît
- La lecture de la D.O. se fait à une longueur d'onde égale 620 nm.

#### 2.4. Calcul

D'après la loi de Beer Lambert, la DO est proportionnelle à la concentration et suite au tracé de la fonction  $Y = ax + b$  qui est une droite linéaire, elle permet le calcul de la concentration en glucides d'où :

Y : représente la DO

X : représente la concentration en glucides

#### 2.2.6. Extraction des huiles essentielles du séné par entraînement à la vapeur d'eau

**1<sup>ère</sup> étape** : Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Cette méthode est adaptée à l'extraction des huiles essentielles. Elle se base sur le passage de la vapeur d'eau à travers l'échantillon végétal, provoquant l'entraînement de la matière organique volatile, entre autres les huiles essentielles.

Le dispositif utilisé pour l'extraction par entraînement à la vapeur comprend principalement (Appendice D) :

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

**2<sup>ème</sup> étape** : séparation liquide – liquide par ampoule à décanter

Les huiles essentielles récoltées se trouvent dispersées dans l'eau d'extraction. Une deuxième extraction complémentaire visant la séparation des huiles essentielles du solvant aqueux a été menée par l'utilisation d'un solvant « éther diéthylique », sélectionné pour son affinité vis-à-vis des huiles essentielles.

**3<sup>ème</sup> étape** : déshydratation par sulfate de magnésium anhydre.

Après séparation dans une ampoule à décanter, on ajoute le sulfate de magnésium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau, puis on filtre.

**4<sup>ème</sup> étape** : Evaporation de l'éther diéthylique :

La phase obtenue est évaporée à une température de 40 °C par rota- vapeur. Le résidu restant représente l'huile essentielle.

### 1. Evaluation de quelques propriétés organoleptiques de l'huile essentielle

Les huiles essentielles extraites, sont soumises à des tests pour les caractères organoleptiques (aspect, couleur, et odeur).

### 2. Rendement des huiles essentielles

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

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

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

Où :

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

### 3. Analyse des huiles essentielles par CG/SM

L'analyse de l'huile essentielle des deux espèces par couplage CG/MS est réalisée au laboratoire analytique du centre de recherche et de développement (CRD) Boumerdès.

### 3.1. But

C'est la détermination de la composition qualitative des constituants des huiles essentielles.

### 3.2. Principe

Il consiste à séparer les constituants d'un mélange. La spectrométrie de masse nous permet l'identification et la quantification des analytes. Ces derniers résultent de la fragmentation d'une molécule soumise, sous vide, à un faisceau d'électron dont l'énergie peut atteindre quelques dizaines d'électronvolts. Les fragments chargés électriquement sont séparés selon leur masse/charge [72].

### 3.4. Description de l'appareil

Cette technique résulte de l'alliance entre la CPG et la MS. C'est une technique de séparation chromatographique et d'identification.

Ces deux propriétés ont rendu la méthode de la CG/SM la plus utilisée pour l'analyse des mélanges complexes comme les huiles essentielles [73].

#### 3.4.1. Partie Chromatographie Phase Gazeuse (CPG)

L'échantillon analysé est injecté dans le chromatographe à l'aide d'une seringue, puis mélangé au gaz vecteur. Ce dernier classiquement l'hélium, constitue la phase dite « mobile ». Il a pour rôle de véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne capillaire.

La colonne capillaire est située à l'intérieur du four où souvent la programmation de la température varie entre 40 et 350 °C. Les colonnes utilisées en CG/SM, sont dites des colonnes « capillaires ». Elles sont constituées d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est recouverte d'un film chimique nommé la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont alors séparés en fonction de leur polarité. Les différences des propriétés physicochimiques, leur confèrent des vitesses d'élution différentes. Ainsi ils sont donc séparés en fonction du temps de rétention [72].

### 3.4.2. Partie spectrométrie de masse (SM)

Les sources utilisées sont dites à ionisation électronique. Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou facilement volatilisables.

L'analyse par spectrométrie de masse soumet les molécules à une série de tests :

#### 1. L'ionisation

L'ionisation électronique consiste à bombarder les molécules par un faisceau d'électron de haute énergie. L'impact de l'électron est d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^+$ .

#### 2. La séparation

L'analyseur sépare les ions produits en fonction du rapport de masse et charge ( $M/Z$ ). Les analyseurs sont caractérisés par quatre paramètres et qui sont la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapport masse/charge balayé et la transmission [74].

#### 3. La détection

Le détecteur a un double rôle. Il détecte les ions proportionnellement à leur nombre et amplifie le courant correspondant pour le rendre détectable par l'électronique du système [72].

#### 2.5. Conditions opératoires

- Une aliquote de 10 $\mu$ l est injectée dans une colonne capillaire HP-5MS (longueur : 30m, d.i : 0.25mm, épaisseur du film 0.25  $\mu$ m) élué par l'hélium à 0.3 ml/ min avec un rapport Split de 10. La température d'injection est de 250  $^{\circ}$ C).
- La température de la colonne est programmée en isotherme à 60  $^{\circ}$ C pendant 8 min. Au cours de l'analyse, la température est portée à 250 $^{\circ}$ C.
- L'analyse est effectuée sous ionisation à 70 eV (température du filament : 150  $^{\circ}$ C, courant : 600 mA, potentiel PM : 600V).

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

### 2.2.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de l'extrait alcoolique des deux espèces

#### 1. But

Il consiste à déterminer le caractère antimicrobien des huiles essentielles et de l'extrait hydro alcoolique des deux plantes en procédant à des tests sur des souches de microorganismes connues.

#### 2. Les huiles essentielles utilisées

Les tests sont réalisés avec des huiles essentielles récupérées lors de l'extraction des plantes de *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*.

Nous avons préparé une solution contenant 0.2 ml d'huile essentielle diluée dans 2 ml de merystate d'isopropyl (solvant apolaire inerte).

Nous rappelons que ces huiles essentielles ont été conservées au frais, dans des flacons en verre opaque, hermétiquement fermés.

#### 3. l'extrait alcoolique utilisé

La poudre de chacune des plantes macère dans 20 ml d'éthanol à 96% pendant 72 heures. L'extrait filtré est concentré puis dilué dans l'éthanol à 40%. Deux solutions de 1 et 2 g de poudre par 20 ml d'éthanol ont été préparées.

#### 4. Les souches utilisées

Pour mettre en évidence le caractère antimicrobien des huiles essentielles et des extraits ethanoliques nous avons utilisé:

- 5 souches bactériennes et 1 levure sont récupérées du laboratoire de microbiologie de l'unité antibiotical SAIDAL. (tableau 2.2)

- 4 souches bactériennes sont récupérées du laboratoire d'hygiène de Blida. Ces dernières ont été isolées et identifiées par le laboratoire.

- 4 souches d'Agrobactérium sont récupérées du laboratoire de microbiologie de département d'agronomie.

Tableau 2.2 : Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

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

- : souches non référenciées

#### 4.1. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des bactéries de forme arrondie. Elles sont groupées en grappe de raisin, d'où le nom de Staphulé. Elles sont Gram positif, facultativement anaérobies. Elles se développent généralement sur les muqueuses nasales, la peau, dans les appareils gastro intestinal et urinaire des animaux à sang chaud. Contrairement aux autres Staphylocoques communs, *Staphylococcus aureus* est le pathogène le plus important chez l'homme. Il cause des abcès, des infections de blessures, des pneumonies, des empoisonnements alimentaires et d'autres maladies [75].

#### 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bactéries pathogènes des animaux et des végétaux. Ce sont bacilles incurvés mobiles grâce à un flagelle polaire, Gram négatif, strictement aérobies. Elles sont répandues dans le sol et dans les eaux douces et salées. Elles infectent les personnes les moins résistantes, envahissent les tissus brûlés et causent des infections des voies urinaires [75].

#### 4.3. *Escherichia Coli*

Ce sont des bacilles droits, Gram négatif, mobiles, aérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates. Ces bactéries font partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. Elles représentent plus de 80% de la microflore aérobie. Même si la majorité des souches sont commensales banales, quelques unes sont toutefois à l'origine de pathologies intestinales ou extra intestinales et peuvent provoquer des colites hémorragiques [76].

#### 4.4. *Bacillus subtilis*

Ce sont des bacilles gram positif, présents dans le sol. Ils résistent aux conditions extrêmes en formant des spores. Ces bactéries ne sont pas considérées comme pathogènes pour l'homme, mais peuvent contaminer des aliments et exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire [77].

#### 4.5. *Candida albicans*

Ce sont des levures ovales bourgeonnantes qui produisent des pseudos mycéliums en culture. Elles sont présentes sur la peau, dans la bouche et l'intestin. Elles peuvent devenir dangereuses suite à un changement de l'environnement. Elles

attaquent le tube digestif et la vessie. La dissémination hématogène peut entraîner des lésions au niveau des reins, de la rate, des poumons et du foie [76].

#### 4.6. *Klebsiela pneumoniae*

Ce sont des bacilles Gram négatif de la famille des entérobactéries. Elles sont isolées par paires en courtes chaînes encapsulées, non mobiles. Elles se trouvent

notamment dans le sol et dans les eaux. Elles peuvent se comporter en parasites et être éventuellement pathogènes chez l'homme et chez d'autres animaux [78].

#### 4.7. *Proteus mirabilis*

Ce sont des bactéries mobiles, Gram négatif et pathogènes. Elles se trouvent dans le sol, les eaux polluées et dans l'intestin des mammifères [79].

#### 4.8. *Agrobacterium*

Ce sont des bacilles, Gram négatif. Le genre *Agrobacterium* est placé dans la famille des Rhizobiaceae mais diffère de *Rhizobium* car il ne fixe pas l'azote moléculaire. L'*Agrobacterium* envahit les collets, les racines et les tiges de nombreuses plantes. Ils transforment les cellules végétales en cellules tumorales dont la prolifération est autonome [80].

### 5. Principe de l'activité antimicrobienne

Il consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact des huiles essentielles et de l'extrait alcoolique des feuilles, par la méthode de diffusion sur gélose.

Des disques absorbants stériles de 9 mm imprégnés d'huile essentielle, sont déposés sur une gélose inoculée de souches. La diffusion des huiles essentielles dans la gélose permet d'inhiber la croissance des germes tout au tour du disque (Zone d'inhibition). Elle est représentée par une zone claire, obtenue après incubation. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches.

Cette méthode est validée par le laboratoire de microbiologie de SAIDAL et son principe est tiré du titrage des antibiotiques [63].

### 6. Mode opératoire

#### 6.1. Préparation des boîtes de Pétri

- Les deux milieux de culture, la gélose nutritif (pour les bactéries) et Sabouraud (pour la levure) sont fondus dans un bain-marie à 95 °C.

- Ensuite on verse aseptiquement 15ml de chaque milieu dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre.
- Laisser refroidir et solidifier les milieux de culture dans les boites de Pétri sur la paillasse à température ambiante.

### 6.2. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures. Des suspensions troubles sont réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien distinctes qu'on introduit dans 5ml d'eau physiologique stérile, puis nous agitons au vortex.

### 6.3. Ensemencement

A l'aide d'un écouvillon on prélève une quantité de la suspension de levure ou de bactéries. On ensemence le milieu de culture.

### 6.4. Dépôt des disques

- Imbiber un disque stérile d'huile essentielle ou d'extrait ethanologique jusqu'à imprégnation totale.
- Le disque est déposé sur la surface de la gélose.
- Nous laissons diffuser sur la paillasse pendant 30minutes.
- Les boites de pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 heures pour la levu re.

## CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Identification et séparation des sennosides

#### 3.1.1. Analyse des sennosides par chromatographie couche mince

Le tableau (3.1) montre les résultats obtenus par CCM. Les chromatogrammes des deux extraits alcooliques de *C. acutifolia* et *C. obovata* sont représentés dans les figures ( 3.1) et (3.2).

Tableau 3.1 : Représentation des Rf obtenus par CCM des deux espèces de séné algérien.

| Plante              | Spots | di (en Cm) | Rf obtenu (en %) | Rf obtenu (en %) Karel, 1972 [65]. | nom de la molécule d'après la pharmacopée [63] |
|---------------------|-------|------------|------------------|------------------------------------|--|
| <i>C.acutifolia</i> | 1     | 2.5        | 16.66            | 17                                 | Sénnoside B                                    |
|                     | 2     | 5.1        | 34               | 30                                 | Sénnoside A                                    |
|                     | 3     | 6.2        | 41.33            | 44                                 | Sénnoside D                                    |
|                     | 4     | 9.2        | 61.33            | 58                                 | Réinine-8-glucose                              |
|                     | 5     | 11         | 73.33            | 68                                 | Sénnoside C                                    |
| <i>C.obovata</i>    | 1     | 2.7        | 18               | 17                                 | Sénnoside B                                    |
|                     | 2     | 5.4        | 36               | 30                                 | Sénnoside A                                    |
|                     | 3     | 6.5        | 43.33            | 44                                 | Sénnoside D                                    |
|                     | 4     | 9.4        | 62.66            | 58                                 | Réinine-8-glucose                              |
|                     | 5     | 11.2       | 74.66            | 68                                 | Sénnoside C                                    |

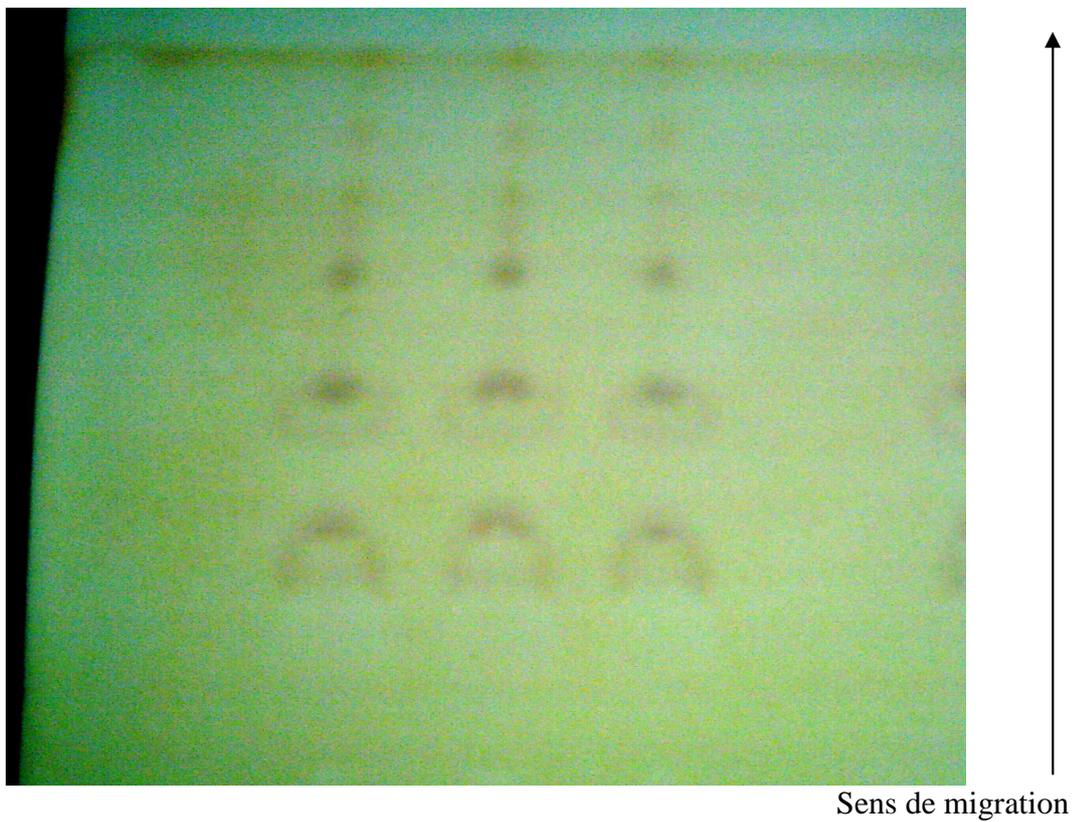


Figure 3.1: Chromatogramme des sennosides de *C. obovata*.

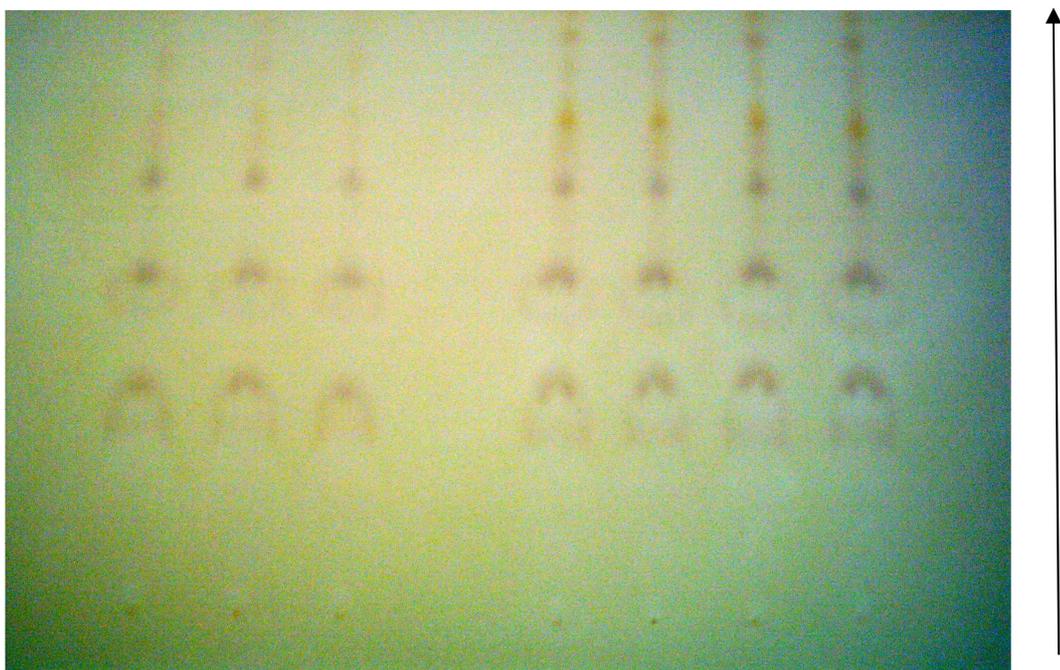


Figure 3. 2 : Chromatogramme des sennosides de *C. acutifolia*.

D'après les résultats reportés dans le tableau (3.1), nous constatons que les Rf obtenus par CCM des deux espèces sont proches de ceux obtenus par Karel, 1972 . Leurs résultats ont été pris comme référence dans la suite de notre travail.

Selon Paris et Myose 1981[37], le chromatogramme doit présenter :

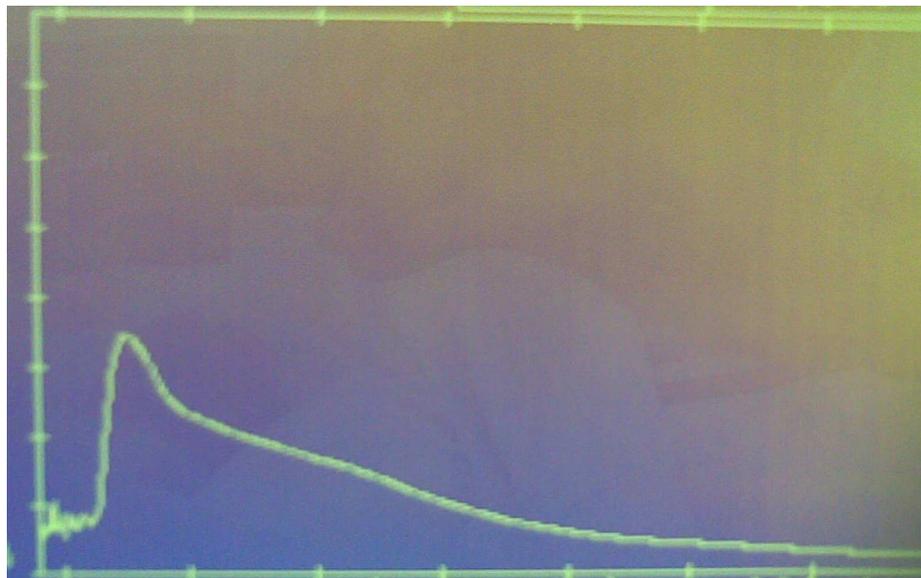
- 2 taches de couleur brun pourpre, l'une de Rf 0.1- 0.2 et qui correspond au sennoside B et l'autre tache de Rf 0.3- 0.35 et correspond au sennoside A .
- 2 autre taches brun pourpre (sennosides C et D). Entre ces sennosides, nous observons une tache rouge qui correspond à la Réine-8-glucoside et dont le Rf est de 0.5-0.7.

Les cinq spots identifiés correspondent, par ordre croissant des Rf, respectivement aux sennosides B, sennoside A, sennoside D, Réine-8-glucose et sennoside C [63].

Le principe actif des deux espèce du séné algérien est ainsi composé de cinq molécules actives de sennosides.

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

La séparation réalisée par chromatographie sur colonne conduit à l'apparition d'une seule fraction déterminée à une longueur d'onde 356 nm (fig.3.3). Elle correspond aux sennosides B. celui-ci représente le composé majoritaire. La lecture des absorbances aux longueurs d'ondes correspondant aux autres fractions en sennoside souligne l'absence complète de ces fractions. Cela signifie l'impossibilité de la séparation des sennosides A. C. D et la réine-8-glucose par chromatographie sur colonne.



λ : longueur d'onde (nm)

Figure 3.3 : Spectre d'absorption de sennoside B.

### 3.3. Analyse par HPLC du sennoside B séparé par colonne

Les résultats de l'analyse du sennoside B séparé par colonne sont portés figures (3.4), (3.5) et (3.6).

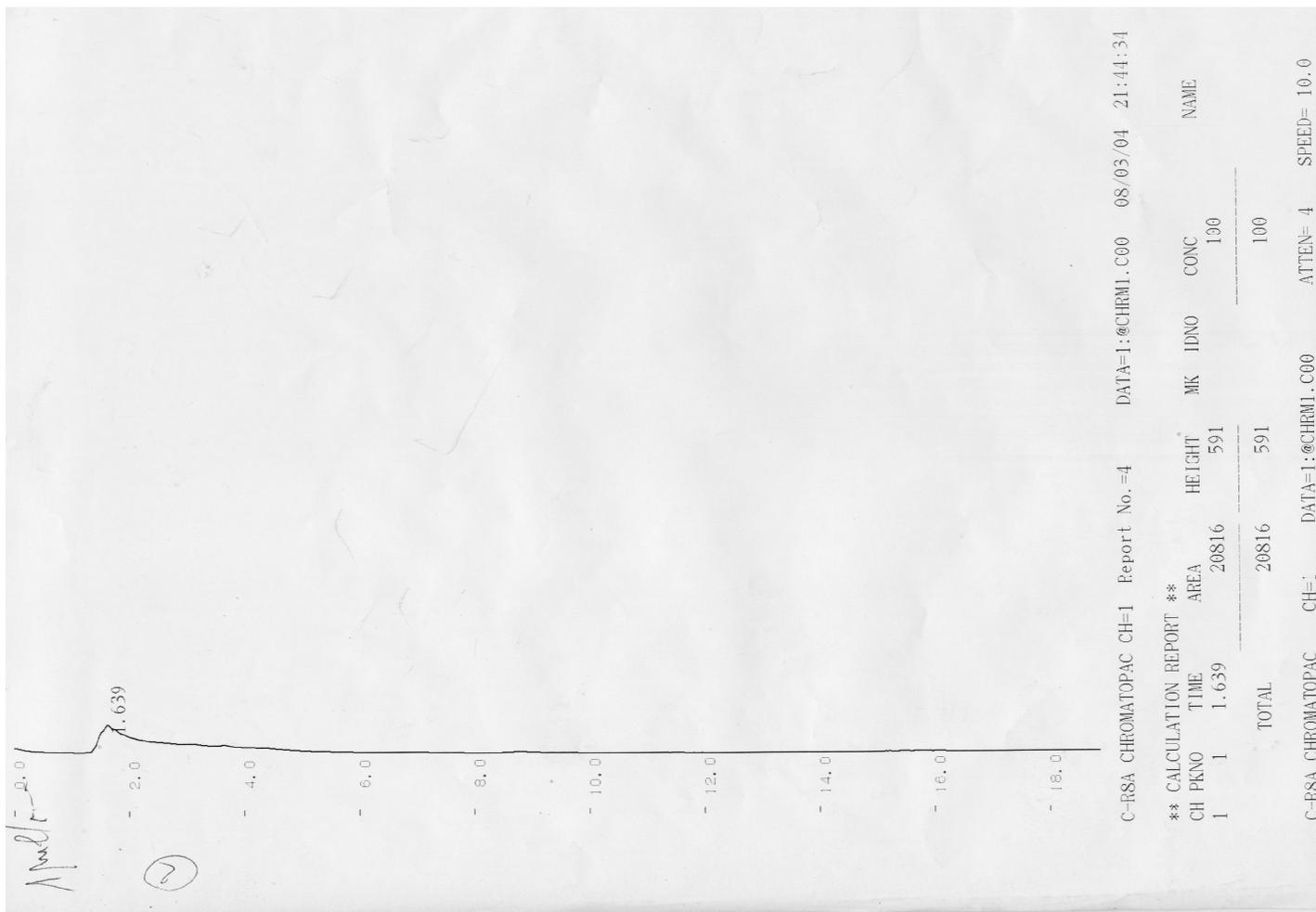


Figure 3.4 : Chromatogramme de sennoside B chez *C. acutifolia* à 270 nm.

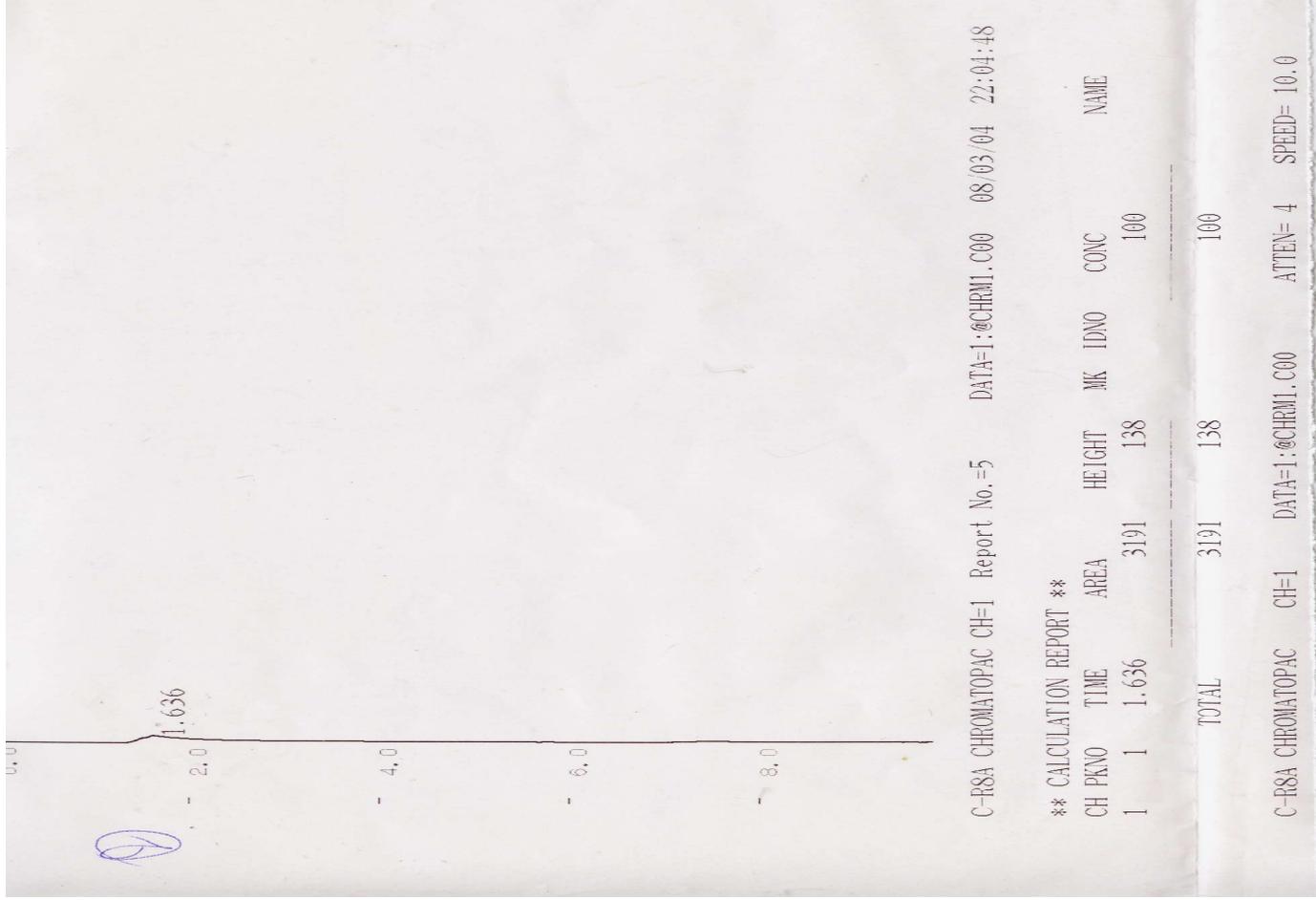


Figure 3.5 : Chromatogramme de sennoside B chez *C. obovata* à 270nm.

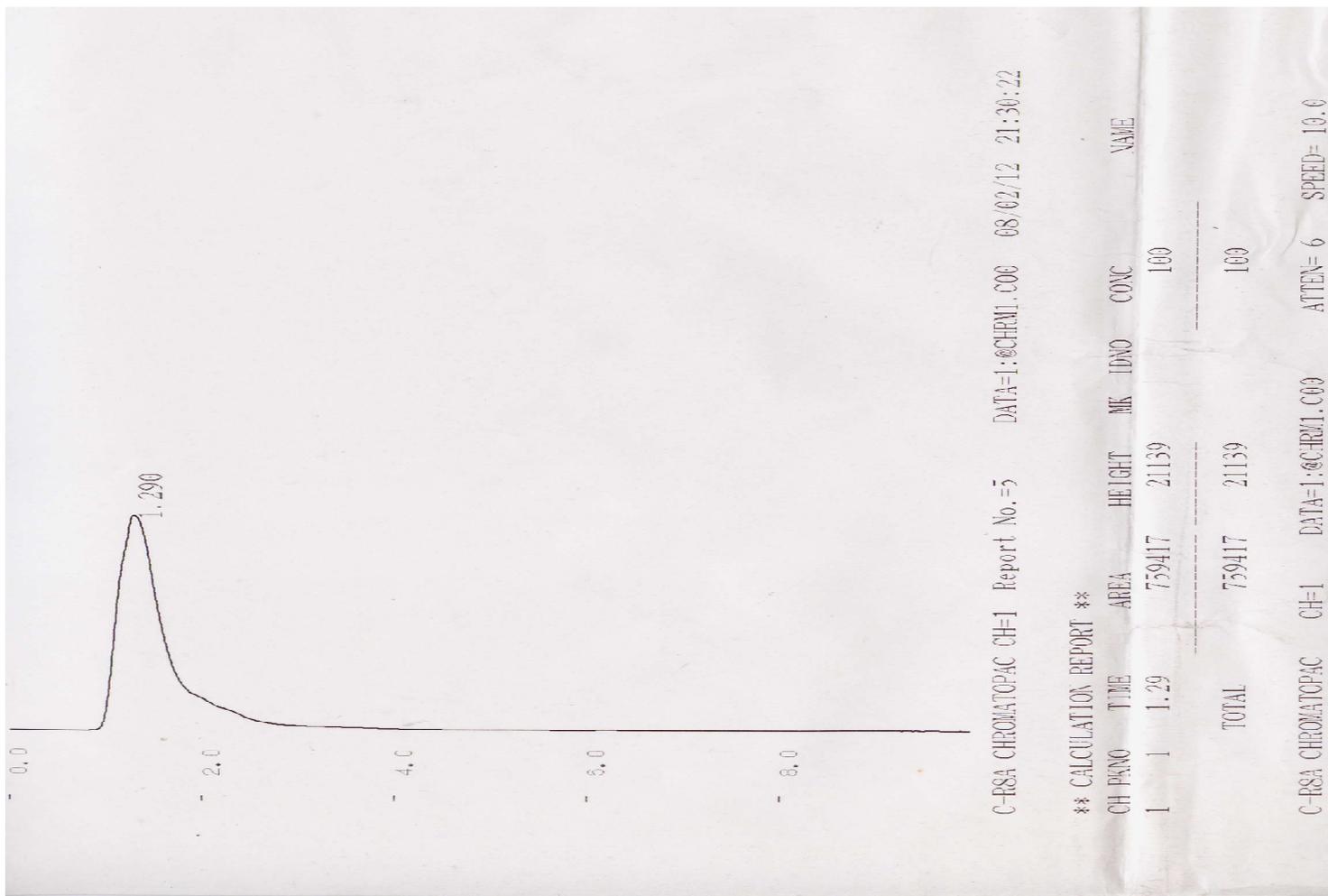


Figure 3.6 : Chromatogramme de sennoside B chez *C. acutifolia* à 356 nm.

L'étude des chromatogrammes des sennosides B issus de *C. acutifolia* et *C. obovata* par HPLC nous permet de constater les points suivants :

- Les chromatogrammes présentent, pour les deux espèces, un seul pic. Ils présentent des temps de rétention proches. En effet, il est de 1.636 pour *C. obovata* et de 1.639 pour *C. acutifolia*. Ces résultats indiquent que la fraction analysée est pure et qu'elle contient seulement un seul composé.
- La seconde analyse du sennoside B par HPLC à la longueur d'onde 356 nm correspond à la longueur d'onde spécifique à l'absorption des sennosides B. Elle donne un seul pic. Ce résultat indique que le composé est unique. Ce dernier présente une absorbance à 356 nm. Il serait éventuellement le sennoside B.

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

Après séparation des molécules actives du séné par HPLC, nous avons obtenus les chromatogrammes illustrés dans les figures (3.7), (3.8) et (3.9).

Les chromatogrammes de *C. acutifolia* et *C. obovata* ont été comparés à un chromatogramme correspondant au Senokot, médicament fabriqué à base de séné contenant des sennosides. Cette opération nous permettra de mettre en évidence la présence ou non des sennosides dans l'extrait éthanolique de séné Algérien.

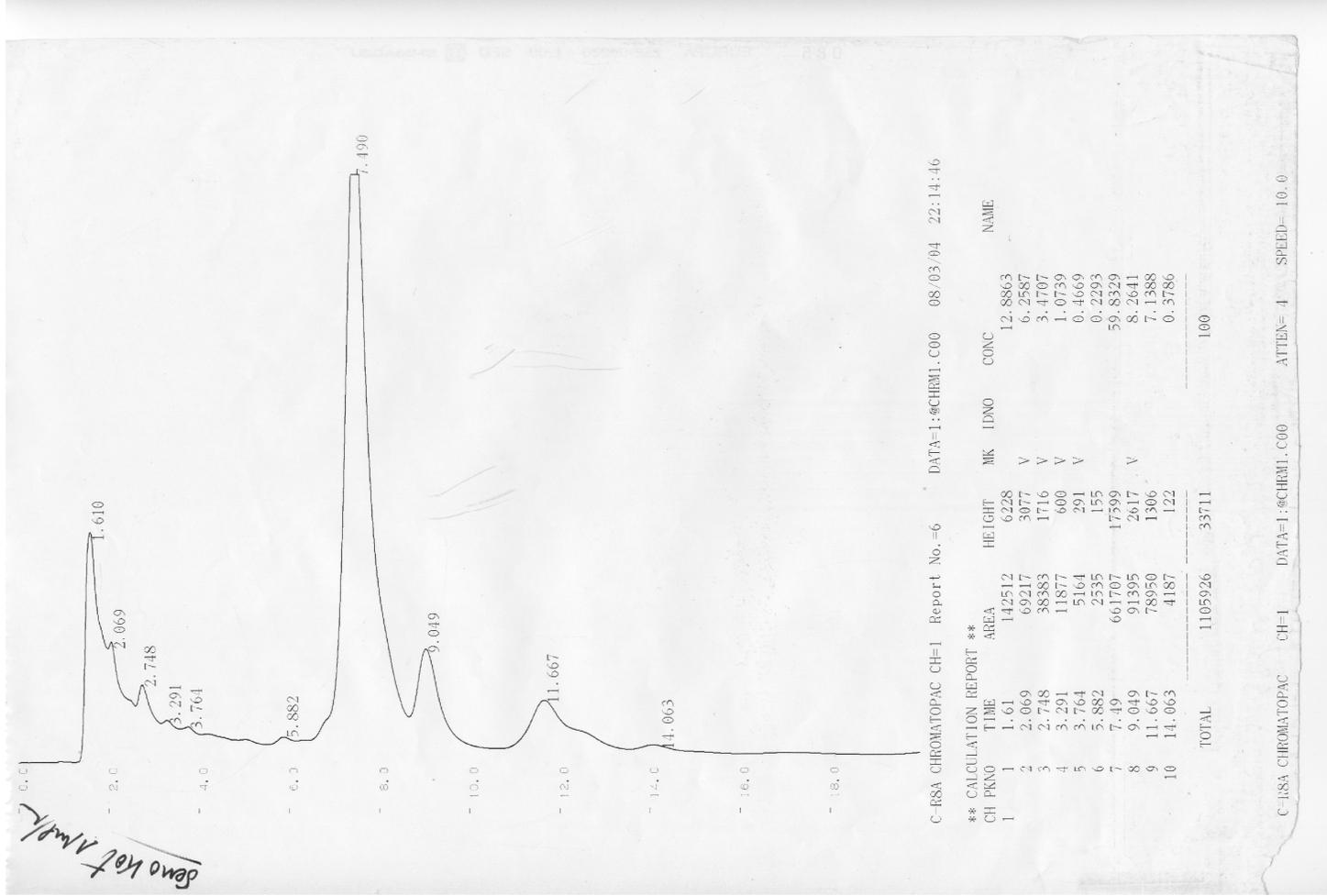


Figure 3.7 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique du senokot.

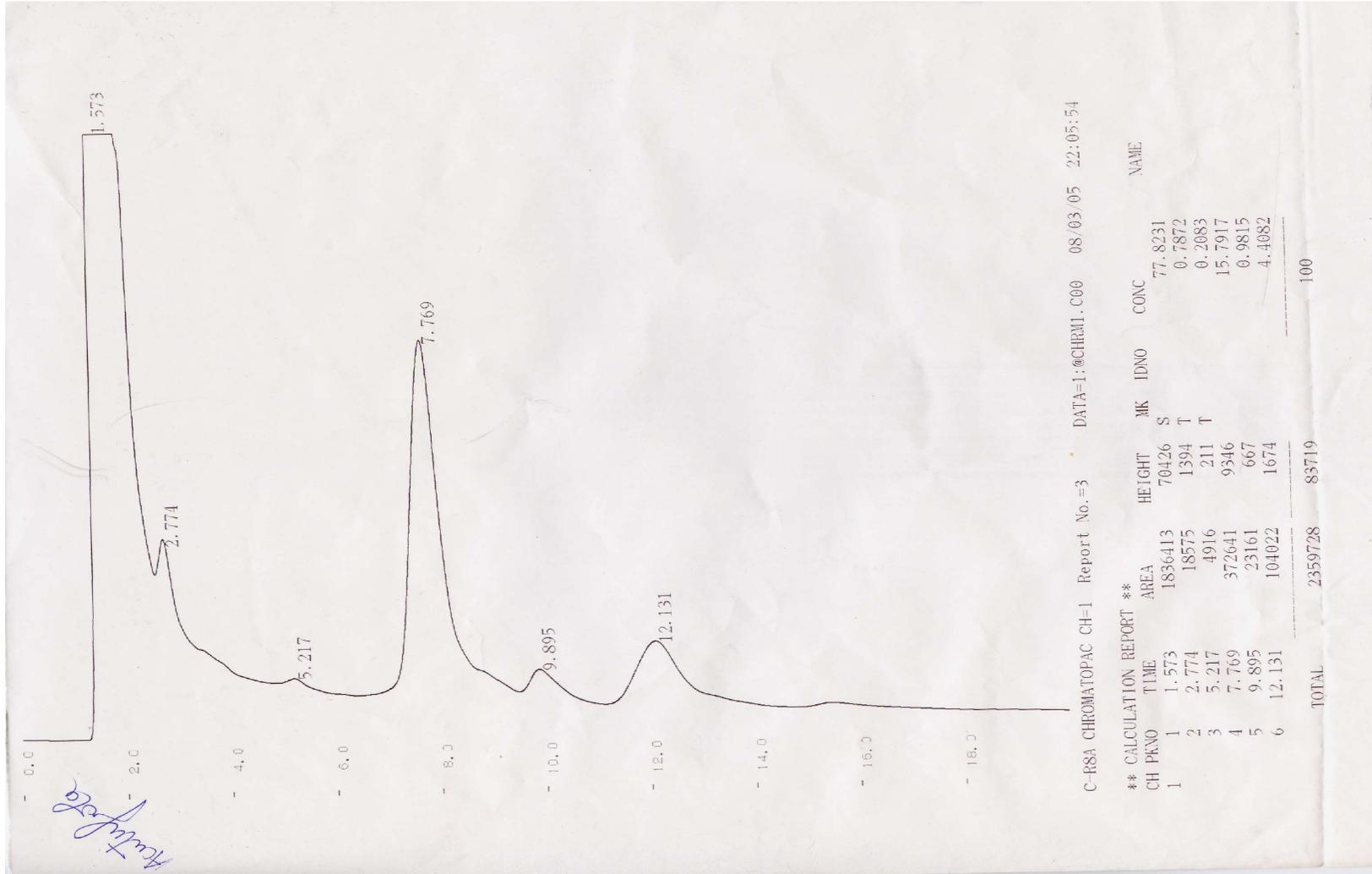


Figure 3.8 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia*.

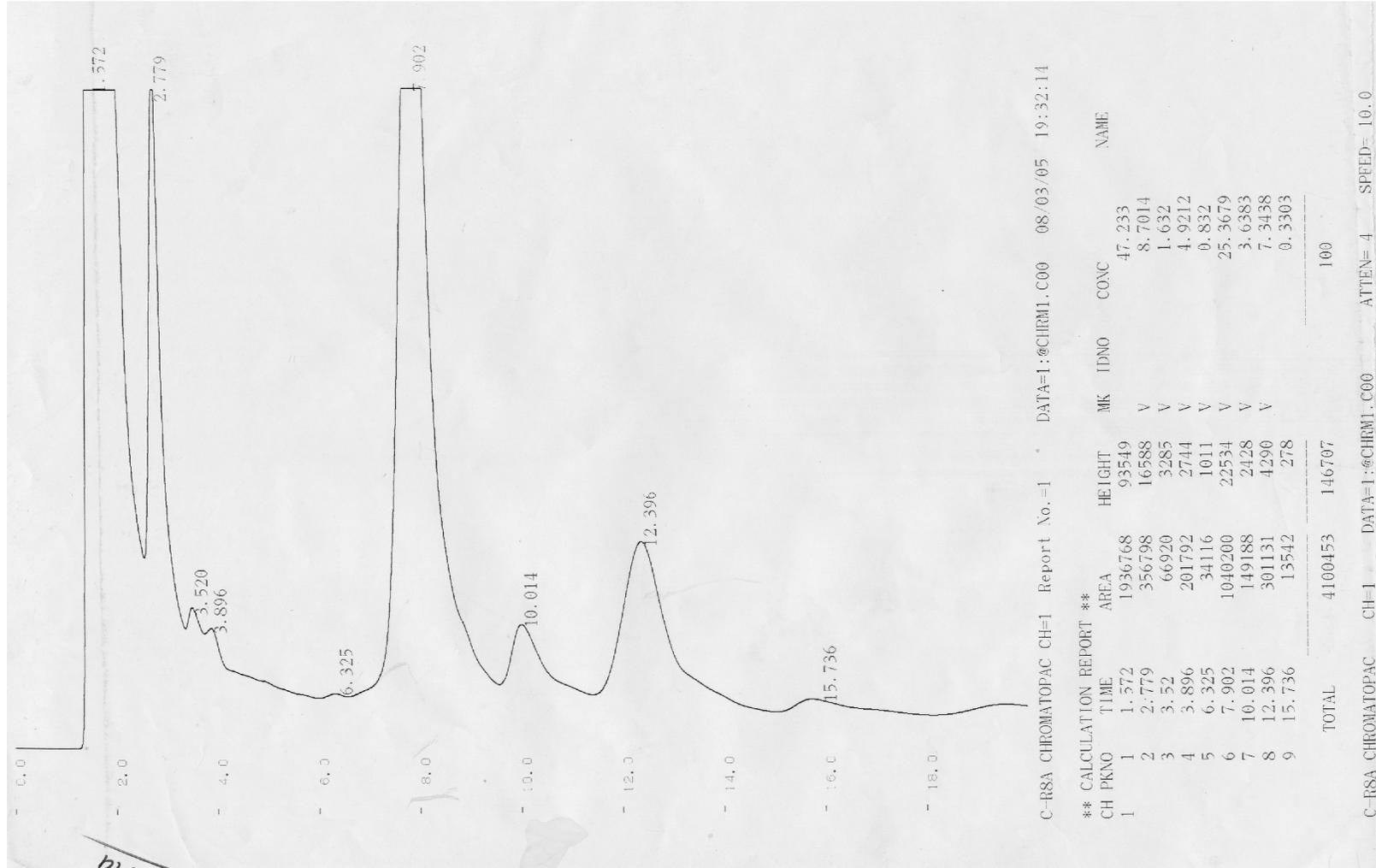


Figure 3.9 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *C. obovata*.

### 1. Analyse comparative entre les deux espèces du séné

La comparaison des résultats de l'analyse par HPLC des deux extraits éthanoliques issus respectivement de *C. acutifolia* et *C. obovata*, nous permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

Les chromatogrammes des deux espèces de séné algérien présentent certaines similitudes. En effet, la présence de 5 pics identiques au niveau des deux chromatogrammes des deux échantillons analysés correspondent au temps de rétention : (1.57 - 1.57), (2.77 - 2.77), (7.90 – 7.76), (10.04 – 9.89), (12.39 – 12.13).

Le chromatogramme de *C. obovata* est formé de 9 pics correspondant chacun à un composé.

Le chromatogramme de *C. acutifolia* est formé de 6 pics correspondant à six composés.

### 2. Analyse comparative du chromatogramme du témoin et des deux échantillons du séné algérien

La comparaison des trois chromatogrammes issus de l'analyse par HPLC de l'étalon, de *C. acutifolia* et de *C. obovata* montre que :

- Le nombre de composés chimiques présents chez *C. obovata* est plus proche de celui de l'étalon. En effet, le chromatogramme de *C. obovata* présente 9 composés en comparaison avec celui de l'étalon qui en contient 10 composés.

Le chromatogramme de *C. obovata* présente 8 pics identiques au chromatogramme de l'étalon. Ils correspondent aux temps de rétention : (1.57 – 1.61), (2.77-2.74), (3.52 -3.29), (3.789 – 3.76), (6.32 – 5.88),( 7.90 – 7.49) et (11.66 – 12.39).

- Chez *C. acutifolia*, le nombre de composés chimiques présents est 6.

Le chromatogramme de *C. acutifolia* présente 5 pics identiques au chromatogramme de l'étalon. Ils correspondent au temps de rétention : (1.57 – 1.61), (2.77- 2.74), (5.21 – 5.88), (7.76 – 7.49) et (12.13 – 11.66).

Cette analyse comparative nous permet d'affirmer que les extraits éthanoliques provenant de *C. acutifolia* et *C. obovata*, contiennent des sennosides.

### 3.2. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-visible

Les résultats du dosage des sennosides des deux espèces de séné sont représentés dans le tableau (3.2).

Tableau 3.2 : Résultats du dosage des sennosides.

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

\* : quantité des sennosides en mg par 100mg de poudre de la plante

\*\* : pourcentage de chaque sennoside pour la quantité totale des sennosides

D'après les données du tableau 3.2, nous constatons que la molécule principale et la plus abondante dans le séné est représentée par les sennosides B. Ainsi, ils ont une proportion de 74.04 % pour *C. acutifolia* et 74.4% pour *C. obovata*. Nous remarquons aussi que la quantité en sennosides de *C. acutifolia* et *C. obovata* est

respectivement de 5.28 et 4.74 mg. Nos résultats se rapprochent de ceux de Evans, 1998 qui rapportent des teneurs en sennosides variant de 2.5 à 8% [44].

### 3.3. Résultat de l'analyse des flavonoides

#### 3.3.1. Détermination du rendement des flavonoides

Les teneurs en flavonoides des deux espèces sont les suivantes:

##### **- Pour *C. acutifolia***

Mmv = 30g

Mf = 1.335g

Donc  $R_F = 4.45\%$

##### **- Pour *C. obovata***

Mmv = 10.50g

Mf = 0.77g

Donc  $R_F = 7.33\%$

Avec :

$R_F$  : rendement des flavonoides

Mf : masse de flavonoides en grammes

Mmv : masse de la matière végétale utilisée en grammes

Nous remarquons que le rendement des flavonoides de *C. obovata* est important en comparaison avec celui de *C. acutifolia*.

#### 3.3.2. Analyse des flavonoides par spectrophotométrie UV- visible

L'analyse des flavonoides par UV-vis a été effectuée sur des solutions homogènes obtenues par dilution de nos concrètes dans le méthanol.

Les spectres d'absorption des flavonoides sont représentés dans les figures (3.10) et (3.11)

La longueur d'onde d'absorption des flavonoides ainsi que leur absorbance sont illustrés dans le tableau (3.3).

Tableau 3.3: Longueurs d'ondes et absorbance des flavonoïdes de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

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

D'après ces résultats nous constatons que les valeurs de la longueur d'onde des flavonoides des deux espèces sont presque identiques. Il s'agirait éventuellement d'un même produit. Cette analyse peut renseigner sur le type de molécules, sachant que les longueurs d'ondes 278 et 283 nm correspondent à l'absorbance des noyaux aromatiques.

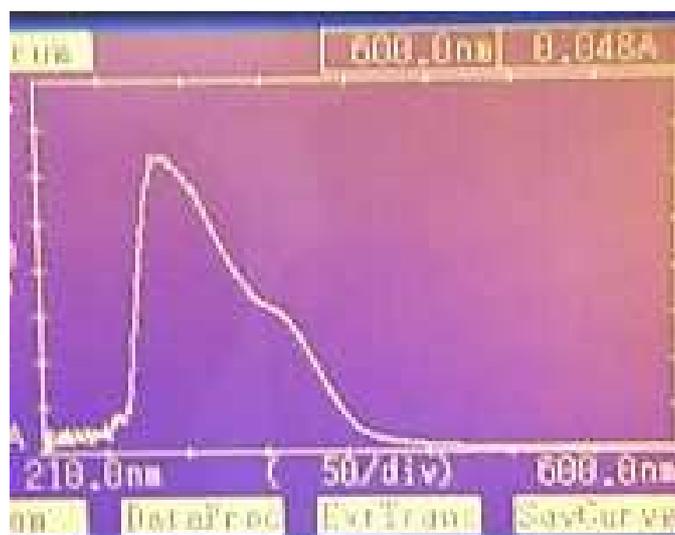


Figure 3.10 : Spectre d'absorption des flavonoïdes de *C. obovata*.

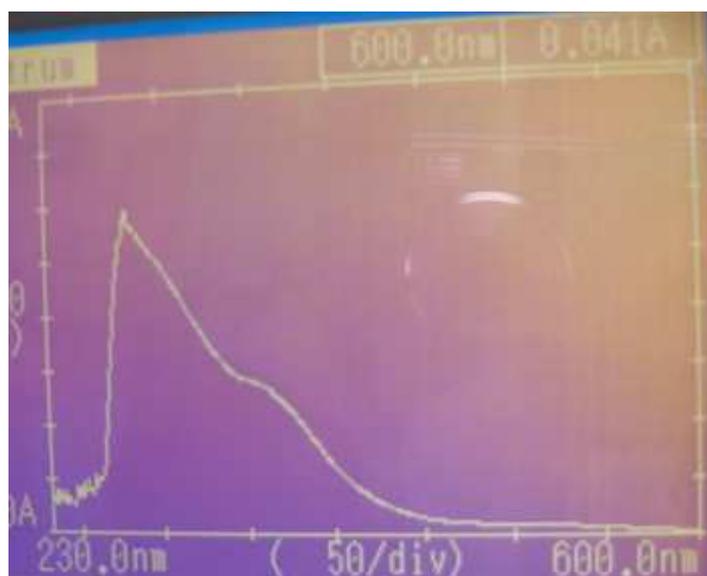


Figure 3.11: Spectre d'absorption des flavonoides de *C. acutifolia*.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus confirment l'existence des flavonoides au niveau du séné algérien. Ces mêmes résultats ont été observés chez d'autres espèces telles que *C. italica* de l'Égypte où 10 flavonoides ont été isolés [81] et chez *C. alata* de l'Inde où deux glycosides flavoniques ont été isolés [82].

#### 3.4. Pourcentage des minéraux

Les résultats du pourcentage des minéraux obtenus pour les deux espèces de séné sont présentés dans le tableau (3.4).

Tableau 3.4: Pourcentage en minéraux de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

| Plante               | Minéraux (%) |
|----------------------|--------------|
| <i>C. acutifolia</i> | 11.85        |
| <i>C. obovata</i>    | 12.72        |

Les résultats du pourcentage en minéraux de *C. acutifolia* et *C. obovata* sont respectivement de 11.85% et 12.72%. Ces valeurs sont proches des résultats

déterminés par la Pharmacopée Européenne (2005) qui prévoit des valeurs comprise entre 10 et 12% [63].

### 3.5. Teneurs en glucides solubles

La courbe d'étalonnage (fig.3.12) a été déterminée en fonction de la variation des concentrations en glucose et des absorbances correspondantes, tableau (3.5).

Tableau 3.5 : Absorbances des différentes concentrations en glucose.

|                                     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Numéro de tubes                     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| Concentration de glucose (mg/ 10ml) | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    | 60    | 70    | 80    | 90    | 100   |
| Absorbances                         | 0.387 | 0.502 | 0.983 | 1.177 | 1.502 | 1.852 | 2.198 | 2.537 | 2.910 | 3.312 |

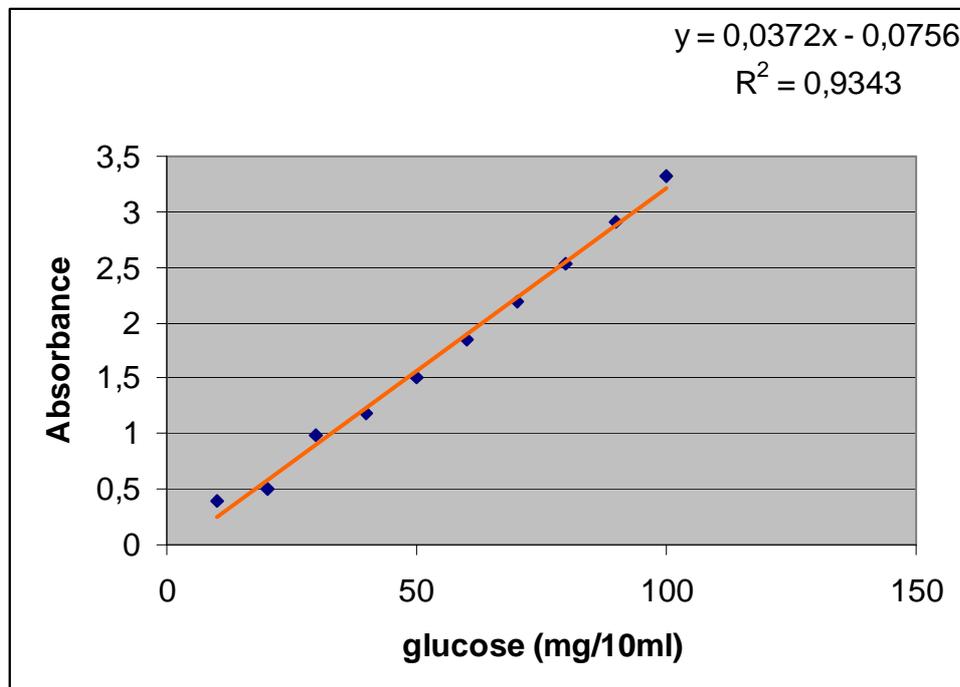


Figure 3.12 : Courbe d'étalonnage des glucides.

L'équation de la courbe d'étalonnage,  $Y = 0.0372X - 0.0756$ , nous a permis de déterminer la valeur de la concentration en glucides des deux plantes.

Où :

X : Concentration en glucides

Y : Absorbance.

La préparation des échantillons pour *C. acutifolia* et *C. obovata* pour mesurer l'absorbance et la concentration en glucides est réalisée dans les mêmes conditions que celles des étalons. Les résultats sont portés dans tableau (3.6).

Tableau 3.6 : Quantité en glucides solubles de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

| Plantes              | Absorbance | Q de glucide* |
|----------------------|------------|---------------|
| <i>C. acutifolia</i> | 0.622      | 62.50         |
| <i>C. obovata</i>    | 0.557      | 56.68         |

\* : quantité des glucides en mg par 100mg de poudre de la plante

La quantité en glucides dans 100mg de la poudre de *C. acutifolia* et *C. obovata* sont respectivement de 62.50 et 56.68 mg.

Nos résultats sont proches de ceux observés par Ukhun et Ifebigh (1988) qui ont travaillé sur le séné de Nigeria. Ce dernier contient 60 % de glucides solubles [83].

### 3.6. Résultats de l'analyse des huiles essentielles

#### 3.6.1. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata* sont présentés dans le tableau (3.7)

Tableau 3.7 : Les caractères organoleptiques des huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

| Huiles essentielles                       | Couleur        | Aspect  | Odeur                              |
|---|----------------|---------|------------------------------------|
| Huile essentielle de <i>C. acutifolia</i> | Jaune verdâtre | Liquide | Odeur rappelant celle des feuilles |
| Huile essentielle de <i>C. obovata</i>    | Jaune verdâtre | Liquide | Odeur rappelant celle des feuilles |

Vu la non disponibilité d'information concernant les huiles essentielles des plantes étudiées dans les normes AFNOR, nous n'avons pas pu comparer nos résultats.

### 3.6.2. Détermination du rendement des huiles essentielles

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, a duré six heures pour chaque plante afin de récupérer le maximum d'huiles essentielles.

#### **- Pour *C. acutifolia***

Mmv = 195g

Mh = 0.72g

Donc  $R_{HE} = 0.36 \%$

#### **- Pour *C. obovata***

Mmv = 250g

Mh = 0.65

Donc  $R_{HE} = 0.26 \%$

$R_{HE}$  : rendement en huile essentielle

Mh : masse de huile essentielle en grammes

Mmv : masse de la matière végétale utilisée en grammes

Nous remarquons que le rendement des huiles essentielles de *C. obovata* est moins important que celui de *C. acutifolia*.

### 3.6.3. Analyse et identification des huiles essentielles par CG/SM

L'analyse des huiles essentielles de *C. acutifolia* et de *C. obovata*, par CG/SM, nous a permis d'aboutir aux chromatogrammes représentés dans les figures (3.13) et (3.14).

- Le chromatogramme, de *C. acutifolia* présente 12 pics. Dont 6 sont majoritaires.
- Le chromatogramme, de *C. obovata* présente 09 pics. Dont 4 sont majoritaires

L'ensemble des pics majoritaires ont été soumis à une identification par spectrométrie de masse. figure (3.15) – (3.28).

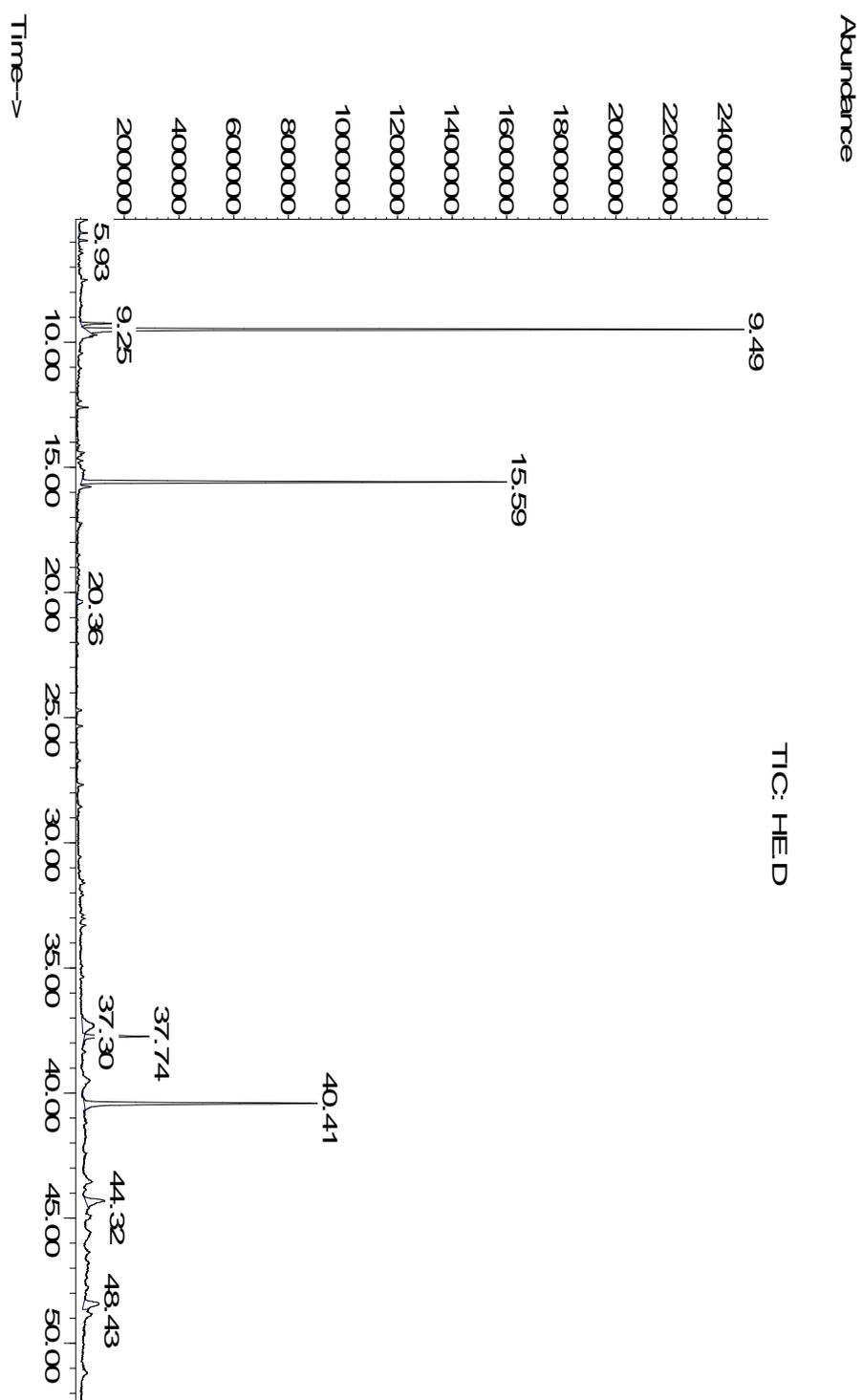


Figure 3.13 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. obovata*

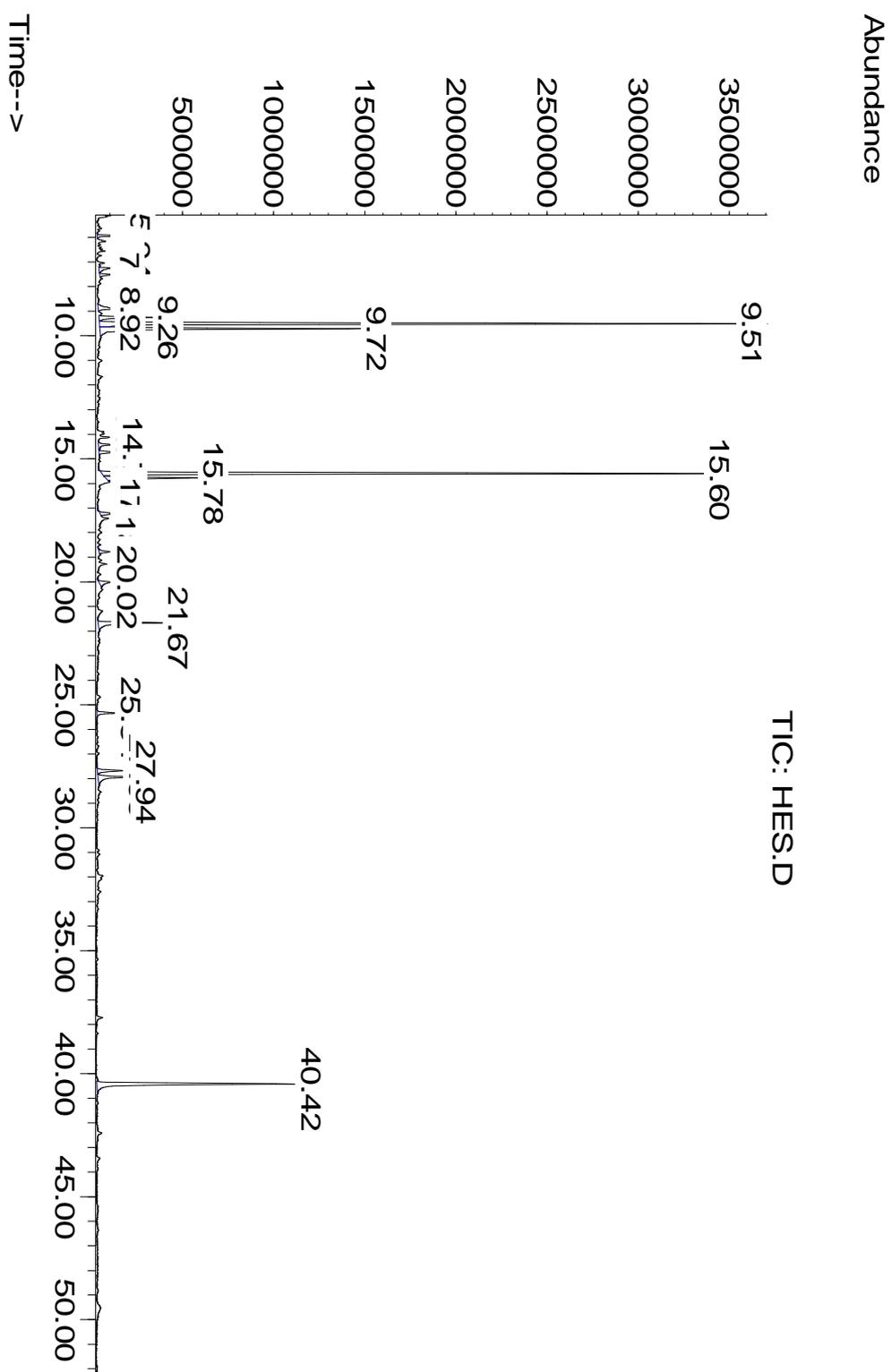


Figure 3.14 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. acutifolia*

1. Pour *C. obovata* : nous notons la présence du Carvacrol et de son isomère le thymol à des teneurs respectives de, 58.02 % et 6.4 %

- Un second composé majoritaire est retrouvé à une teneur de 20.98 %, le Diisooctyl phthalate (tableau 3.8).

- Les autres composés non identifiés sont présentés à un taux inférieur à 3%.

2. Pour *C. acutifolia* nous notons la présence des même composés avec des teneurs différentes tel que :

- Le carvacrol et le thymol avec des teneur respectives de 43.08 % et 4.53 %

- Le Diisooctyl phthalate avec 13.60 % (tableau 3.9).

A la lumière de ces résultats nous pouvons déduire que les huiles essentielles des deux espèces sont constituées essentiellement de dérivés phénoliques.

Elles présentent une composition chimique similaire avec des teneurs différentes notamment pour le carvacrol. Ce dernier représente un taux de 52.02 % pour *C. obovata* et un taux de 43.08 % pour *C. acutifolia*.

Cependant chez *C. acutifolia* nous remarquons la présence de trois composés (le Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl avec 4.98 %, le Dihydroactinidiolide avec 7.25 % et le p-Vinylguaiacol avec 18.14 %). Ces derniers ne sont pas présents chez *C. obovata*. Néanmoins le p-Cresol, 2,2'-methylenebis [6-tert-butyl) est présent seulement chez *C. obovata*.

- Le pic correspondant au temps de rétention 15.60 mn est majoritaire dans les deux chromatogrammes. Après analyse de son spectre de masse , il n'est autre que le Butyl hydroxytoluene, composé utilisé comme stabilisateur du solvant par lequel a été faite l'extraction de l'huile essentielle (Cf. appendice E).

Nos résultats montrent que la composition chimique de l'huile essentielle des deux espèces du séné algérien est complètement différente de celle des huiles du séné du Gabon. En effet, ces dernières sont caractérisées par la prédominance en linalool (23.0%), en borneol (8.6%) et en pentadecanal (9.3%) [84].

Tableau 3.8 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. obovata*.

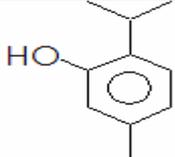
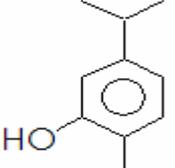
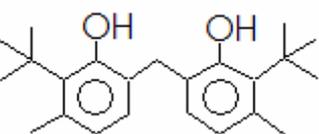
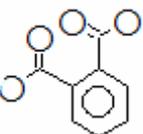
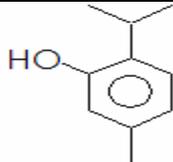
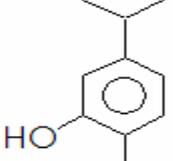
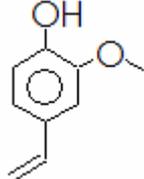
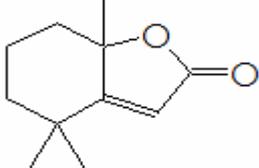
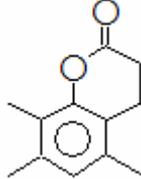
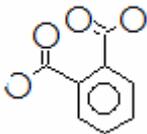
|   | Temps de rétention (min) | Composés                                 | Pourcentage | Formule brute                                  | Structure   |
|---|--------------------------|--|-------------|--|---|
| 1 | 9.25                     | (R) thymol                               | 6.4 %       | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              |    |
| 2 | 9.49                     | Carvacrol                                | 58.02 %     | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              |    |
| 3 | 37.74                    | p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl | 6.7 %       | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |    |
| 4 | 40.41                    | Diisooctyl phthalate;                    | 20.98 %     | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> |  |

Tableau 3.9 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. acutifolia*.

|   | Temps de rétention (min) | Composés                         | Pourcentage | Formule brute     | Structure   |
|---|--------------------------|----------------------------------|-------------|-------------------|---|
| 1 | 9.26                     | (R) thymol                       | 4.53 %      | $C_{10}H_{14}O$   |    |
| 2 | 9.51                     | Carvacrol                        | 43.08 %     | $C_{10}H_{14}O$   |    |
| 3 | 9.72                     | p-Vinylguaiacol                  | 18.14 %     | $C_9H_{10}O_2$    |   |
| 4 | 15.78                    | Dihydroactinidiolide             | 7.25 %      | $C_{11}H_{16}O_2$ |  |
| 5 | 21.67                    | Dihydrocoumarin, 5,7,8-trimethyl | 4.98 %      | $C_{12}H_{18}O_2$ |  |
| 6 | 40.42                    | Diisooctyl phthalate;            | 13.60 %     | $C_{24}H_{38}O_4$ |  |

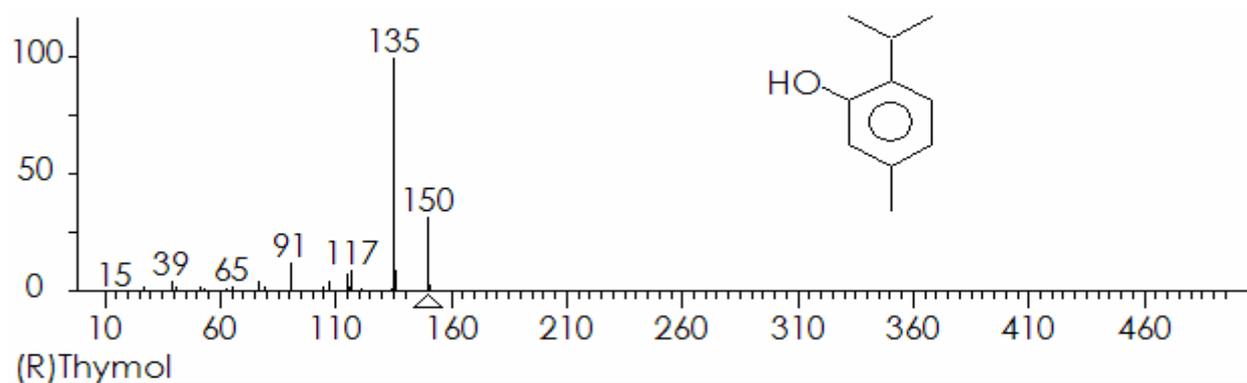


Figure 3. 15: Spectre de masse de thymol (référence)

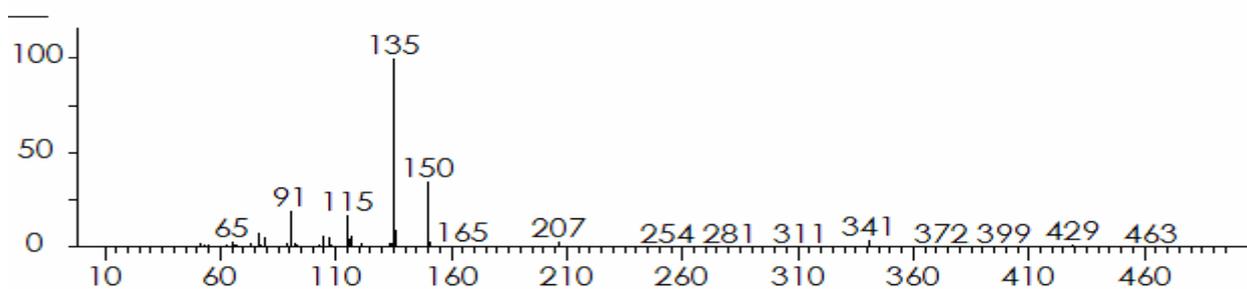


Figure 3. 16 : Spectre de masse de thymol correspond au temps de rétention 9.25 min.

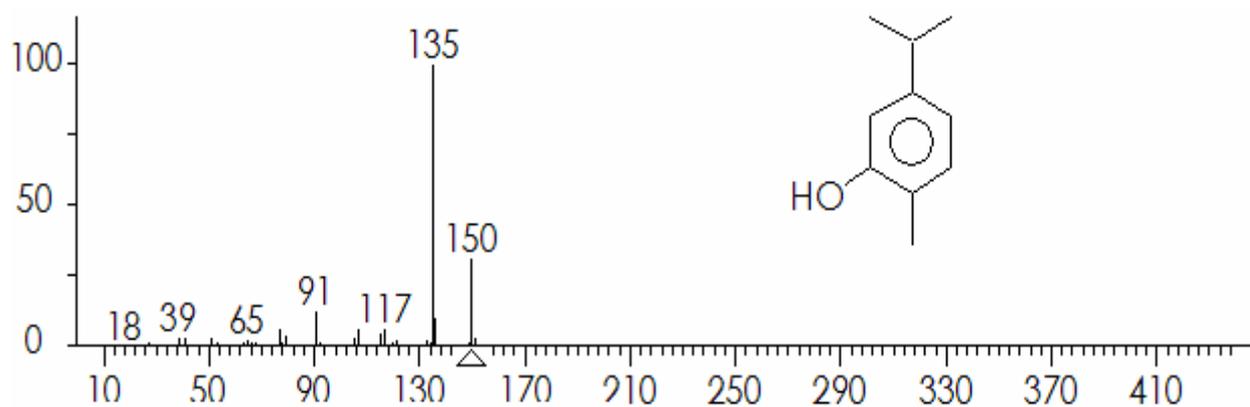


Figure 3. 17: Spectre de masse de carvacrol (référence)

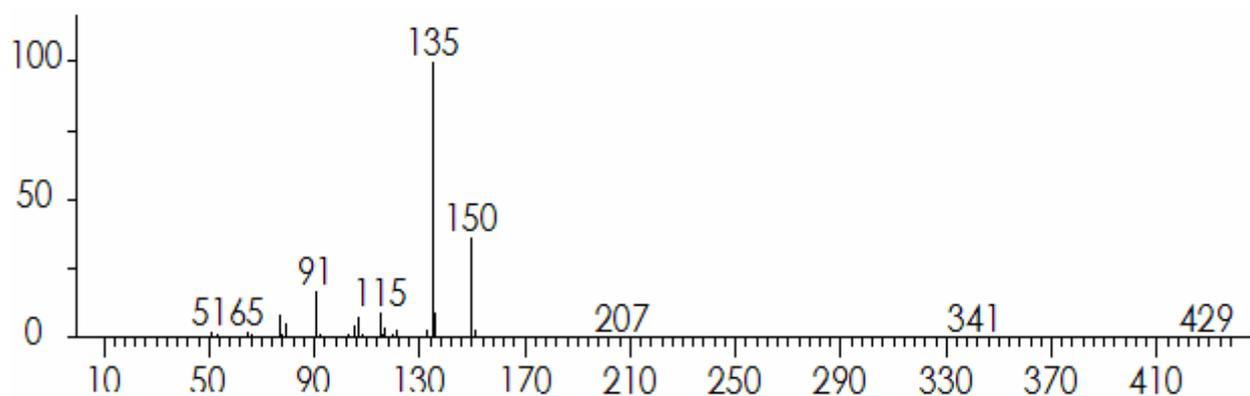


Figure 3. 18 : Spectre de masse de carvacrol correspond au temps de rétention 9.47 min

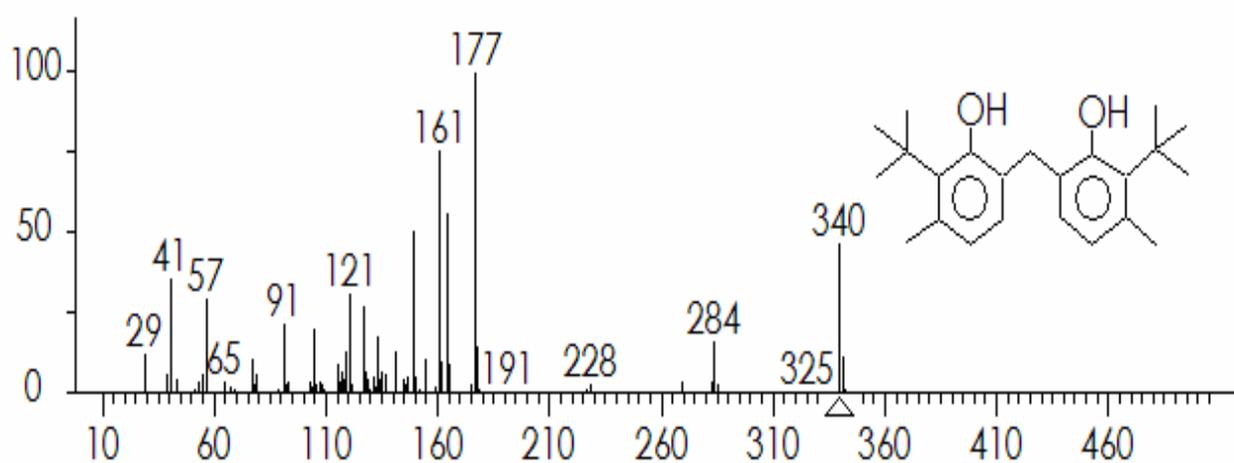


Figure 3. 19 : Spectre de masse de p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl (référence)

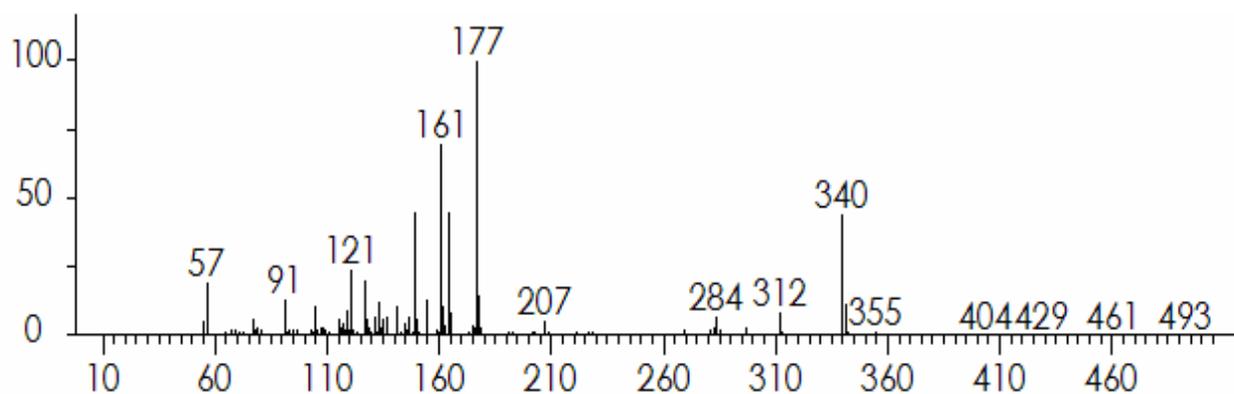


Figure 3. 20 : Spectre de masse de p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl correspond au temps de rétention 37.72 min.

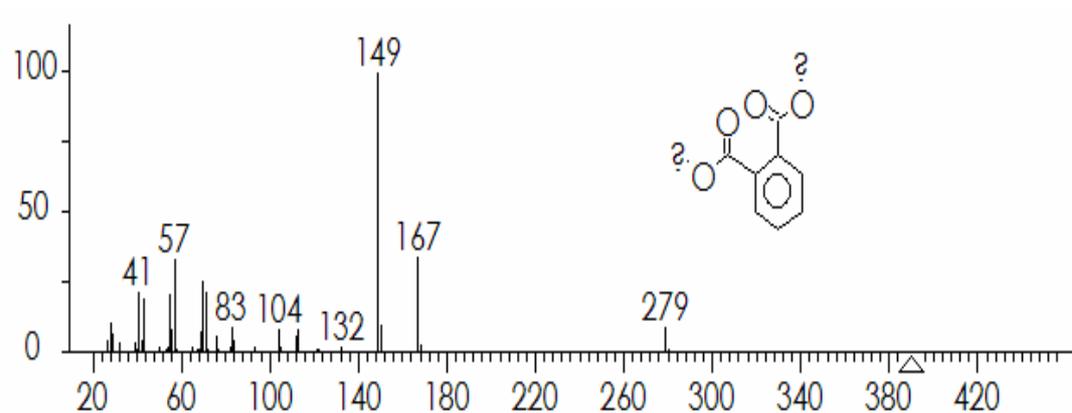


Figure 3. 21 : Spectre de masse de Diisooctyl phthalate (référence)

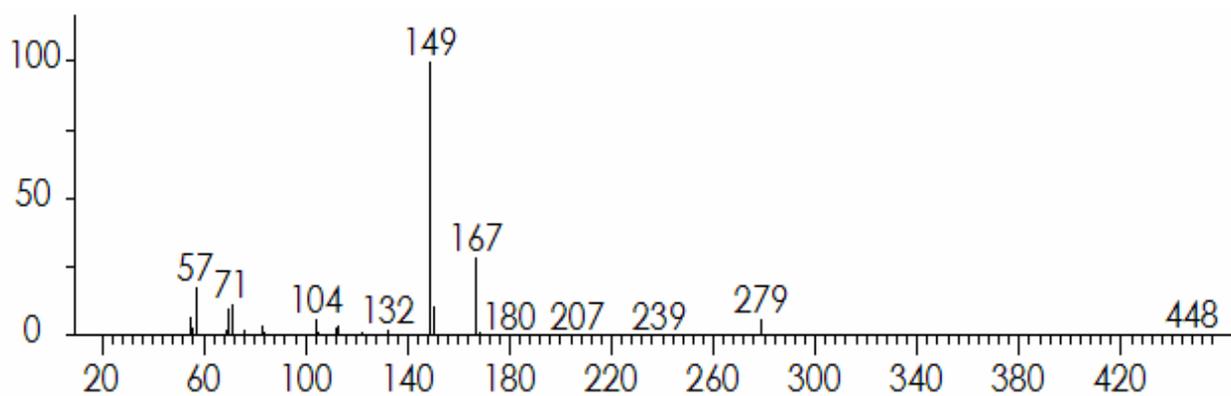


Figure 3. 22 : Spectre de masse de Diisooctyl phthalate correspond au temps de rétention 40.43 min.

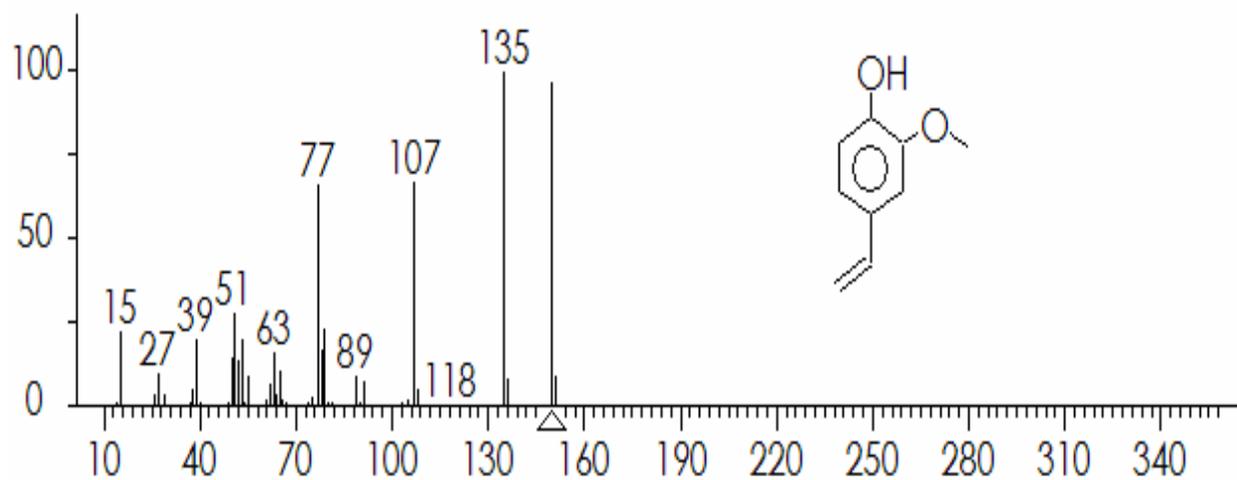


Figure 3. 23 : Spectre de masse de p-Vinylguaiacol (référence)

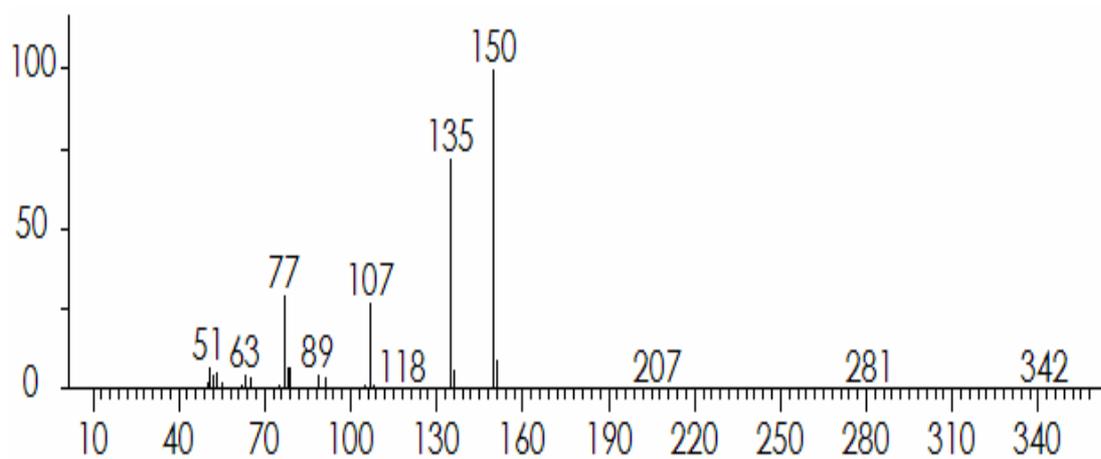


Figure 3. 24 : Spectre de masse de p-Vinylguaiacol correspond au temps de rétention 9.72 min.

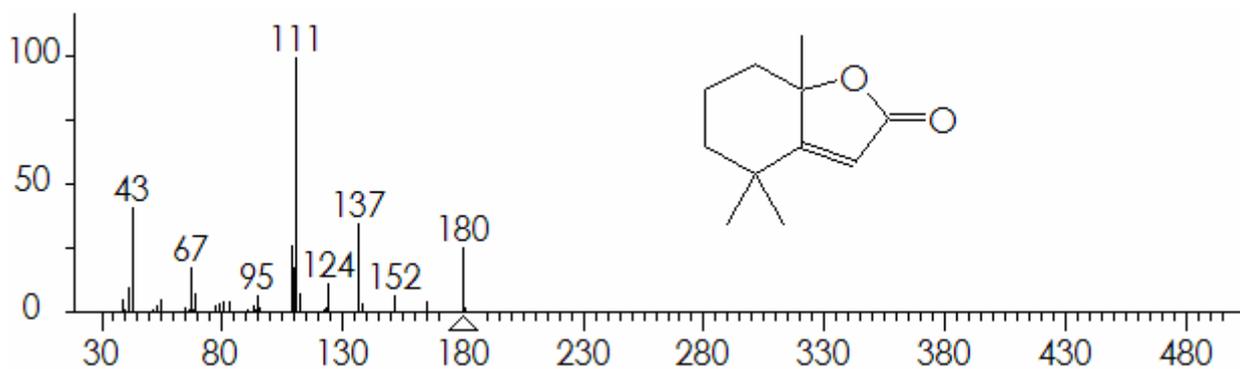


Figure 3. 25 : Spectre de masse de Dihydroactinidiolide (référence)

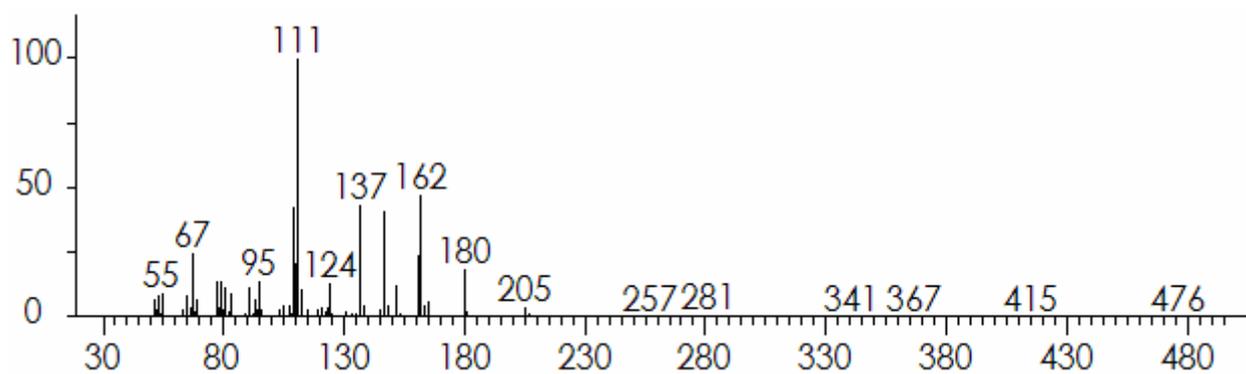


Figure 3. 26 : Spectre de masse de Dihydroactinidiolide correspond au temps de rétention 15.78 min

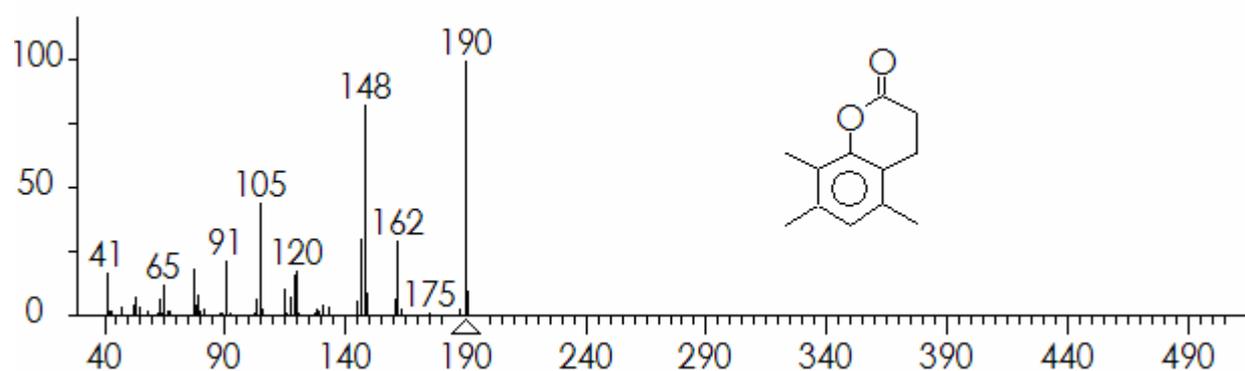


Figure 3. 27 : Spectre de masse de Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl- (référence)

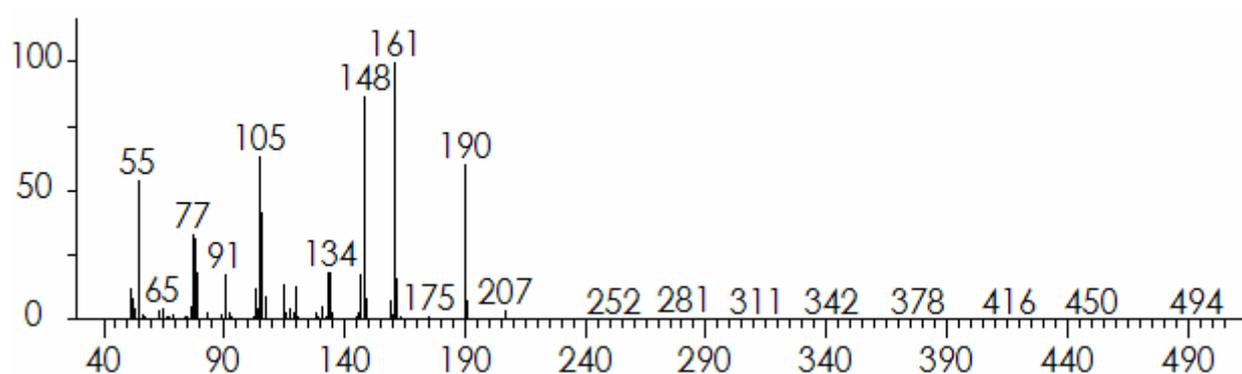


Figure 3. 28 : Spectre de masse de Dihydrocoumarin, 5,7,8-trimethyl- correspond au temps de rétention 21.66 min

### 3.7. Activité antimicrobienne

Les mesures de l'activité inhibitrice des huiles essentielles et des extraits éthanoliques des deux espèces ont été effectuées par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode permet d'évaluer l'effet des molécules actives sur des germes considérés comme pathogènes.

Les résultats expérimentaux de l'effet antimicrobien des deux espèces sont illustrés dans les tableaux (3.10) et (3.11).

Tableau 3.10: Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

| Les souches                       | Huile essentielle de<br><i>C. acutifolia</i> | Huile essentielle de<br><i>C. obovata</i> |
|-----------------------------------|--|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | Ø = 15                                       | Ø = 16                                    |
| <i>Klebseilla pneumonie</i>       | –  | –   |
| <i>Escherichia coli</i>           | –  | –   |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Ø = 15                                       | Ø = 16                                    |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | Ø = 20                                       | Ø = 18                                    |
| <i>Candida albicans</i>           | –  | –   |
| <i>Agrobactérium</i> ATCC 23308   | Ø = 13                                       | Ø = 12                                    |
| <i>Agrobactérium</i> ATCC 4452    | Ø = 12                                       | Ø = 10                                    |
| <i>Agrobactérium</i> BCFP 4771    | Ø = 13                                       | Ø = 11                                    |
| <i>Agrobactérium</i> BCFP 2517    | Ø = 11                                       | Ø = 13                                    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Ø = 16                                       | Ø = 15                                    |
| <i>Pseudomonas sp</i>             | –  | –   |
| <i>Serracia marcesens</i>         | –  | –   |
| <i>Proteus mirabilis</i>          | –  | –   |

Ø : diamètre de la zone d'inhibition en mm.

– : absence de la zone d'inhibition.

Tableau 3.11 : Activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

| Les souches                       | Extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i> |         | Extrait éthanolique de <i>C. obovata</i> |         |
|-----------------------------------|---|---------|--|---------|
|                                   | 1g/20ml                                     | 2g/20ml | 1g/20ml                                  | 2g/20ml |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | Ø = 14                                      | Ø = 20  | Ø = 14                                   | Ø = 17  |
| <i>Klebseila pneumonie</i>        | –   | –       | –  | –       |
| <i>Escherichia coli</i>           | –   | Ø = 15  | –  | Ø = 13  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Ø = 14                                      | Ø = 15  | Ø = 14                                   | Ø = 15  |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | Ø = 15                                      | Ø = 17  | Ø = 14                                   | Ø = 18  |
| <i>Candida albicans</i>           | –   | –       | –  | –       |
| <i>Agrobactérium</i> ATCC 23308   | Ø = 13                                      | Ø = 12  | Ø = 13                                   | Ø = 13  |
| <i>Agrobactérium</i> ATCC 4452    | Ø = 14                                      | Ø = 12  | Ø = 12                                   | Ø = 12  |
| <i>Agrobactérium</i> BCFP 4771    | Ø = 13                                      | Ø = 13  | Ø = 13                                   | Ø = 13  |
| <i>Agrobactérium</i> BCFP 2517    | Ø = 11                                      | Ø = 11  | Ø = 11                                   | Ø = 11  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Ø = 14                                      | Ø = 15  | Ø = 15                                   | Ø = 15  |
| <i>Pseudomonas sp</i>             | –   | Ø = 15  | –  | Ø = 15  |
| <i>Serracia marcesens</i>         | –   | –       | –  | –       |
| <i>Proteus mirabilis</i>          | –   | –       | –  | –       |

Ø : diamètre de la zone d'inhibition en mm.

– : absence de la zone d'inhibition.

D'après les tableaux 3.10 et 3.11, nous constatons que l'extrait éthanolique et l'huile essentielle des deux espèces présentent une activité antimicrobienne. Ils ont une action inhibitrice sur 8 souches parmi 14 souches sélectionnées pour cette étude. Néanmoins, cette action est effective mais à des degrés différents. Figure (3.29)-(3.37)

Selon Leclerc (1975) [85] une souche est dite :

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 15mm.
- Limite lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm.
- Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante.

Les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ont présentées des zones d'inhibition de 15 à 20 mm. Elles sont donc considérées comme des souches sensibles à l'huile essentielle et à l'extrait éthanolique pour une concentration de 2g/20ml pour les deux espèces de séné algérien. Il a été rapporté la sensibilité des souches *S. aureus* aux extraits éthanoliques et aqueux de *C. alata* [86].

Nous notons également une sensibilité de la souche *Pseudomonas sp* à l'extrait éthanolique à une concentration de 2g/ 20ml.

Nous remarquons que les souches d' *Agrobacterium* sont considérées comme des souches limites avec des zones d'inhibition inférieures à 15 mm. Au contraire, les souches *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Serratia marcescens* et *Klebseila pneumonie* sont considérées comme des souches résistantes vis-à-vis de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique. Cependant *E. coli* est considérée comme souche sensible à l'extrait éthanolique à une concentration de 2g /20ml avec une zone d'inhibition de 15mm. Néanmoins, les résultats nous ont montré qu'elle n'était pas sensible à l'huile essentielle du séné algérien.

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *C.obovata* et *C. acutifolia* serait dû éventuellement au composé carvacrol majoritaire au niveau de l'huile essentielle des deux plantes. En effet, certaines références font mention qu'il a un effet puissant antimicrobien [87].



Figure 3. 29 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus aureus*.

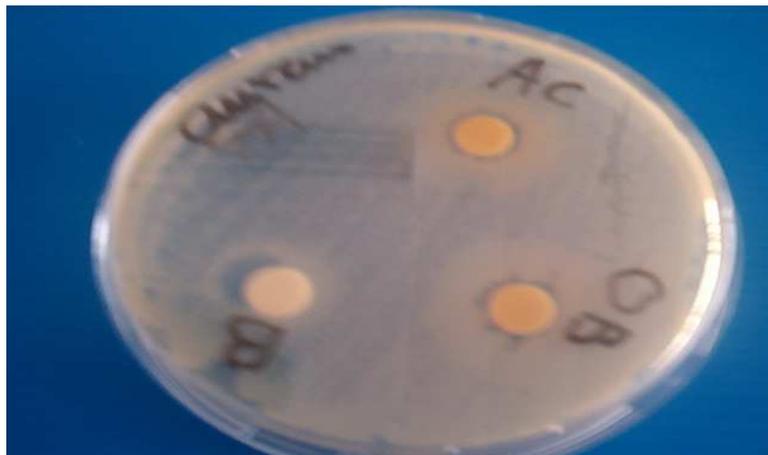


Figure 3. 30 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 3. 31 : Effet de l'huile essentielle de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus aureus*



Figure 3. 32 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur l'Agrobactérium



Figure 3. 33 : Effet de l'huile essentielle de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *l'Agrobactérium*

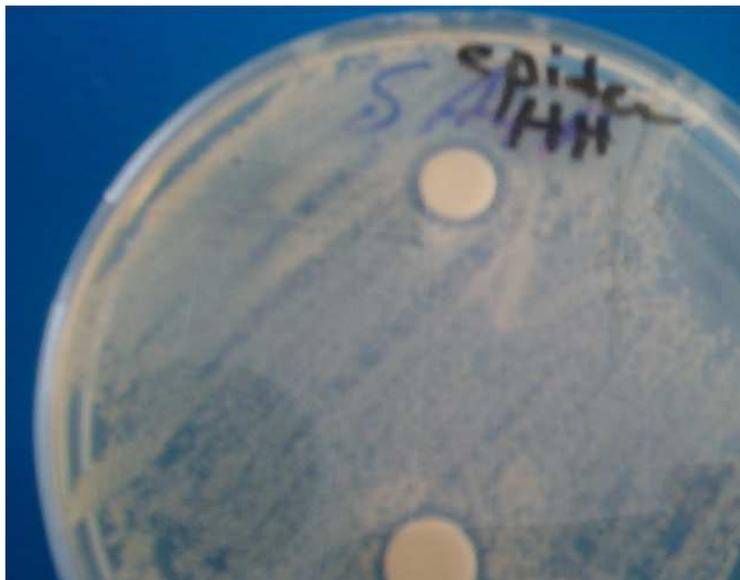


Figure 3. 34 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus epidermidis*



Figure 3. 35 : Effet de l'huile essentielle de *C. acutifolia* sur *Bacillus subtilis*



Figure 3. 36 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Bacillus subtilis*



Figure 3. 37 : Effet de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Escherichia coli*

## CONCLUSION

A l'issue de ce modeste travail nous avons acquis quelques connaissances sur le plan chimique et phytothérapique sur deux espèces de séné Algériens. Ces deux espèces spontanées vivent dans le désert Algérien et concernent *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*.

Les techniques utilisées nous ont permis d'identifier, de séparer et de quantifier les molécules volatiles et non volatiles des deux espèces de séné Algérien.

Les résultats de l'analyse par CCM montrent que les deux espèces renferment 5 fractions de sennosides classées selon l'ordre croissant de leurs R<sub>f</sub> en sennoside B, A, C, la réine-8-glucose et le sennoside D.

Le dosage de ces sennosides par spectrophotométrie UV-vis montre que la molécule principale des sennosides et la plus abondante dans le séné est représentée par les sennosides B. Cette proportion est de 74.04 % pour *Cassia acutifolia* et de 74.4% pour *Cassia obovata*.

L'analyse par chromatographie sur colonne nous a permis de séparer seulement la fraction en sennoside majoritaire représentée par les sennosides B. Ces derniers analysés par HPLC montre une pureté de la fraction séparée par colonne.

Ainsi, l'analyse des extraits éthanoliques par HPLC montre une richesse de *Cassia obovata* en substances actives avec 09 pics en comparaison à *Cassia acutifolia* qui ne montre que 6 pics.

Par ailleurs, l'analyse des flavonoïdes, des glucides et des minéraux a donné un rendement respectivement de 4.45%, 62% et 11.85% pour *Cassia acutifolia* et de 7.33%, 56% et 12.72% pour *Cassia obovata*.

L'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur a donné des extraits liquides avec un faible rendement pour les deux espèces. L'identification par CG/MS, nous a permis de connaître le profil chromatographique de chaque huile. Ainsi nous avons pu identifier les principaux constituants des huiles essentielles pour les deux espèces.

L'effet antimicrobien que pourrait avoir l'huile essentielle et les extraits éthanoliques à 2g / 20ml de *Cassia acutifolia* et de *Cassia obovata* a été testé sur différentes souches de bactéries. Ces dernières sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Les différentes souches expérimentées montrent une sensibilité.

A la lumière des résultats obtenus et des problèmes rencontrés, il paraît utile d'approfondir cette étude en utilisant un matériel plus performant (HPLC-MS) pour identifier les flavonoïdes et compléter l'étude phytochimique sur les fruits.

D'autre part, élargir la gamme des souches à tester afin d'affirmer les applications thérapeutiques, et de trouver le mécanisme d'inhibition de la croissance des micro-organismes testés et faire une étude générale sur les capacités antioxydantes des deux plantes.

## REFERENCES

1. Dibi. A « Phytochimie des substances naturelles, plantes utilisées en médecine traditionnelle » E 0501 /06 /04, BILAN ANNUEL, 2005.
2. Baba Aissa. F « Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb », copyright librairie. Alger, 1999, p368.
3. « Médecine traditionnelle ». Organisation Mondiale de la Santé cinquante-sixieme assemblée mondiale de la santé a56/18, 2003, p1-5.
4. Cabaret J. « 167 plantes pour soigner les animaux, phytothérapie vétérinaire ». Paris, 1986, p192.
5. Karin. F et Andrée. M.A « Interactions entre phytothérapie et médicaments », Forum Med Suisse No 29/30 23 juillet 2003.
6. Colette K.D « Les plantes médicinales », 2004, p57-64.
7. Schawenberg. P et Paris. F « Guide des plantes médicinales ». Paris, Delachaux et Niestlé. 3<sup>ème</sup> édition, 1977, p396.
8. Vonarburg. B « Plantes médicinales au rythme des saisons ». Zurich, Silva, 1981, p120.
9. « Plantes médicinales du Maroc : Usages et toxicité », Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, bp 6202, Rabat-instituts, Maroc, 2000.
10. Lavery. S Petit « guide du bien-être : Aromathérapie ». Cologne, Könemann, 1999, p58.
11. « Un guide pratique des plantes médicinales *pour les personnes vivant avec le VIH* »H. Réseau canadien d'info traitements sida (CATIE). <http://www.catie.ca>, 2005.
12. Thurzova. L « Les plantes – santé qui poussent autour de nous ». Bordas, 1981, p268.
13. Valnet. J « Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes ». 5<sup>ème</sup> édition : Maloine SA éditeurs. Paris, 1983, p 245.
14. Valnet. J « Aromathérapie traitement des maladies par les essences ». Éd Maloine. Paris, 1984, p544.
15. Leclerc. H « Précis de phytothérapie ». Masson, 1983, 170p.

16. Bianchini. F et Corbetta. F « Atlas des plantes médicinales ». Paris, Fernand Nathan Edite, 1975, p 231.
17. Iserin. P « Encyclopédie de plantes médicinales : identifications préparations soins ». Bordos : Larousse, 1996, p336
18. Chamaleau. A « Les usages externes de la phytothérapie ». Paris : Maloine. 1979, p 200.
19. Chevallier. A « Encyclopédie des plantes médicinales », Ed. Reader's Sigest, Canada, 1997.
20. Schawenberg. P et Paris. F « Guide des plantes médicinales ». Paris, Delachaux et Niestlé. 3<sup>ème</sup> édition, 1977, p396.
21. Bruneton. J « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3<sup>ème</sup> édition, Paris : Tec et doc. Lavoisier, 1999, 1120p.
22. Guignard. J-L « Biochimie végétale. 2<sup>ème</sup> édition. Paris, Masson ». 2000, 281p.
23. « "tanins" Encyclopédie Microsoft® Encarta® en ligne » <http://fr.encarta.msn.com>  
© 1997-2008 Microsoft Corporation.
24. Volak. J et Stodola. J « Plantes médicinales ». Paris, Grund, 1983. 298p.
25. Margorie. C « Chimie organique moderne. Inter édition ». Paris. 1977, 878p.
26. Hans. F Petit « guide panoramique des herbes médicinales ». Delachaux et niestlé. Paris. 1977, 360p.
27. Naves. Y.R « Technologie des parfums naturels ». Masson. Paris, 1974.
28. Salle. J.L « Les huiles essentielles ». Frison Roche. Paris, 199, P : 1-49.
29. « [http://www.01sante.com/version1/toutes\\_therapeutiques/produits\\_vegetaux/plantes\\_medicinales](http://www.01sante.com/version1/toutes_therapeutiques/produits_vegetaux/plantes_medicinales) », 2003.
30. Deutsches. A “Methoden der biologie “. Stuttgart, Deutscher Apotheker verlag. Vol 2, 1996.
31. LeClerc. J, Hazebroucq. A.A et Dorvault. J « L'officine », XXII<sup>ème</sup> édition. Vigot, Paris, 1987, p74-108.
32. Ozenda. P « Flore du Sahara », édition CNRS. Paris, 1983, p.286.
33. Benchelah. A.C et Maka. M « Flore de sahara : Voyage ethnobotanique avec les touaregs du tassili ». Paris, 2000, p 150-152.
34. « The United States Pharmacopeia » , Washington, 1995, p 1407-1408.
35. Pousset. J.L « Plante médicinales Africaines », Secum/Edisud, 2004, p286.
36. « Pharmacopée européenne », 4<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, conseil d'Europe, 2002, P 749.

- 37.** Paris. R.R et Moysé. H « Précis de Matière médicale ». Édition, Masson. Paris 1981, 365p.
- 38.** Sahki. A et Sahki. R « Le Hoggar, promenade botanique ». Ed, Esopé, 2004, 311p.
- 39.** Waltenberger. B, Avula. B, Ganzera. M, Khan. I.A, Stuppner. H et Khan S.I. “Transport of sennosides and sennidines from *Cassia angustifolia* and *Cassia senna* across Caco-2 monolayers – an in vitro model for intestinal absorption”. Journal of Phytomedicine. Elsevier, 2007, P 1-4.
- 40.** «European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use». EMEA/HMPC/51869. London, 2006.
- 41.** Martindale. J “The extra pharmacopoeia”, 30<sup>th</sup> édition. London, pharmaceutical press, 1993.
- 42.** Pousset. J.L « Plantes médicinales Africaines, utilisation pratique ». Paris, 1989, p 38-43.
- 43.** Abdallahi. O.M « Etude de quelques insectes récoltés en Mauritanie occidentale sur *Cassia acutifolia* et *Cassia italica* ». Ecole nationale supérieure N°5, Nouakchott, 2002, P 73 – 95.
- 44.** Evan. W.C « Pharmacognosy », 14<sup>th</sup> édition. London, 1998, p235-239.
- 45.** Ranjana. A “Yield of *Cassia angustifolia* in combination with different tree species in a silvi-herbal trial under hot arid conditions in India”. Bioresource Technology. Elsevier. V86, 2003, p 165–169.
- 46.** Wang. Z. J “Two new glycosides from the genus of *Cassia*”. Chinese Chemical Letters. V 18, 2007, p 1218–1220.
- 47.** Fernand. V. E , Dinh. D.T et Washington. S. J “Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of high performance liquid chromatography”. Elsevier. Talanta, 2007, p 1-7.
- 48.** Paris. M et Hurabielle. M « Abrégé de matière médicale : Pharmacognosie ». Tome1. Masson, Paris, 1981, 457p.
- 49.** Bala. S, Uniyal. G. C, Dubey. T et Singh. S. P An “ Improved Method for the Analysis of Sennosides in *Cassia angustifolia* by Highperformance Liquid Chromatography” . Phytochemical analysis. V **12**, 2001, p277–280.
- 50.** Hazra. B, Sarma. M. D et Sanyal. U “Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines”. Journal of Chromatography B, V 812, 2004, p 259–275.

51. Kuhnert. N et. Molod. H. Y “An efficient total synthesis of chrysophanol and the sennoside C aglycon”. *Tetrahedron Letters*. V46, 2005, p 7571–7573.
52. Budavari. S *The Merk index*. “An encyclopaedia of chemicals, drugs and biological”, 12<sup>th</sup> édition. London, 1996.
53. Gerharh. R “*Métabolisme des végétaux*”. Paris, 1993, p317.
54. Bruneton. J « *Elément de phytochimie et de pharmacognosie* ». Paris, Lavoisier, 1987. p 199.
55. Sun. S.W et Su. H. T “Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol29, 2002. p 881–894.
56. Silva. A “Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. *Toxicology in Vitro*”. V 22, 2008, p 212–218.
57. Leng – Peschlow. E “Acceleration of large intestine time in rats by sennosides and related compounds”. *Journal of pharmacy and pharmacology*. London, 1986, P 369-373.
58. Valnet. J « *Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes* ». 6<sup>ème</sup> édition : Maloine. Paris. 1992, 712p.
59. Valuet. J « *Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes* ». 5<sup>ème</sup> édition : Maloine, 1983, Paris. p 59, 711.
60. Gattuso. A et Kamm. M.A “Adverse effects of drugs used in the management of constipation and diarrhoea”. London, 1994, p45-65.
61. «Core- SPC for senna folium. Coordinated review of monographs on herbal remedies ». Brussels, Européen Commission, 1994.
62. Mairesse. M et Ledent. C « *Asthme et rhinite d'origine professionnelle causés par le séné* ». *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. V 47, 2007, p 371–372.
63. « *Pharmacopée européenne* », 5<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, conseil d'Europe, 2005, P 2600.
64. « *Guide pratique du laboratoire de chimie 4/ Méthode d'analyse* ». Edition Delta and Spes S. A, CH- 1026 Denges, 1984, p 127.
65. Karel. M “*Pharmaceutical application of thin- layer and paper chromatography*”. Elsevier, Prague, 1972.

66. Linden. G « Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire ». Technique et documentation. Paris. Lavoisier, 1991.
67. Marchal. R « Chromatographie. Ed, Antonot » , 1998, p 1- 48.
68. Garvilovie.M, Magonot. M.j et Walach. J « Manipulation d'analyse biochimique », 3<sup>ème</sup> édition. Doin éditeur, 1996, 453p.
69. Rouibi. A, Saidi. F et Boutoumi. H « extraction and caractérisation of some active principles of senna ». Bulten USAMV.CN, Vol 63, 2007, p 400-4004.
70. Guignard J-L « Biochimie végétale ». 2<sup>ème</sup> édition. Paris, Masson, 2000, 281p.
71. Bachelier. G et Gavinelli. R « Dosage global des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'antrone et à l'orcinol ». Orstom, sér, pédol. Vol 3, 1996, p. 97-100.
72. Bouchonnet. R « Les différents types de spectromètre de masse utilisé pour l'analyse », 1999.
73. Rouessac F « Analyse chimique, méthodes et technique instrumentales modernes ». 5<sup>ème</sup> édition. Dunod 2000.
74. De Hoffman. E, « Charrette J et Stroobant. V. Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigées ». Dunod, 1999.
75. Klein. P.H « Microbiologie. De Boeck Université ». Bruxelles, 1995, P 433, 453, 824, 576.
76. Larpent. J.P “ Escherichia coli 0157 :h7”. Tec & Doc, 1990, p 3.
77. Thierry. E « les infection microbienne » Tome2. NATHAN, 1997, pp 13,15,58.
78. Delarras. C « Microbiologie pratique pour le laboratoire ». Edition tec and Doc. Lavoisier, 2007, 476p.
79. Singleton. P « Bactériologie », 4<sup>ème</sup> édition, Dunod. Paris, 1999, 420p.
80. Davet. P « Vie microbienne du sol et production végétale », INRA. Paris, 1996, 383p.
81. El-Sayed. N, Abu Dooh. A. M et El khisy. E. A “ Flavonoids of *Cassia italica*” . Journal of phytochemistry, Vol 31, 1992.p 2187.
82. Dipti. G et Singh. J “ flavonoids glucosides from *Cassia alata*” journal of phytochemistry, Vol 30, 1991, p 2761-2763.
83. Ukhun. M. E et Ifebigh. E. O. «Compositional Chemistry of *Cassia alata* », *journal of Food Chemisttry* Vol 30, 1988, p 205-210.
84. Agnani. H et al. «Essential oil constituents of cassia alata (L.) from Gabon». Journal of essential oil research, vol. 17, 2005, 410-412.

- 85.** Leclerc. H “microbiologie generale”. Ed Masson. Paris. p195.
- 86.** Somichit.M.N, Reezal. I et Elysha. I “In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*”. Journal of ethnopharmacology, Vol 84, 2003, p1-4.
- 87.** Burt. S. A, Fledderman. M. J, Haagsman. H. P et Knapen. F. V “Inhibition of *salmonella enterica* serotype enteridis on agar and raw chicken by carvacrol vapour”. Journal of food microbiology, Vol 119, 2007, p 346-350.

## APPENDICE : A

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRIVIATIONS

ATCC : Américain Type Culture Collection

CC : chromatographie sur colonne

CCM : chromatographie couche mince

CG/MS : chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

°C : Degrés Celsius

cm : centimètre

DO : densité optique

eV : électron volt

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

INRF : institut national de la recherche forestière

mm : millimètre

mn : minute

ml : millilitre

Mr : Masse moléculaire

nm : nanomètre

pH : potentiel d'hydrogène

rpm : rotation par minute

R<sub>f</sub> : facteur de rétention

R<sup>2</sup> : facteur de corrélation.

µl : microlitre

µm : micromètre

UV-vis : Ultra violet- visible

V : volume

∅ : diamètre de la zone d'inhibition en mm.

## **APPENDICE : B**

### **MATERIELS UTILISES**

- Chauffe ballon
- Vortex
- Réfrigérant à eau
- Files de 10ml
- Papier filtre papier aluminium
- Spatule
- Ampoule à décanter 500ml
- Bécher 100ml
- Entonnoir en verre
- Balance analytique (SCALTEC SBC 31)
- Tube à essai
- Etuve (NUVE EN 500)
- Boîte de pétri
- Disques d'antibiogramme stériles
- Pipettes pasteurs
- Boîtes pétris
- Micro pipette
- Pince
- Four à moufle (Prolabo N°57018)
- Rota vapeur (Stuart RE300)
- Bain marie (NUVE nb 20)
- Pipettes graduées de 1, 5,10 et 20 ml
- Creuset en platine
- Centrifugeuse (NUVE NF 200)
- Colonne en verre menée d'un robinet
- Plaque en verre pour CCM
- Portoir
- Spectrophotométrie UV-vis (SHIMADZU UV-1601)
- Chromatographie liquide à haute performance (SHIMADZU)
- Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie de masse ((HP/MSD Agilent 5890)

**APPENDICE : C**  
**REACTIFS UTILISES**

- Ether Diéthylique
- Sulfate de magnésium
- Hexane
- Eau distillée
- Acétate d'éthyle
- Acide acétique
- Propanol
- Acétonitrile
- Méthanol
- Ethanol
- Butanol
- Chloroforme
- Acide nitrique 20%
- Hydroxyde de potassium
- Acide sulfurique
- Anthrone
- Glucose
- méristate d'isopropyl
- gel de silice pour colonne (63  $\mu\text{m}$ )

## APPENDICE : D



Figure: Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur

## APPENDICE : E

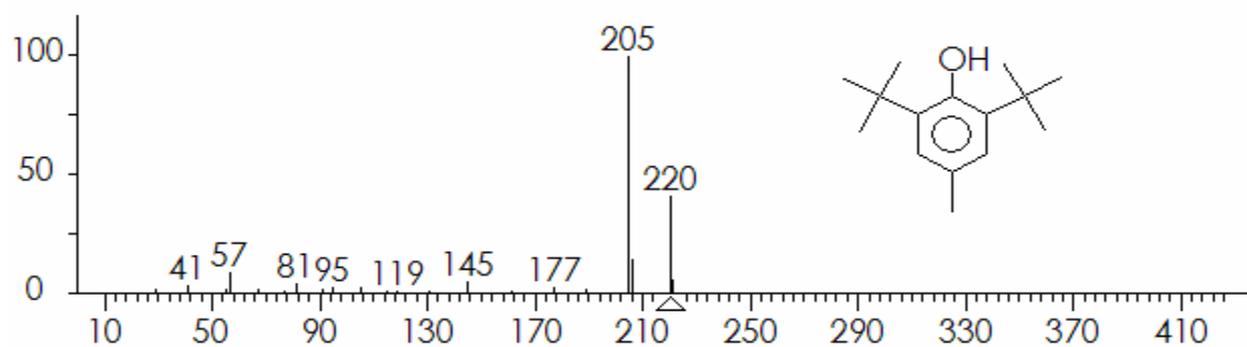


Figure: Spectre de masse de Butyl Hydroxytoluene (référence)

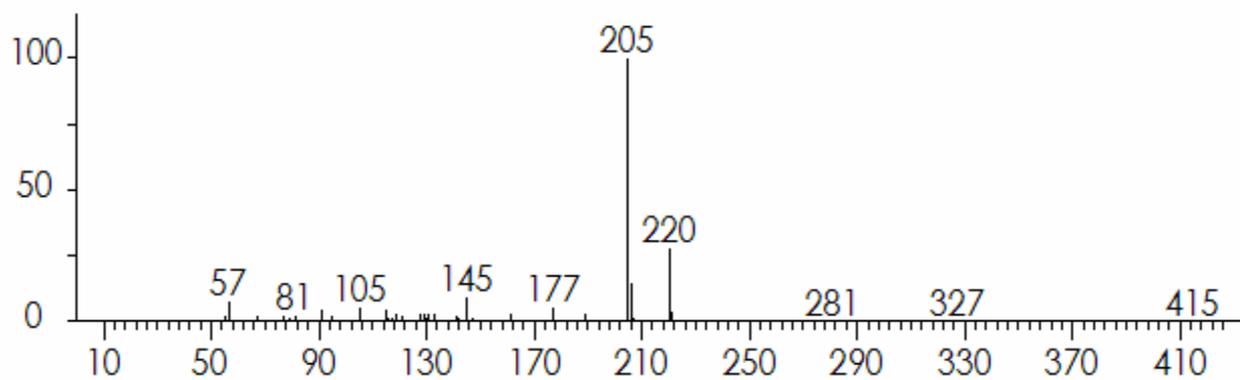


Figure: Spectre de masse de Butyl Hydroxytoluene correspond au temps de rétention 15.59 min