



— République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB-Blida

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme de
Master Académique

Option : Phytothérapie et Santé

Thème

**Extraction des stévioides, caractérisation physicochimique
et évaluation de quelques activités biologiques
de *Stevia rebaudiana***



Réalisé par:

Mme BEN ASSOULA Fazia

Mme MEKERRI Yasmina

Devant le jury :

Mme SAIDI .F

Professeur

USDB1

Presidente

Mme CHERIF .HF

MCB

USDB1

Examinatrice

Mme BRADEA . M .S

MCA

USDB1

Promotrice

Mme BAADOUD .J

MCB

Université d'Alger

Copromotrice

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à Mme BRADÉA M.S., Maître de conférences à la l'université de BLIDA, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé ,qui nous ont permet de réaliser ce travail.

Nous adressons d'abord nos remerciements les plus sincères à notre Co encadreur, le docteur BAADOUD.I, maitre assistante au laboratoire de botanique médicale et de cryptogamie, qui nous a accompagné de près durant tout ce travail, pour nous avoir suivi ,guidé et encouragé, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'elle a su nous accorder et les conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout au long de la réalisation de ce présent travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme SAIDI. F, professeur à l'Université de BLIDA pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme CHERIF. HS, Maître de conférences à l'Université de BLIDA pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme AYACHI. N, Maître assistant à l'Université de BLIDA et consultante au CRD-SAIDAL pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Nous tenons également à exprimer notre profonde reconnaissance à Mme HALLI. L, cadre au CRD-SAIDAL et doctorante pour sa contribution à la réalisation de ce travail et ses précieux conseils, qu'elle trouve ici nos sincères remerciements.

Et en fin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont guidé et inspiré pour l'élaboration de ce mémoire.

Liste des tableaux

| | |
|---|--------|
| Tableau 01 : Composition en minéraux, vitamines, lipides et protéines de <i>Stevia rebaudiana</i> (Tadhani et al,2006) | 09 |
| Tableau 02 : Pouvoir sucrant des glycosides de stéviol..... | 10 |
| Tableau 03 : Caractéristiques des différents micro-organismes..... | 17 |
| Tableau 04 : résultat de la teneur en eau de la poudre des feuilles séchées de <i>Stevia rebaudiana</i> | 38 |
| Tableau 05 : Résultats du screening chimique. | 39 |
| Tableau 06 : Interprétation du spectre obtenu avec l'extrait | 40 |
| Tableau 07 : Identification des composés de l'extrait | 42 |
| Tableau 08 : Densités optiques et pourcentages d'inhibitions des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Stevia rebaudiana</i> bertonii | Annexe |
| Tableau 09 : Densités optiques et pourcentages d'inhibition des différentes concentrations de l'acide ascorbique..... | Annexe |
| Tableau 10 : Les concentrations effectrices de l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique..... | 44 |
| Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par l'extrait brut sontt exprimés en millimètre (mm)..... | 45 |
| Tableau 12 : Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut de <i>Stevia rebaudiana</i> | 45 |

Liste des figures

| | |
|---|---------|
| Figure 01 : Partie aérienne de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni | 05 |
| Figure 02 : Fleurs de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni..... | 05 |
| Figure 03 :Classification APG III de la <i>Stevia rebaudiana</i> | 06 |
| Figure 04 : Les différents édulcorants | 15 |
| Figure 05 : Conditionnement en poudre des feuilles de <i>Stevia rebaudiana</i> | 16 |
| Figure 06 : L'évaporation de l'extrait méthanolique de <i>Stevia rebaudiana</i> avec l'évaporateur rotatif..... | Annexe3 |
| Figure 07 : Dispositif du soxhlet..... | Annexe3 |
| Figure 08 : Extrait brut méthanolique de <i>Stevia rebaudiana</i> | Annex3 |
| Figure 09 :Etapes de purification de l'extrait brut méthanolique de <i>Stevia rebaudiana</i> avec le charbon actif | Annexe3 |
| Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH..... | 27 |
| Figure11 : Préparation des différentes concentrations à tester..... | 28 |
| Figure 12 : Etapes à suivre pour le test au DPPH..... | 29 |
| Figure 13 : Incubation et ensemencement des bactéries a la surface des boites de pétri..... | 31 |
| Figure 14 : Vue général de la coupe transversale de la tige jeune de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni . (Observé au microscope photonique au grossissement (10x4)..... | 34 |
| Figure 15 : Portion de la coupe transversale de la tige de <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> observé au microscope optique au grossissement (10x10)..... | 35 |
| Figure 16 : Vue général de la coupe transversale de la racine de <i>stevia rebaudiana bertoni</i> observé au grossissement (10x4)..... | 36 |
| Figure 17 : Coupe transversale de la racine de <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> observé au microscope optique au grossissement (10x10)..... | 36 |
| Figure 18 : Allure général de la coupe transversale de la racine de <i>stevia rebaudiana bertoni</i> observé au grossissement (10x4)..... | 37 |
| Figure 19 : Coupe transversale de la racine de <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> observé au microscope optique au grossissement (10x10)..... | 37 |
| Figure 20 : Résumé de l'étude anatomique de la poudre des feuilles séchées..... | 38 |
| Figure 21 : Résultats du screening phytochimique de la poudre des feuilles séchées de <i>Stevia rebaudiana</i> | Annexe3 |
| Figure 22 : les solutions d'essai après l'incubation..... | Annexe3 |
| Figure 23 : Pouvoir reducteur de l'extrait Methanolique de <i>Stevia rebaudiana bertoni</i> en fonction des concentrations..... | 43 |
| Figure 24 : Pourcentages d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des concentrations..... | 43 |
| Figure 25 : L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait methanolique dilué de <i>Stevia rebaudiana</i> | Annexe3 |
| Figure 26 : L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait methanolique concentré de <i>Stevia rebaudiana</i> | Annexe3 |

Abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

OMS : Organisation mondiale de la santé

PS : Pouvoir Sucrant

PM : poids moléculaire

SPE : Solid phase extraction

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

SPIR : Spectroscopie proche infrarouge

HILIC : Hydrophilic Liquid Interaction Chromatographic

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HFCS : High Fructose Corn Syrup

DJA : Dose Journalière Admissible

JECFA : Joint Expert Committee on Food Additives

AGV : Acides gras volatils

Hoechst AG : groupe chimique et pharmaceutique allemand

mm Hg : millimètre de mercure

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

NADPH : NicotinAmide Adénine Dinucléotide Phosphate

DL50 : Dose Létale pour 50%

ATCC: American Type Culture Collection

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

UFC : Unité Faisant Colonie

ONAB : Office National des Aliments du Betail

Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni est un arbuste d'Amérique du Sud dont les feuilles sont utilisées par les Indiens Guarani depuis plusieurs siècles pour sucrer ou adoucir le «maté », une boisson traditionnelle. Elle y est également utilisée en ethnomédecine pour traiter divers maux (Lazarin , Couplan , 2009). Elle est tout simplement la plante la plus sucrée du monde, elle renferme de nombreuses molécules et certaines ont la capacité d'être sucrantes. Il s'agit de diterpènes glycolyses et plus particulièrement le stéviolide et le rebaudioside A (Brandle et al,1998). Ce sont ces molécules qui font de cette plante un édulcorant intense et qui sont responsables de sa mise sur le marché économique depuis peu de temps.

Ces propriétés sucrantes retrouvées au sein de la *Stévia* peuvent avoir un réel impact notamment sur les problèmes nutritionnels causés par une trop grande consommation de sucre dans les pays industrialisés. En effet, le sucre est connu principalement pour être responsable de l'apparition de caries, d'obésité, de diabète, de prise de poids et d'effets néfastes sur la tolérance au glucose. Il est donc essentiel de trouver une alternative pour contrer l'apparition de maladies redoutables telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou l'hypertension. Cela est particulièrement important sachant que ces pathologies occasionnent de nombreux décès créant ainsi un réel coût économique et financier pour la société (Rengassamy , 2015).

Introduite pour la première fois en Europe au XVIème siècle par les espagnols, elle est décrite en 1899 par le suisse Moises Santiago Bertoni qui la classe dans la famille des Astéracées. De ce fait, la stévia est la plante miraculeuse dont nous avons besoin pour enrayer les phénomènes de santé publique que sont l'obésité et le diabète (Morin, 2015) .

En effet, dans notre société, le sucre est aisément remplacé par les édulcorants de synthèse aussi bien en qualité d'édulcorants de table que dans de nombreux produits agroalimentaires. L'aspartame bien sûr, souvent associé dans des boissons dites « light » à l'acésulfame de potassium, mais également la saccharine, le cyclamate, ou encore le sirop de glucose-fructose, édulcorants qui font actuellement l'objet de nombreuses controverses (Rengassamy , 2015).

C'est dans le cadre d'un projet de recherche intitulé : Edulcorant naturel à base de Stévia, initié par le Centre de Recherche et de Développement **CRD –SAIDAL** d'El Harrach, Alger, que nous avons réalisé ce travail. Nous nous sommes intéressées à l'extraction des stéviolides et aux diverses propriétés de la plante afin de la valoriser ainsi ; qu'aux avantages de son utilisation dans le domaine pharmacologique réalisés au niveau du CRD-SAIDAL .

SOMMAIRE

Introduction

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | | |
|-------------|--|----|
| I. | La phytothérapie | 1 |
| | I.1. Définition | 1 |
| | I.2. Les plantes médicinales | 1 |
| | I.2.1. Définition | 1 |
| | I.2.2. Historique..... | 1 |
| | I.2.3. Modes d'utilisation des plantes médicinales | 2 |
| II. | Généralités et l'étude de la plante (<i>Stevia rebaudiana</i>) | 3 |
| | II.1. Historique | 3 |
| | II.2. Description botanique | 4 |
| | II.3. Taxonomies et systématiques | 6 |
| | II.4. Noms vernaculaires | 6 |
| | II.5. Utilisations en médecine traditionnelle | 7 |
| | II.6. Utilisation actuelle | 7 |
| | II.7. Autre utilisation de la stevia | 8 |
| III. | Composition chimique de Stevia | 8 |
| IV. | Etude pharmacologique et toxicologique de l'extrait des feuilles de Stevia rebaudiana | 10 |
| | IV.1. Études pharmacologiques..... | 10 |
| | IV.2. Études toxicologiques..... | 13 |
| V. | Les édulcorants | 14 |
| | V.1. Définition | 15 |

DEUSIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

| | | |
|-----------|------------------------------------|----|
| I. | Matériels et méthodes | 16 |
| | I.1. Matériels | 17 |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| I.1.1. Matériel végétal..... | 16 |
| I.1.2. Les souches microbiennes..... | 17 |
| I.1.3. Matériel animal..... | 17 |
| I.1.3. Matériel technique..... | 17 |
| I.2. Méthodes..... | 18 |
| I.2.1. Etude histo-anatomique..... | 18 |
| I.2.2. Détermination de la teneur en eau ou l'humidité | 19 |
| I.2.3. Criblage phytochimique..... | 20 |
| I.2.4. Extraction des stévioides..... | 23 |
| I.2.5. Caractérisation physico-chimique..... | 24 |
| I.2.6. L'activité anti-oxydante..... | 26 |
| I.2.7. L'activité antimicrobienne..... | 29 |
| I.2.8. Etude de la toxicité aigüe..... | 32 |
| II. Résultats et discussions..... | 34 |
| II.1. L'étude histo-anatomique | 34 |
| II.1.1. La tige..... | 34 |
| II.1.2. La racine..... | 35 |
| II.1.3. Les feuilles..... | 36 |
| II.1.4. Etude microscopique de la poudre des feuilles séchées..... | 37 |
| II.2. Taux d'humidité..... | 39 |
| II.3. Criblage phytochimique..... | 39 |
| II.4. L'extraction des stévioides..... | 40 |
| II.4.1. Identification par Infra-rouge..... | 40 |
| II.4.2. Identification par chromatographie liquide à haute performance | 41 |
| II.4.3. Identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV visible..... | 42 |
| II.5. L'activité anti-oxydante..... | 42 |
| II.6. L'activité antimicrobienne..... | 45 |
| II.7. Etude de la toxicité aigüe..... | 47 |

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Stevia rebaudiana Bertoni est une Astéracées, ses feuilles possèdent des composés fortement sucrés donnant à la plante ses vertus thérapeutiques et édulcorantes. Il s'agit des glycosides de stéviol.

Dans cette étude, nous avons fixé comme objectif l'extraction des steviosides à partir de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* et l'évaluation de sa toxicité aigüe ainsi que leurs activités anti microbienne et anti oxydante.

Nous avons compléter le travail par une étude botanique et phytochimique de la plante et un test d'innocuité.

En effet le screening phytochimique effectué sur la poudre des feuilles de *Stevia rebaudiana*, montre sa richesse en plusieurs composés et principes actifs tels que, les alcaloïdes ; flavonoïdes, Iridoides et stérols. L'abondance en ces principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables.

L'étude de l'activité antioxydante de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana*, selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante non négligeable, avec un effet maximal de 89,42 % à la concentration de 300µg/ml.

De plus, La solution concentrée de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* présente une activité modérément inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et une activité légèrement inhibitrice pour et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Par ailleurs, l'étude de la toxicité de l'infusé de la poudre des feuilles indiquent que *Stevia rebaudiana* est non toxique.

Mots clés : Steviosides, effet antioxydant , effet antibactérienne, toxicité aigüe .

Summary

Stevia rebaudiana Bertoni is an Asteraceae; its leaves have strongly sweet compounds giving the plant its medicinal and sweetening properties. This is of steviol glycosides.

In this study, we set a target extraction steviosides from the powder of dried leaves of *Stevia rebaudiana* and evaluation of its acute toxicity and their antimicrobial and antioxidant activities.

We complete the work by botanical and phytochemical study plant and a safety test.

Indeed the phytochemical screening performed on the powder leaves of *Stevia rebaudiana*, shows its wealth more active compounds and principles such as, alkaloids; flavonoids and sterols Iridoides. The abundance of these active ingredients gives the plant remarkable pharmacological properties.

The study of the antioxidant activity of the powder of dried leaves of *Stevia rebaudiana*, according to the trapping method of free radical DPPH showed that the methanol extract has significant antioxidant activity, with a maximum effect of 89.42% at a concentration of 300 μ g / ml.

In addition, The concentrated solution of the methanol extract of *Stevia rebaudiana* has a moderately inhibitory activity on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and a slightly inhibitory activity and for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Moreover, the study of the toxicity of the leaves of the powder concentrate indicate that *Stevia rebaudiana* extract is not toxic.

Keywords: Steviosides, antioxidant effect , antibacterial effect, acute toxicity.

ملخص

يعطي النبات خصائصه الطبية و تحلية هذا هو glycoside de stéviol Stevia rebaudiana Bertoni نبتة تنتمي إلى عائلة استراسيا، أوراقها تحتوي على مركبات حلوة في هذه الدراسة، وضعنا هدف الذي يتمثل في إستخلاص ستأفيوسيدأس من مسحوق الأوراق المجففة ل ستيفيا ريبواديانا وتقييم السمية الحادة وأنشطتها المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة. كملنا العمل من خلال دراسة نباتية وكيميائية لمسحوق الأوراق المجففة لستيفيا مع إجراء اختبار سلامة في الواقع إن الفحص الكيميائي النباتي الذي أجري على مسحوق الأوراق المجففة لستيفيا ريبواديانا، أظهر غنائها من مركبات ومبادئ فعالة من قلوبدات أكثر نشاطا مثل مركبات الفلافونويد، الألكلوبيد، ستيرول و. و الوفرة من هذه المكونات النشطة يعطي النبات خصائصه الدوائية اللافتة. إريديويدأس أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة من مسحوق الأوراق المجففة لستيفيا ريبواديان وبقا لطريقة محاصرة ة ، أن مستخلص الميثانول لديه نشاط مضاد للأكسدة كبير، مع وجود تأثير الحد PP من الجذور الحرة ض مل / 000µg % بتركيز ع 4.ص 8الأقصى ب علاوة على ذلك، محلول الميثانول المستخلص من ستيفيا ريبواديانا لديه نشاط كابح بشكل معتدل على المكورات العنقودية الذهبية والعصوية الرقيقة، والنشاط المثبطة قليلا والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية. من جهة أخرى، دراسة سمية محلول مسحوق الأوراق تشير إلى أن ستيفيا ريبواديانا غير سامة

كلمات البحث : Stevioside ، مضاد الأكسدة، مضاد للجراثيم، السمية الحادة

I. La phytothérapie

I.1. Définition:

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes » (Salle ,1991). Elle est basée encore actuellement sur la connaissance empirique, ancestral, sur l'usage traditionnel, transmis oralement au cours des siècles et des millénaires (Farnsworth,1986).

On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- **Une pratique traditionnelle**, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement (Fournier P ,1948). Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique (Iannaouer, 2000).
- **Une pratique basée sur les avancées scientifiques**, qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (Triben ,1993).

I.2. Les plantes médicinales :

I.2.1. Définition :

Les plantes médicinales peuvent être définies comme toute plante ou partie employée à destins thérapeutiques ou contenant des substances pouvant fournir des médicaments par voie de synthèse ou d'hémi-synthèse (Fournier, 1948).

I.2 .2. Historique :

Le premier texte connu sur la médecine par les plantes est gravé sur une tablette d'argile, rédigé par les Sumériens en caractères cunéiformes 3000 ans av. J.-C.; Ils utilisaient des plantes telles le myrte, le chanvre, le thym, le saule en décoctions filtrée (Conner,1993).

Le Papyrus Ebers, du XVI^e siècle av. J.-C. est le premier recueil connu consacré aux plantes médicinales. De loin le plus volumineux connu de l'Égypte ancienne avec « 110 pages », il fait référence à de plus anciens documents citant des dizaines de plantes accompagné d'un mode d'utilisation (Bruneton,2002) .

Les Grecs et les Romains utilisaient également de nombreuses plantes. On en retrouve des références, entre autres, dans l'œuvre de Dioscoride (médecin grec du I^{er} siècle).

En Europe, les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée jusqu'à la fin du XIX^e siècle et l'avènement de la chimie moderne. Encore largement utilisées après la Seconde Guerre mondiale, elles furent ensuite supplantées par les médicaments de synthèse plus simple d'emploi (Delaveau,1982).

En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. L'Algérie bénéficie d'une flore médicinale très riche, ceci est dû à la diversité topographique et climatique (Beloued, 1998).

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962,les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par Fourment et Roques où ils ont mentionné décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara (Hamdi Pacha,1993) . Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de Bloued 1998 (Baba Aissa,1999).

I.2.3. Modes d'utilisation des plantes médicinales :

Les plantes possèdent des principes actifs très puissants qui se trouvent soit dans les racines, l'écorce, les feuilles, les sommités fleuries, les fruits, la résine...etc. Les parties utilisées de la plante varient d'une espèce à l'autre, ou pour une même plante selon l'effet désiré. La tisane de plantes est l'utilisation la plus connue des plantes médicinales, mais il existe une grande variété de modalités : en usage externe (cataplasmes, compresses, collyre, bain de bouche, bains...) ou en consommation (ingestion, cure, infusion, décoction ...etc), en fumigation, en inhalation...etc. (Bruneton,2002) .

II. Généralités et l'étude de la plante (*Stevia rebaudiana*)

II.1. Historique :

L'histoire de la culture du Stevia commence au Paraguay et au Brésil. Les indiens Guarani connaissent cette plante au goût sucré depuis des siècles. Parmi les nombreuses utilisations, ils se servent des feuilles pour édulcorer des tisanes comme le maté. Ainsi, la Stevia a obtenu le nom d'« herbe sucrée du Paraguay » (Handro et Ferreira, 1989 ;Lewis, 1992).

Le premier contact entre l'Europe et le stevia se fit au 16ème siècle, quand les envahisseurs espagnols entendirent parler de cette herbe sucrée.

Au mépris de la description botanique faite par le Dr M.S. Bertoni (botaniste suisse) en 1899, la recherche et la commercialisation du Stevia connurent des débuts hasardeux.

Vingt ans après la découverte de la plante par le Dr M.S. Bertoni, la présence de différentes substances sucrantes fut reconnue, mais c'est seulement en 1931 que l'isolation du stévioloside a été possible (Seidemann, 1976).

En 1921, elle est présentée comme une plante à fort potentiel commercial au département d'État de l'agriculture américaine.

En 1931, les chimistes français M.Briedel et R.Lavieille isolent les glycosides donnant le pouvoir sucrant ainsi que les stéviolosides et le rebaudioside par cristallisation. Malheureusement à cette époque, la technologie indispensable à une production industrielle n'existait pas stoppant ainsi son expansion (Lewis, 1992) .

Les Japonais seront les plus réceptifs à la Stevia et en 1954 lancent sa culture. Les stéviolosides obtenus par extraction sont utilisés depuis les années 1970 dans l'industrie japonaise des denrées alimentaires . les restrictions d'utilisation des édulcorants artificiels au Japon limitaient leur usage. Dès lors, l'investissement dans la recherche et la commercialisation du stevia paraissait intéressante. C'est ainsi que la consommation du Stevia, en tant qu'agent sucrant usuel, s'est développée. Les Japonais l'utilisent non seulement parce qu'il est naturel et sans risques selon eux, mais également parce qu'il est non-nutritif.

Actuellement, 95 % de la production mondiale de stévioloside sont consommés au Japon et en Corée. Les 5 % restant sont principalement utilisés en Amérique du Sud, en Chine, ainsi qu'en Amérique du Nord (Serio, 2010).

Selon le professeur Aboudrar A, la Stévia en Afrique est expérimentée en Egypte et au Maroc depuis 2008. Récemment en Algérie la Stevia est expérimentée à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA).

II.2. Description botanique :

Stevia rebaudiana appartient à la famille botanique des Composées, également appelé Asteraceae, comme la marguerite, le pissenlit, le chrysanthème ou la chicorée.

C'est une plante subtropicale, petit arbuste d'une hauteur de 60 cm à 80 cm de haut en moyenne, à maturité. Elle se développe dans le sol sableux-argileux des hauts plateaux. On la trouve souvent à l'état sauvage par groupement de 2 à 3 plants (Dubau, 2010).

1) Les fleurs :

Les fleurs de *Stevia* sont petites blanches et auto incompatibles, ce qui nécessite des insectes pour une pollinisation croisée et pour la production de graines viables. Ces dernières apparaissent sur des têtes indéfinies, longues de cinq à sept millimètres, formant une « inflorescence » de deux à sept « cymes » (un axe principal terminé par une fleur et portant latéralement un ou plusieurs axes secondaires qui ramifient de la même façon). La floraison se situe en octobre - novembre, mais certains sujets fleurissent en hiver, et fournissent très peu de semences (Soejarto, 2002 ; Aboudrar, 2009).

2) Les feuilles :

Elles sont ovoïdes, opposées, couvertes d'un fin duvet blanc, larges d'environ 1 à 2 cm et longues de 3 à 5 cm. Elles sont velues sur leurs bords et portent trois nervures. En général les feuilles sont elliptiques et crénelées (bord marqué de sinuosités (Aboudrar, 2009), elles contiennent 40% de substance soluble dans l'eau. Et d'un saveur très agréable. « Le goût particulièrement sucré de la *stevia rebaudiana* est unique, il est dû à la présence de stévioloside et de rebaudioside ». (Barbet – Massin, 2015).

3) Les tiges :

Le tronc ou tige principale de la plante présente un aspect légèrement noueux, produit de multiples ramifications ce qui en fait une plante assez dense en feuillage. Les tiges sont comme les feuilles, couvertes d'un fin duvet blanc. Les tiges sont faibles, semi-ligneuses (sont pas aussi tendres que la partie herbacée, mais pas aussi dures que la partie ligneuse) et portent des feuilles opposées (Aboudrar,2009).

4) Les racines :

La plante est dotée de racines solides, portant de nombreuses « pousses » qui se développent seules si on les sépare de la plante mère. Les racines sont de forme cylindrique et très peu ramifiées, filiformes et denses (Soejarto,2002 ; Barbet – Massin,2015).

5) Les graines :

Les graines de Stévia sont très petites, environ 3 mm de longueur et portent a leur extrémité des poils fins persistants (aigrettes ou pappus duveteux) qui leur permettent d'être dispersé par le vent. Seules les graines de couleur foncée (noir, marron foncé) possèdent un pouvoir germinatif. Les graines plus claires (marron clair ou vert) ne sont pas fertiles, les fleurs n'ayant pas été pollinisées au moment voulu (Goettemoeller et Ching, 1999 ; Soejarto,2002;).



Figure 01 : la partie aérienne
Stevia rebaudiana



Figure 02 : fleurs de
Stevia rebaudiana

II.3. Taxonomies et systématiques :

Selon la classification APGIII (angiospermes phylogénétique groupe) datant de 2009 et étant la plus utilisée, Il existe plus de 200 espèces appartenant au genre *Stevia* (environ 230 connues à ce jour). *Stevia rebaudiana* est la seule qui a la capacité sucrante (Yadav,2011) .

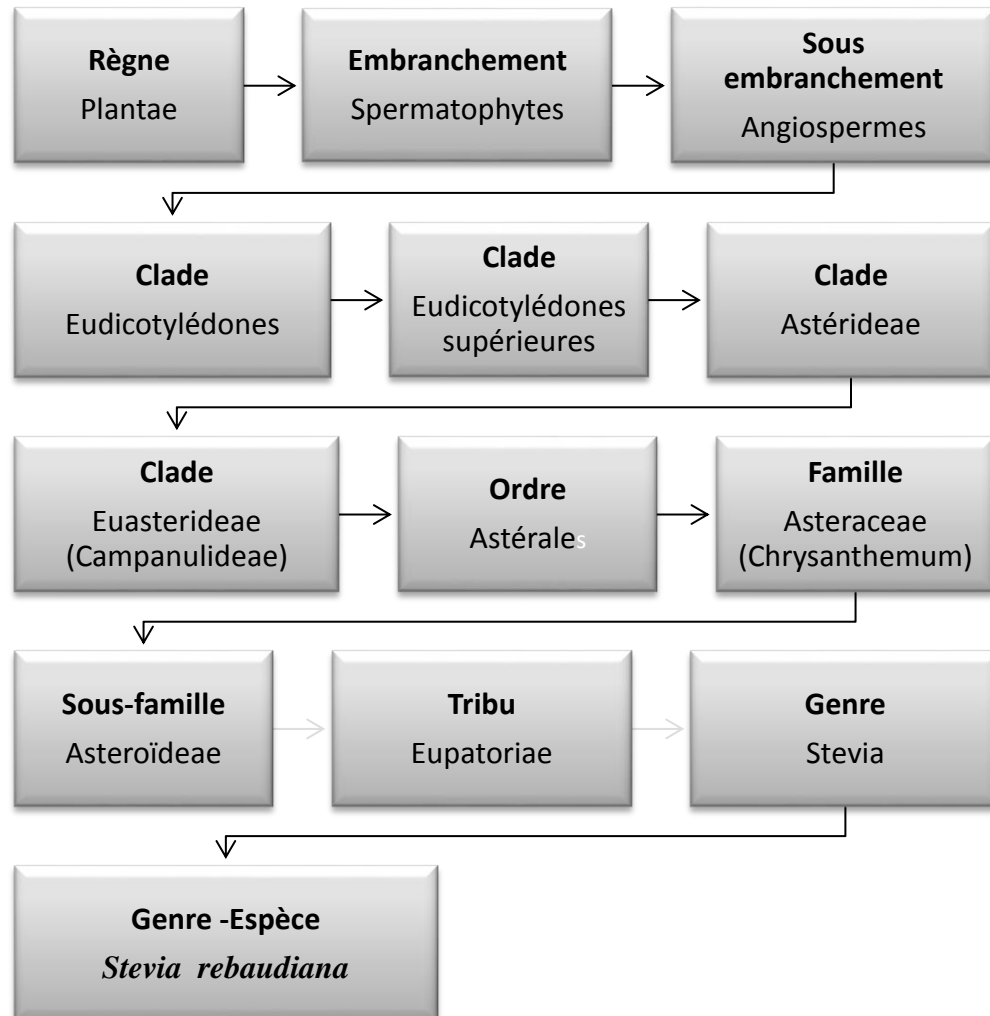


Figure 03 :Classification APG III de la *Stevia rebaudiana*

II.4. Noms vernaculaires :

La plante est couramment appelée « Stévia », « Chanvre d'eau » ou « Plante à sucre » dans le langage quotidien. Elle possède aussi des noms vernaculaires qui sont différents selon les pays (Midmore et al,2002 ; Ferreira, et al., 2006) .

- **En France** : on la nomme « herbe sucrée du Paraguay »
- **En Espagne** : elle s'appelle « Yerbadulce »

- **En Angleterre :** elle possède plusieurs noms comme « sweet plant », « sugarleaf », « sweetherb », « honeygrass »...
- **Au Paraguay,** les Indiens Guaranis l'ont tout d'abord nommée « Ka'airete » dont la signification est « feuille comme du miel ». Aujourd'hui ces Indiens l'appellent « Ka'ah'e » c'est-à-dire « feuille douce ». Néanmoins plusieurs orthographes sont possibles et il n'est pas étonnant de retrouver ces diverses écritures : Caà-éhê, Kaa-hée ou Kaa-héo... (Soejarto,2002).

Dans certaines tribus elle porte le nom de « azuca-ka' », qui est proche du mot « azucar » c'est-à-dire « sucre » en espagnol (Bloino ,2009 ; Dubau ,2010) .

II.5. Utilisations en médecine traditionnelle :

Les Indiens Guaranis utilisent les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni pour sucrer leur thé. *Stevia rebaudiana* est utilisée dans la médecine traditionnelle en Amérique du Sud. Certaines tribus considèrent qu'elle possède des propriétés contraceptives, antidiabétiques et anti-hypertensives (Soejarto,2002) .

Au Paraguay, l'effet contraceptif est obtenu par infusion de feuilles alors que l'effet antidiabétique est obtenu par décoction. Les autres propriétés que les Indiens Guaranis lui reconnaissent sont la prévention des caries, l'élimination de la plaque dentaire, l'aide à la digestion, la stimulation intellectuelle, le traitement de la peau (l'action anti-séborrhéique), ainsi que des effets antimicrobiens et antifongiques.

En effet la médecine traditionnelle l'utilise aussi dans les cas de diabète, d'hypertension et comme contraceptif, l'aide à la digestion, la stimulation intellectuelle, l'hygiène bucco-dentaire (tonique, prévention de la carie, élimination de la plaque dentaire), la régulation de l'hypertension, l'effet antimicrobien, le traitement de la peau (anti séborrhéique) et un anti fongique (Richard,1996 ; Wilkens et al 2008) .

II.6. Utilisation actuelle :

Stevia rebaudiana est aujourd'hui utilisée comme agent édulcorant et appartient aux additifs alimentaires naturels, elle est importée en Algérie comme édulcorant pour sucrer certaines boissons rafraichissantes.

Seules les feuilles de *Stévia* possèdent des composés fortement sucrés donnant à la plante ses vertus édulcorantes, les autres organes de la plante (tiges, fleurs, graines) sont traités et permettent de produire de la nourriture pour animaux et des engrais (Penner et al,2004).

La *Stévia* peut être utilisée avec ou sans transformation, soit sous forme de poudre de feuilles séchées, soit sous forme d'extraits standardisés, en général les feuilles fraîches sont utilisées dans la préparation de sauces et surtout de tisanes. Les feuilles, fraîches ou sèches, sont utilisables en cuisine (Midmore et Rank,2002).

Actuellement, le marché le plus important pour la *Stévia* est celui de l'industrie alimentaire et des boissons. En effet, elle est principalement utilisée comme édulcorant. Vient ensuite le marché de la santé (Barbet – Massin ,2015).

II.7. Autre utilisation de la stevia :

Les feuilles broyées de *Stevia* peuvent également s'utiliser pour leur vertus cosmétiques : en dentifrice, en gommage, en masque, pures ou mélangées avec de l'aloé vera, de l'argile ou des huiles essentielles pour leurs vertus purifiantes et cicatrisantes (Midmore et Rank,2002).

III. La composition chimique de Stevia:

- Les feuilles de *Stevia rebaudiana* contiennent des protéines végétales (polypeptides), des lipides et des mono- et polysaccharides, dont des fibres, qui correspondent aux métabolites primaires. Des vitamines et des minéraux, dont des oligo-éléments, seraient également présents (voir tableau 01) (Brandle,1998 ; Wölwer-Rieck,2012) .
- Les métabolites secondaires isolés dans les feuilles de stevia correspondent à des flavonoïdes et des diterpènes, ainsi que des triterpènes, comprenant des stérols,de la chlorophylles ,les acides organiques (Gardana et al, 2010) .Les dérivés diterpéniques sont les plus nombreux et sont sous forme glycosylée (Melis,1995 ; Yadav,2011) .

- L'huile contenue dans cette plante présente 100 constituants, dont 54 ont été analysés : Huile de néroli, du géranjol, de l'alcool de benzyl et de citron etc... Les huiles éthériques sont présentes à 0,1% dans le feuillage, et à 0,4% dans les fleurs (Simons,2009).

Tableau 01 : Composition en minéraux, vitamines, lipides et protéines de *Stevia rebaudiana*

| Pourcentage% | Composé |
|--------------|--------------------------------------|
| - 11,2% | - Protéines végétales (polypeptides) |
| - 5,65% | - lipides |
| - 52,84% | - hydrates de carbone |
| - 15,2% | - fibres |
| - 0,62% | - calcium |
| - 1,78% | - potassium |
| - 0,0039% | - chrome |
| - 0,0025% | - cobalt |
| - 0,0039% | - fer |
| - 0,349% | - magnésium |
| - 0,0147% | - manganèse |
| - 0,318% | - phosphore |
| - 0,0025% | - sélénium |
| - 0,0132% | - silicium |
| - 0,0015% | - zinc |
| - 0,0015% | - étain |
| - 0,0075% | - bêta-carotène |
| - 0,011% | - rutine (un flavonoïde) |
| - 0,011% | - vitamine C |

(Tadhani et Subhash,2006)

- La feuille de *Stevia rebaudiana* contient un mélange complexe d'une dizaine d'hétérosides du steviol (ou stéviolides qui sont des glycosides de terpéniques) qui correspond en moyenne à 15% du poids sec (Dubau,2010).
- Le stéviolide et le rebaudioside A sont les constituants principaux en pourcentage et pour leurs propriétés édulcorantes mais sans apporter aucune calorie

supplémentaire. Dans les feuilles de Stevia, le taux d'édulcorant peut varier selon la proportion de rébaudioside A, C, D et E, de dulcoside A et de Glucosides sur le volume total .Ils peuvent varier de 4% à 20% du poids sec en fonction des cultivars employés et des conditions de culture (Lazarin et al, 2009). . La drogue sèche renferme 12 à 15 g de stéviol par kg de matière première. Les feuilles se conservent indéfiniment à l'état sec (Wagner,2012). Les principaux glycosides de stéviol et leur pouvoir sucrant sont cités dans le tableau 02):

Tableau 02 : Pouvoir sucrant des glycosides de stéviol ,ainsi que leur pourcentage dans la feuille de Stevia (Carakostas et al , 2012).

| Composé | %du poids sec | Pouvoir sucrant |
|-----------------------------|---------------|-----------------|
| Stéviolside | 15% | 150 - 250 |
| Rébaudioside A | 2 à 4 % | 200 - 300 |
| Rébaudioside B | traces | 150 |
| Rébaudioside C(Dulcoside B) | 1 à 2 % | 30 |
| Rébaudioside D | traces | 221 |
| Rébaudioside E | traces | 174 |
| Rubusoside | traces | 114 |
| Dulcoside A | 0,5 à 1% | 30 |
| Stéviolbioside | traces | 90 |

IV. Études pharmacologiques et toxicologiques d'extraits des feuilles de *Stevia rebaudiana*:

IV.1. Études pharmacologiques :

IV.1.1. Activité hypoglycémiant :

Des études pharmacologiques sur des rats diabétiques montrent que des extraits aqueux, méthanoliques et à base d'éther de feuilles de stevia sont hypoglycémiant . Il en est de même concernant des extraits benzo-acétoniques à fortes doses (200 et 400 mg/kg/10 jours) (Shivanna et al,2013). Les feuilles de stevia et les polyphénols extraits de ces dernières, augmentent le taux d'insuline dans le sang et auraient un rôle protecteur au

niveau des cellules du foie et des reins des rats diabétiques(Himanshu et al , 2011) . Il serait également possible que des extraits aqueux de feuilles de stevia, en améliorant la respiration mitochondriale et en inhibant la voie de la gluconéogenèse, puissent entraîner une hypoglycémie Comparative (Ferreira et al.,2006) .

Dans une étude clinique menée sur des volontaires humains les chercheurs ont pu ainsi montrer que la glycémie, mesurée après le traitement à base de *Stevia*, était significativement plus basse dans le groupe de personnes ayant ingéré l'extrait que dans le groupe témoin et ceci à chaque moment du test (Curi et al.,1986) .

IV.1.2. Activité hypotensive :

Des études menées sur des rats normotendus ayant ingéré des extraits aqueux de stevia (Melis ,1995) ainsi que sur des rats normo- et hypertendus (Melis ,1996) a yant ingéré des extraits bruts (nature de l'extrait non renseigné) de *Stevia rebaudiana* à des doses supérieures à celles utilisées en tant qu'édulcorant. Il a été observé une réduction de la pression artérielle par vasodilatation systémique et rénale, qui induit une hypotension due à une diurèse tout en conservant un taux de filtration glomérulaire constant chez les rats normotendus, un taux élevé chez les rats hypertendus et avec une augmentation du flux plasmatique. (Melis ,1996)

IV.1.3. Activité anti-infectieuse :

a) Activité antibactérienne :

L'extrait par l'eau chaude de *Stevia rebaudiana* Bertoni aurait un effet bactéricide spécifique contre des *Escherichia coli* entérohémorragiques et contre d'autres bactéries pathogènes d'origine alimentaire (Tomita-Toshio et al, 1997). L'extrait n'est actif qu'en milieu acide et n'a d'action ni sur les bifidobactéries (*Bifidobacterium longum* et *adolescentis*) ni sur les lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus* et *casei*). D'autres études ont été menées concernant des extraits de *Stevia rebaudiana* par différents solvants (acétate d'éthyle, acétone, chloroforme, hexane et eau) et ont aussi montré une potentielle activité antibactérienne (Tadhani, et al,2006 ; Jayaraman et al 2010 ; Gamboa, et al,2012

b) Activité antivirale :

Stevia rebaudiana Bertoni aurait une activité contre les rotavirus (Tadhani, et al , 2006) , qui sont les principaux responsables des gastro-entérites déshydratantes chez les enfants.

Les auteurs ont démontré que l'extrait par l'eau chaude de *Stevia rebaudiana* Bertoni avait une activité anti-rotavirus in vitro et qu'il inhiberait la réplication du rotavirus en empêchant la liaison du virus à la cellule (Thines, 2001 ; Morin, 2008) .

IV.1.4. L'activité anti-diarrhéique :

D'après (Shiozaki et autres, 2006), le Stevioside a un effet inhibiteur sur la contraction des muscles lisses intestinales .Ainsi, le stevioside peut être utile dans le traitement de la diarrhée résultant du hyper motilité intestinale, tel que le syndrome du côlon irritable et la maladie inflammatoire de l'intestin(Morin,2015).

Une possibilité thérapeutique de steviol et de ses analogues (dihydroisosteviol) dans le traitement de la diarrhée sécrétrice, qui résulte principalement de la sécrétion liquide intestinale excessive, a été récemment démontrée par (Pariwat et al, 2008) (Ena et al, 2013).

IV.1.5. Activités anti-inflammatoire et anti-tumorale :

Selon une étude menée par (Tomita-Toshio et al, 1997) le mélange de quatre dérivés du steviol (stevioside, rebaudiosides A et C, dulcoside A) a montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis d'une inflammation induite, chez la souris, et par ailleurs, le mélange a aussi inhibé la formation des tumeurs cutanées induites (Thines, 2001)

Il a aussi été démontré par (Brahmachari et al, 2011). que le rebaudioside A a une activité similaire à l'hydrocortisone (Thines , 2001).

IV.1.6. Activités anti-oxydante :

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait issu de *Stevia rebaudiana* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait éthanolique 70 % possède une activité antioxydante non négligeable (M. Hebi ·et al , 2015) .

IV.1.7. Effet cicatrisant :

Kuntal en 2012 a réalisé une étude sur le potentiel de cicatrisation de l'extrait aqueux de *stevia rebaudiana* chez les souris ;cette étude a démontré l'activité cicatrisante de l'extrait aqueux de la feuille du *Stevia Rebaudiana* et a prouvé son efficacité dans le rétablissement fonctionnel de la cicatrisation de façon dose dépendante. Le résultat peut être attribué aux phytoconstituants qui sont présents dans la feuille tel que les saponines, les diterpènes, les composés polyphénoliques, les tannins ,les flavonoides (Katarzyna,2015).

IV.1.8. Effets cardiovasculaires :

Une étude menée par Melis (1996) a montré que, quand on administre un extrait aqueux de feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* par voie orale à des rats normaux Wistar, on note une hypotension au bout de 40 jours. Ceci est induit par une vasodilatation systémique. L'extrait de *Stevia rebaudiana*, à des doses supérieures aux doses utilisées à des fins édulcorantes, est un agent vasodilatateur chez des rats mâles Wistar normo- et hypertensifs (Melis,1995 ;1996).

IV.1.9. Effet non cariogène :

Les sucres de diterpènes glycosylés ne sont pas libérés dans la cavité buccale donc le stéviolide n'est pas cariogène. Aussi c'est un antibactérien pour *Streptococcus mutans* et il permet de limiter la production d'acide lui donnant des propriétés pour la lutte et la prévention des caries (Berry et al, 1981).

Au Brésil, on ajoute de la Stévia aux pâtes dentifrices, parce qu'il est admis que cette plante prévient la formation de la plaque dentaire et des caries, alors que les Japonais apprécient la Stevia pour son action antiseptique et l'ajoutent aussi bien au chewing-gum sans sucre qu'à de nombreux dentifrices, bains de bouche, médicaments contre le saignement des gencives ou contre le mal de gorge (Leverrier ,2014).

- Outre les effets pharmacologiques cités, la Stevia est utile en cas de problèmes urinaires, d'affections rénales, d'œdèmes et de rhumatismes (Simonsohn,1997).

IV.2. Études toxicologiques :

IV.2.1. Toxicité aiguë :

Une étude menée par Medon,1982 a révélé que L'administration de stéviolide à des rongeurs n'entraîne aucun signe de mortalité à 14 jours avec une DL 50 entre 2 et 15 g/kg.

Selon Krejci,1992, l'administration intraveineuse de stéviolide à des chiens n'entraîne aucune modification des paramètres sanguins, plasmatiques ou de la fonction rénale, aucune altération significative de l'ultra structure rénale n'est observée

On peut donc conclure que le stéviolide est dépourvu d'effets aigus en terme de mortalité ou de néphrotoxicité (Rengassamy,2015).

IV.2.2. Toxicité subaiguë :

Mitsuashi 1996, en utilisant des doses de 0,1g/kg, 0,5g/kg, 2,5g/kg de stévioloside et de placebo sont administrés par voie orale pendant une durée de 30 jours, a constaté que le stévioloside ne semble pas présenter de toxicité subaiguë en voie orale (Muanda, 2010).

IV.2.3. Activité contraceptive :

Une étude expérimentale d'une décoction de feuilles et tiges de *Stevia rebaudiana* pouvait réduire d'environ 65% la fertilité chez les rates adultes en période de procréation. De plus, la décoction continuait à diminuer la fertilité pendant au moins 50 à 60 jours après l'arrêt de l'administration, sans affecter l'appétit et la santé des animaux adultes (Melis,1996).

V. Les édulcorants :

V.1. Définition :

Les édulcorants sont des additifs alimentaires qui jouent le rôle d'une alternative au sucre de table (ou saccharose) utilisés pour procurer une saveur sucrée aux denrées. Ils se doivent d'être stables, inertes et non toxiques. Ils désignent une substance autre que le sucre, d'origine naturelle ou synthétique. Leur pouvoir sucrant se définit par rapport à celui du saccharose qui est de 30 g/L à 20°C et ayant un pouvoir sucrant de 1 (Marchand, 2009 ; Parent-Massin, 2011).

Les caractéristiques idéales d'un édulcorant (EFSA, 2014) seraient de :

- ✓ Posséder une saveur sucrée sans arrière-goût
- ✓ Remplir les mêmes fonctions que le sucre qu'il substitue tout en ayant une charge
 - calorique la plus basse possible
- ✓ Être chimiquement stable et inerte physiologiquement
- ✓ Être non toxique
- ✓ Apporter les mêmes goûts et apparences au produit fini que les produits traditionnels
- ✓ pour être adopté plus facilement par le consommateur

Ils sont répartis en 2 groupes:

Les édulcorants nutritifs, de charge ou de masse qui ont un pouvoir sucrant limité équivalent à 1,5 fois supérieure à celui du sucre, voire inférieure. Il s'agit de sucres comme

le saccharose, le fructose, le galactose ou l'isoglucose qui sont des denrées alimentaires et des polyols (les plus connus étant le sorbitol, le xylitol, le mannitol, l'isomalt, le maltitol, le lactitol), ces derniers étant des additifs alimentaires (Parent-Massin, 2011; Amouyal et al ,2012) .

les édulcorants intenses ont la capacité d'être non nutritifs. Ils ont un pouvoir sucrant très élevé d'environ 300 fois plus par rapport au saccharose et ils possèdent une charge pondérale infime, voire nulle dans la denrée alimentaire ce qui les placent dans la catégorie des additifs alimentaires (Marchand, 2009) .

Les différents édulcorants existants peuvent être classés comme suit (figure 05) :

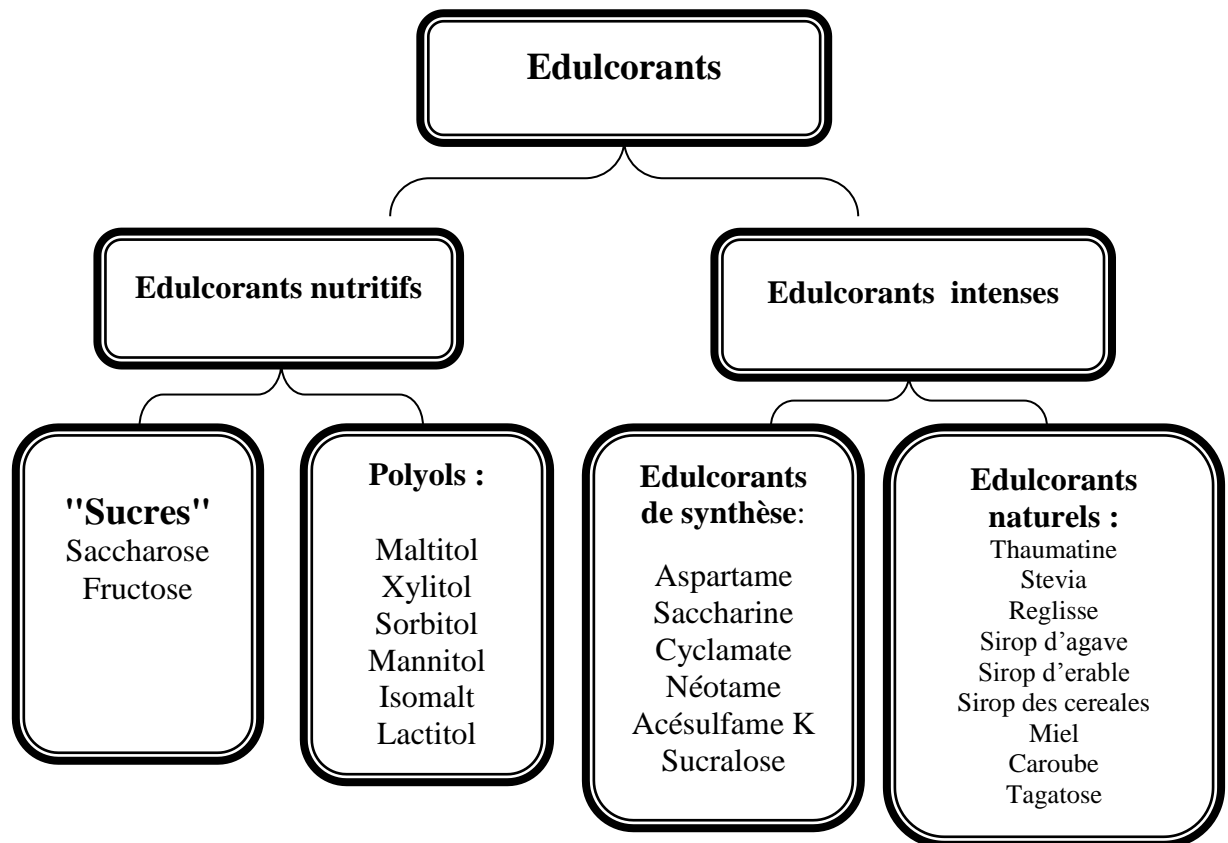


Figure 04: Les différents édulcorants (Amouyal , 2012) .

- ❖ *Stévia rebaudiana* entre parfaitement dans la définition des édulcorants intenses à l'exception du fait qu'elle est d'origine naturelle (Parent-Massin, 2011).

I. Matériel et méthodes :

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau des Laboratoires des Substances Naturelles, Pharmacotoxicologie, Microbiologie et d'Analytique du CRD- SAIDAL d'El Harrach, durant une période allant du mois de Janvier jusqu'au mois de Juin de l'année 2016 . Elle est portée sur des analyses phytochimique, pharmacologique et microbiologique (screening chimique, activité antioxydante, activité antibactérienne, et la toxicité aigüe) de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana*, ramenée de France conditionnée en boîte (figure 05).

Nous avons également complété ce travail par une étude histo anatomique et microscopique de la plante effectuée au laboratoire de botanique médicale et de cryptogamie de la Faculté de Médecine d'Alger.

I.1. Matériel :

I.1.1. Matériel végétal :

Il est constitué d'une poudre des feuilles séchées, qui a été ramenée de France conditionné en boîte (figure 05 A).

Concernant les coupes histoanatomique : la plante a été ramenée de l'Ecole Nationale Supérieure de l'agronomie ENSA (figure 05)

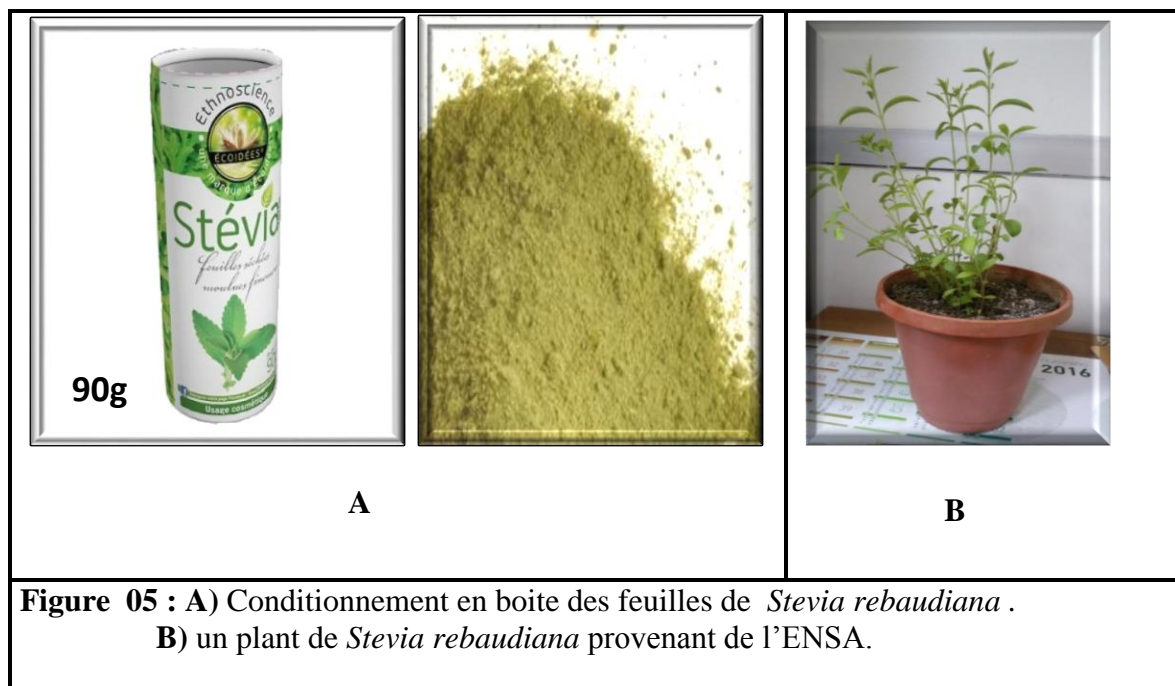


Figure 05 : A) Conditionnement en boîte des feuilles de *Stevia rebaudiana* .
B) un plant de *Stevia rebaudiana* provenant de l'ENSA.

Etude expérimentale

I.1.2. Les souches microbiennes :

Les souches bactériennes retenues pour le présent travail proviennent du laboratoire de microbiologie de centre de recherche et développement CRD-SAIDAL. Il s'agit de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et de deux levures (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*).

Tableau 03 : Caractéristiques des différentes bactéries et levures.

| Famille | Genre et espèce | Gram |
|---------------------------|--|-------------|
| Enterobacteriacées | <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | Négatif |
| Micrococcaceae | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | Positif |
| Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | Positif |
| Bacillaceae | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | Positif |
| Saccharomycetaceae | <i>Candida albicans</i> ATCC10231 | – |
| Saccharomycetaceae | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763 | – |

(ATCC: American Type Culture Collection)

I.1.3. Matériel animal :

- ✓ Souris albinos élevés au sein de l'Animalerie de l'institut pasteur (kouba)
- ✓ Sexe : mâle et femelle
- ✓ Poids : 19 à 21 g
- ✓ Alimentation : granulés (O.N.A.B)
- ✓ Boisson : eau de robinet ad libitum
- ✓ Condition d'hébergement :
 - Température : 20 à 24°c
 - Humidité : 50 %
 - Eclairage : 10 heures
- ✓ Nombre : 15

I.1.4. Matériel technique :

a) Verrerie et matériels de laboratoire :(voir annexe I).

b) Solvants et réactifs : (voir annexe I).

I. 2. Méthodes :

I.2.1. Etude histo-anatomique

Elle peut fournir des détails sur l'anatomie et la morphologie des principaux organes végétatifs.

Dans notre cas, elle consiste en l'observation microscopique des coupes fines réalisées à main levée et mise en évidence par la technique de la double coloration (décrite ci-dessous) :

a) Réalisation et coloration des coupes

A l'aide d'une lame à rasoir, on réalise des coupes transversales à main levée, sur les tiges et les feuilles. Les coupes doivent être très fines et faites sur les échantillons fraîchement récoltés.

La coloration des coupes obtenues se fait grâce à la technique de double coloration au vert de méthyle/rouge Congo, adopté au laboratoire de botanique médicale et de cryptogamie d'Alger, selon les étapes suivantes :

- Placer les coupes dans l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) diluée à 6%, pendant 20 minutes, afin de vider la cellule de son contenu, seules les parois cellulaires sont conservées.
- Rinçage abondant des coupes à l'eau pour expulser l'eau de Javel diluée.
- Passage des coupes dans l'acide acétique diluée, pendant 1 mn, pour neutraliser l'excès d'eau de javel, et rendre les parois cellulaires réceptives aux colorants, ce qui favorise et améliore la fixation de la coloration.
- Rinçage à l'eau, pour expulser l'excès d'acide acétique dilué.
- Coloration au vert de méthyle pendant 5 mn, ce dernier colore les parois lignifiées en vert.
- Rinçage à l'eau, pour chasser l'excès de vert de méthyle.
- Coloration au rouge Congo pendant 3min, ce dernier colore les parois cellulaires en rose.
- Rinçage à l'eau, pour chasser l'excès du rouge Congo.

b) Montage :

Le montage des coupes histologiques pour l'observation microscopique se fait comme suit :

- Placer la coupe choisie au centre d'une lame porte objet.

- Ajouter une goutte de glycérine diluée.
- Recouvrir d'une lamelle et lutage de la préparation avec du vernis à ongles (pour éviter la dessiccation de la coupe).
- Après le montage, observer au microscope optique aux différents grossissements.

c) Etude de la poudre végétale

Il s'agit d'une analyse microscopique de la plante pulvérisée, pour décrire les éléments cellulaires caractéristiques (avec, parfois quelques inclusions). Cette étude trouve son intérêt dans l'identification des poudres végétales commercialisées et dans la détection de leurs éventuelles falsifications par des éléments étrangers.

- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une petite quantité de poudre et la déposer sur une lame porte objet.
- Ajouter 1 à 2 gouttes du réactif de Gazet de Chatelier (Voir Annexe I) et recouvrir avec une lamelle.
- Examiner la lame d'abord, sans chauffage pour observer les éléments sensibles à la chaleur (ex. Pollen, oxalate de calcium...).
- Chauffer avec précaution à de nombreuses reprises (6 à 10 fois) jusqu'à ébullition. Le chauffage permet d'éclaircir les différents tissus et cellules et donc d'avoir une meilleure observation.
- Essuyer la face inférieure de la lame, éliminer l'excès du réactif avec du papier absorbant et la laisser refroidir.
- Examiner le montage au microscope optique au différent grossissement.

En balayant toute la surface de la préparation, nous devons chercher et noter les principaux éléments cellulaires qui constituent et caractérisent la poudre (leurs nature, abondance, forme, taille, couleur...).

I.2.2. Détermination de la teneur en eau ou l'humidité :

• Principe :

La teneur en eau est la quantité d'eau perdue par une substance dans des conditions bien déterminées de température. Il s'agit de dessécher les échantillons à analyser à la température de 100 à 105°C, puis calculer la perte de masse et l'évaluer en pourcentage (AFNOR, 1993)

- **Mode opératoire :**

1g de poudre de *Stevia rebaudiana* est mis dans une capsule préalablement pesée et tarée, puis introduit dans une étuve réglée à 105°C pendant 3 heures

Après refroidissement de 5 à 10 minutes environ dans un dessiccateur, la capsule sera pesée

La teneur en eau (H%) (exprimée en gramme pour 100 grammes de l'échantillon), est exprimée par l'équation suivante : (AOAC, 2000)

$$H \% = (M_1 - M_2 / M_1 - M_0) \times 100$$

M₀ : masse de la capsule vide en gramme

M₁ : masse de la capsule contenant l'échantillon avant l'étuvage en gramme

M₂ : masse de la capsule contenant l'échantillon après l'étuvage en gramme

I.2.3. Criblage phytochimique :

Il s'agit des tests phytochimiques qui consistent à détecter les différentes familles de composés existants dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Nous avons effectué le screening chimique pour mettre en évidence les alcaloïdes, les tanins, les tanins catéchétique, les tanins galliques, les saponines, les flavonoïdes, les iridoïdes (monoterpènes), les stérols et les triterpènes, les anthocyanes et les leucoanthocyanes, les quinones libres et combinés et les caumarines.

a) **Préparation de l'infusion :**

- ✓ Déposer 20 g de la poudre des feuilles séchées dans un bécher
- ✓ Ajouter 100 ml d'eau distillée, porter à l'ébullition
- ✓ Laisser infuser pendant 15 à 20 min.
- ✓ Couvrir afin d'éviter l'évaporation.
- ✓ Filtrer à l'aide d'un papier filtre puis réajuster le volume à 100 ml

Etude expérimentale

b) La recherche des différents composés physiologiquement actifs :

- **Détection des alcaloïdes :**

- ✓ Ajouter 5 ml du HCL (1 N) et quelques gouttes du réactif de Dragendorff à 0.5 g de la poudre des feuilles séchées
- ✓ Chauffer au bain marie pendant quelques minutes .
- ✓ La formation d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes.

- **Détection des tanins :**

- ✓ A 5 ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 2% ,
- ✓ la réaction donne une coloration bleue noire en présence des tanins

- **Détection des tanins galliques :**

- ✓ A 5 ml d'infusé rajouter 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de $FeCl_3$,
- ✓ la réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tanins gallique.

- **Détection des tanins catéchétiques**

- ✓ A 15 ml d'infusé additionner 7 ml de réactif de stiasny,
- ✓ la réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchétique.

- **Détection des saponines :**

- ✓ Prélever dans un tube à essai 10 ml de l'infusé déjà préparé et agiter vigoureusement pendant 2 min ,
- ✓ Laisser le tube au repos en position verticale pendant 15 minutes,
- ✓ La persistance de mousse après 15 minutes indique la présence de saponines dans l'échantillon.

- **Détection des flavonoïdes :**

- ✓ A 5 ml d'infusé additionner 5ml d'HCL et un copeau de Mg,
- ✓ chauffer au bain marie pendant quelques minutes;
- ✓ la réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

- **Détection des iridoïdes (monoterpènes) :**

- ✓ Prélever dans un tube à essai 5 ml de l'infusé déjà préparé
- ✓ Ajouter 1 ml de l'HCL concentré
- ✓ Chauffer au bain marie pendant quelques minutes
- ✓ La formation d'un précipité noir indique la présence des iridoïdes.

- **Détection des triterpènes et stérols :**

- ✓ Déposer 2 g de la poudre des feuilles séchées dans un becher

Etude expérimentale

- ✓ Ajouter 20 ml d'ether ethylique et laisser le mélange pondant 12 h
(macération) ensuite filtrer et compléter le volume a 20 ml d'ether ethylique
- ✓ Prélever 5 ml de l'extrait éthéré dans un tube a essai
- ✓ Ajouter 0.5 ml du chloroforme et 3 ml de l'H₂SO₄
- ✓ La formation d'un anneau rouge brunâtre révèle la présence des triterpènes et stérols .
- **Détection des anthocyanes :**
 - ✓ A 5 ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'ammoniaque ½ .
 - ✓ la réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes .
- **Détection des leucoanthocyanes :**
 - ✓ A 2 gramme de la poudre des feuilles séchées ajouter 20ml d'un mélange de propanol/acide chlorydrique (1/1) .
 - ✓ Chauffer au bain marie bouillant pendant quelque minutes
 - ✓ Une coloration rouge se développe en présence des leuco anthocyanes.
- **Détection des quinones libres :**
 - ✓ 2 gramme de la poudre des feuilles séchées humectes par 2ml d'acide chlorydrique 1N .sont mis en contact pendant 3 heures dans 20ml de chloroforme ; puis filtrer .
 - ✓ le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque ½.
 - ✓ Formation d'une coloration rouge en présence des quinones libres
- **Détection des quinones combinés :**
 - ✓ A 2 gramme de la poudre des feuilles , additionner 5ml d'acide sulfurique 2N et et quelques gouttes d'ammoniaque ½
 - ✓ Porter a reflux pendant 2 heures.
 - ✓ La réaction donne une coloration rouge en présence des quinones combines
- **Détection coumarines :**
 - ✓ Faire bouillir a reflux 2 g de la poudre des feuilles séchées dans 20ml d'alcool éthylique pendant 15min puis filtrer.
 - ✓ A 5 ml du filtrat rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH a 10% et quelque gouttes d HCL a 10%.
 - ✓ La formation d'un trouble indique la présence des coumarines.

I.2.4. Extraction des stévioides :

L'extraction est une étape importante impliquée dans la découverte des composants bioactifs des plantes médicinales. Parmi ces composés les polyphénols qui sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide, Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour les extraire à partir des matières végétales.

I.2.4.1. Préparation de l'extrait méthanolique brut par extraction au Soxhlet :

a) But :

Extraction des stévioides et leur caractérisation physico-chimique de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana*, afin de déterminer le composé majoritaire .

Dans ce travail nous avons choisi l'extraction au soxhlet qui est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide –liquide (voir figure 13).

b) Principe :

Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition et la fraction condensée au niveau du condenseur se met en contact, par simple effet de gravitation, avec le matériel solide à extraire. Ce dernier se trouve dans une cartouche de papier épais dans le réservoir à siphon. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure toute la période de remplissage du réservoir, puis quand le solvant atteint le niveau maximal, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Le cycle se répète jusqu'à la décoloration du solvant au niveau du réservoir à siphon

L'extraction au Soxhlet est une technique classique utilisée pour l'extraction des composés polyphénoliques par un solvant, quoique, certains composés sont sensibles à la chaleur puissent se décomposer, Blême et Weller, (2006).

a) Protocole :

Une quantité de 5g de la poudre des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni est extraite avec 250 ml de méthanol en utilisant le Soxhlet pendant environ 4 heures de temps (ce qui fera

4 cycles). L'extrait est ensuite récupéré pour être évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (voir figures 12 en annexe).

b) Calcul du rendement :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

Ou:

P1 : Poids du ballon après évaporation

P2 : Poids du ballon avant évaporation

P3 : Poids de la poudre de *Stevia*

$$\text{Rdt} = \frac{175,1795 - 173,1508}{5,0137} \times 100$$

$$\text{Rdt} = 40,46\%$$

I.2.5. Caractérisation physico-chimique :

a) Purification de l'extrait méthanolique :

Pour pouvoir réaliser la caractérisation physico-chimique de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana*, ce dernier ne va pas être évaporé à sec mais il sera purifié ; Par manque de moyen, nous avons choisi une méthode classique et simple qui était la filtration sur du charbon actif

-L'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* est récupéré du Soxhlet (voir figure 14 en annexe)

-Laisser refroidir ;

-Ajouter environ 3g de charbon actif ;

-Mettre la solution sous agitation vigoureuse pendant 10 minutes, puis filtrer sur papier filtre (Whatman).

-Cette opération est répétée jusqu'à décoloration de l'extrait (voir figure 15 en annexe).

b) Identification des stévioides :

Elle est réalisée par plusieurs méthodes a savoir :

1) Identification par Infra-rouge :

La spectroscopie infrarouge compte parmi les techniques qui ont été appliquées avec le plus spectres infrarouges sont obtenus en faisant passer un rayonnement infrarouge à travers

Etude expérimentale

l'échantillon d'intérêt. Des bandes sont obtenues suite à l'absorption du rayonnement électromagnétique et sa conversion en mouvements moléculaires spécifiques, tels que les élongations des C-H, O-H, etc. (Hamm et al, 1998).

➤ **Protocole :**

L'extrait méthanolique purifié est concentré dans l'évaporateur rotatif puis il est analysé par le spectromètre d'absorption dans l'infra-rouge.

2) Identification par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC):

Principe :

C'est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange.

Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile (Kazakevich et Mc Nair ,1996).

Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps.

- Pour confirmer les constatations déjà faites en utilisant la spectroscopie infrarouge, nous avons utilisé la Chromatographie liquide à haute performance, nous avons comparé les temps de retentions des composés élués dans le Chromatogramme de l'extrait à ceux des différents étalons.

L'extrait méthanolique purifié et concentré est analysé par HPLC , le protocole sera le suivant :

➤ **Phase mobile :**

Tampon phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) à 0,01 M ajusté à pH 2,7 par l'acide phosphorique / Acetonitrile grade HPLC (68/32) (V/V)

➤ **Solution standard :**

Etalon stevioside dans le méthanol grade HPLC et étalon rébaudioside dans le méthanol grade HPLC.

Solution échantillon :

Extrait méthanolique purifié et concentré.

Conditions chromatographiques :

Colonne : C18 (25cm×4,6mm, 5µm).

Longueur d'onde : 210 nm.

Débit : 1ml/ml.

3) Scanning par spectrophotomètre d'absorption dans l'UV-Visible :

Le scanning par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible permet de définir les maxima et minima d'absorption des composés d'intérêt, Skoog et Douglas,(2007). Dans notre cas il s'agit de comparer les spectres obtenus avec les solutions étalon et échantillon .

➤ Protocole :

La solution échantillon qui est l'extrait et la solution standard (stévioside) ont été scannées par le spectrophotomètre d'absorption dans l'UV-Visible de 200nm jusqu'à 400 nm en utilisant le méthanol comme liquide de compensation.

I.2.6. Evaluation de l'activité antioxydante :

▪ But :

Evaluer la capacité de l'extrait méthanolique brut de *Stevia rebaudiana* ; à piéger les radicaux libres à l'aide d'un composé synthétique de radicaux libres DPPH.

▪ Principe :

Pour étudier l'activité antiradicalaire, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri, et al (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Wagner, 2012).

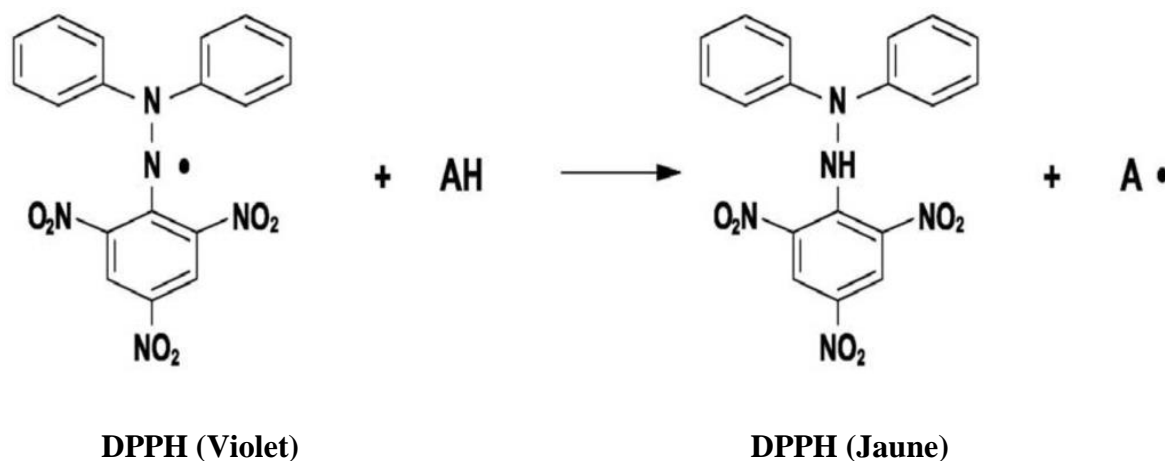


Figure 10: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

L'activité anti-oxydante de *Stevia rebaudiana* Bertoni a été évaluée, *in-vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres (agents antioxydants) et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al,1997 ; Burits et Bucar,2000).

I.2.5.1. Préparation de l'extrait méthanolique :

La méthode utilisée est l'extraction au soxhlet.

- 10 grammes de la poudre des feuilles de *Stevia rebaudiana* sont déposés dans une cartouche en cellulose et mis en contact avec 250ml de méthanol pendant 4 heures.
- La solution méthanolique est ensuite évaporée à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI). Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur verte foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

I.2.5.2. Préparation des dilutions :

Nous avons préparé une solution mère à une concentration de 300µg/ml, en faisant dissoudre 15 mg de notre extrait dans 50 ml de méthanol.

Pour la réalisation des différents tests, nous avons préparé cinq dilutions à partir de la solution mère, dosées à : 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml et 250µg/ml (voir figure 16).

Etude expérimentale

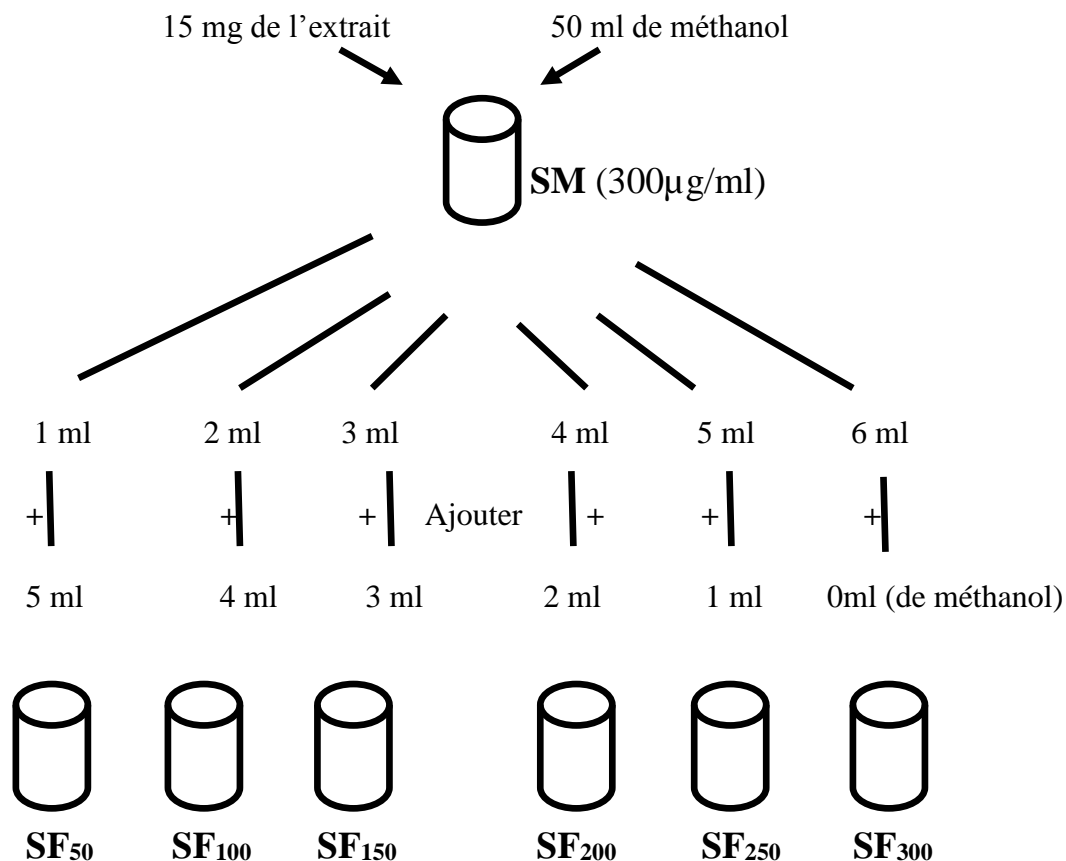


Figure 11 : Préparation des différentes concentrations à tester.

SM: solution mère, **SF :** solution fille.

I.2.5.3. Préparation de la solution du DPPH :

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2mg de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) dans 50ml de méthanol et est laissée sous agitation pendant deux heures de temps pour avoir une bonne solubilisation.

I.2.5.4. L'essai au DPPH :

- Introduire 1ml de la solution fille dans des tubes stériles.
- Ajouter 2ml de la solution méthanolique du DPPH.
- Après agitation, le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30minutes (Pour chaque concentration, le test est répété trois fois).
- Le contrôle négatif contient uniquement la solution méthanolique de DPPH.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'antioxydant standard : acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon test.
- La mesure de l'absorbance s'effectue à 517 nm par un spectrophotomètre d'absorption dans l'UV-Vis (**voir figure 17**).

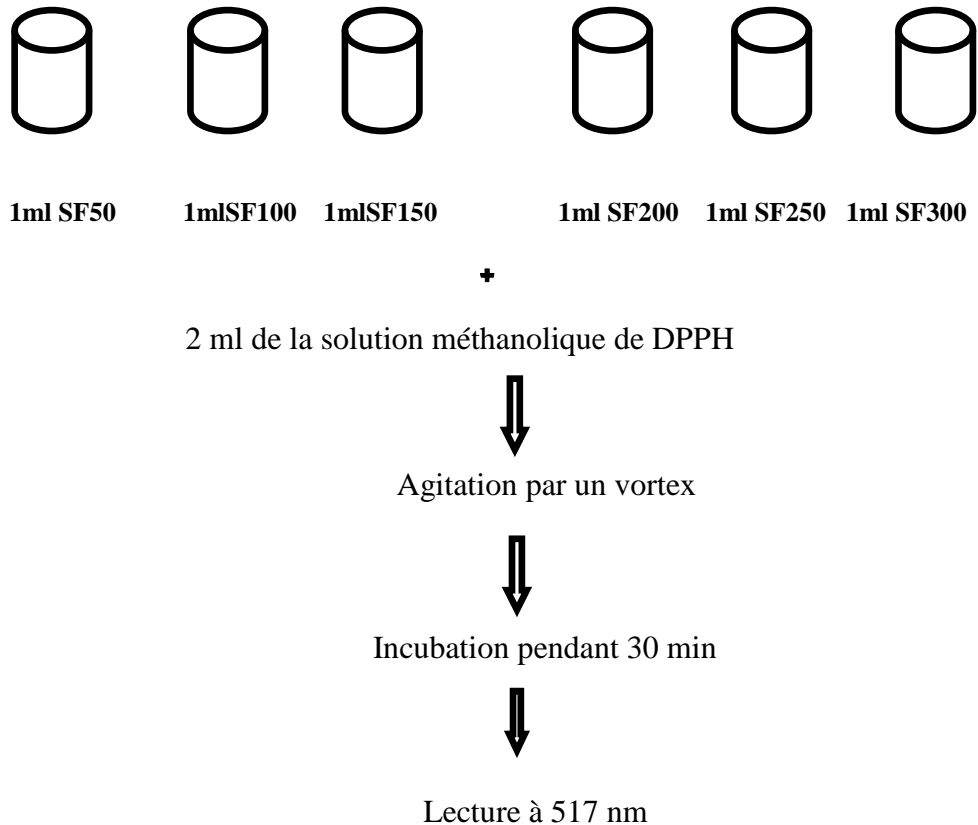


Figure 12 : Etapes à suivre pour le test au DPPH

I.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

1) Le Principe :

Consiste en la diffusion radial des composants de l'extrait de la plante en utilisant les disques en cellulose stériles de 9 mm de diamètre imprégnés de l'extrait aqueux de la plante sur un milieu gélosé préalablement coulé dans une boîte de pétrie et ensemencer par 10^4 UFC/ml de micro-organisme testés .

La lecture des résultats se fait par mesure du diamètre (en mm) de la zone d'inhibition .

Protocole expérimentale « AFNOR 1989 » :

a) Préparation des solutions aqueuses de l'extrait méthanolique brut:

- -l'extrait méthanolique sec est repris dans l'eau et préparer à deux concentration différentes :

Etude expérimentale

- solution concentrée : préparée en faisant dissoudre 2 gramme de l'extrait méthanolique dans 10ml de l'eau distillée ce qui correspond à une concentration de 20g/ml.
- solution diluée : préparée par la dissolution de 40mg de l'extrait méthanolique sec dans 10ml de l'eau distillée (0.4g/ml).

b) Préparation de la première couche

- ✓ Liquéfier le milieu de culture dans un bain-marie.
- ✓ Faire couler dans des boites de pétri aseptiquement et laisser sur la pailleasse.

c) Préparation de l'inoculum :

- ✓ Réaliser des suspensions microbiennes en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées à partir d'une culture jeune des bactéries et des levures à l'aide d'une anse stérile dans 10ml d'eau physiologique stérile.

d) Préparation de la deuxième couche du milieu :

- Liquéfier les milieux géloses MH et SAB dans un bain marie a 95C.
- Laisser les refroidir jusqu'à l'abaissement de la température a 45C.
- Faire repartir ces milieux dans des flacons de 50ml, puis ensemenecer chaque 50ml du milieu par 200 µl de la suspension microbienne prélevée a l'aide d'une micropipette.
- Agiter manuellement le flacon du milieu ensemenecé.
- Déposer rapidement 5ml de chaque milieu inoculé par l'une des suspensions microbiennes a la surface de la première couche de gélose solide dans la boite de pétrie correspondante
- Etaler immédiatement cette couche en faisant pivoter la boite sur elle-même pour avoir une surface uniforme.
- Laisser solidifier sur la pailleasse.

e) Dépôt des disques :

- Prélever aseptiquement un disque cellulosique stérile à l'aide d'une pince stérile.
- Imbiber ce disque avec les solutions préparées, celle-ci va être absorbée par le disque par capillarité.
- Déposer a la surface de la gélose préalablement préparée.
- Laisser les boites sur la pailleasse pendant 30min afin que l'extrait méthanolique diffuse sur la gélose.

Etude expérimentale

f) incubation :

- Incuber les boîtes de Pétri ainsiensemencées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures (voir figure 13).

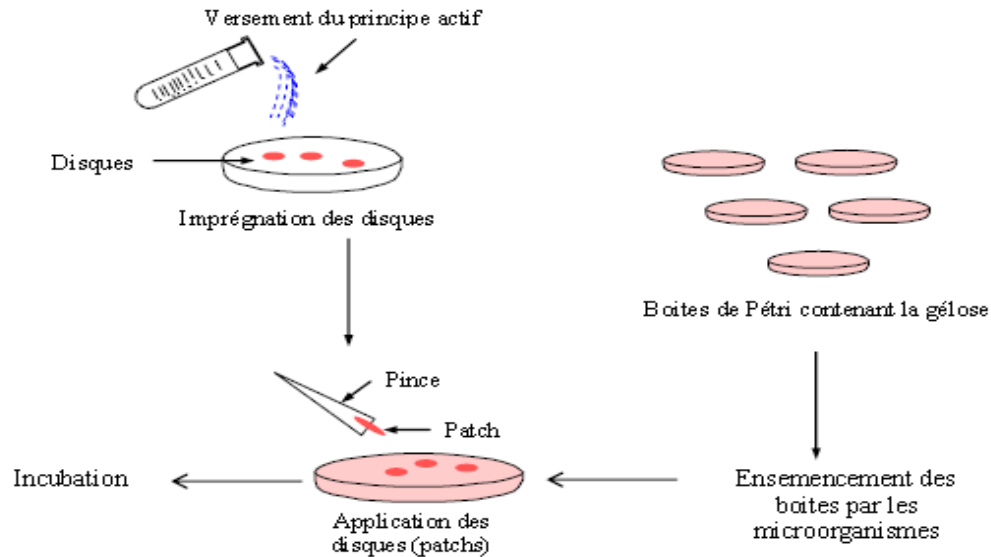


Figure 13 : Incubation et ensemencement des bactéries a la surface des boites de Pétri

g) Lecture :

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied a coulisse (y compris le diamètre de disque de 9 mm).

La sensibilité des extraits a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

Les diamètres des zones d'inhibition sont repartis en 4 classes pour un disque de 9mm :

- **Fortement inhibitrice** : lorsque le diamètre de zone d'inhibition est supérieur à 28mm (+++)
- **Modérément inhibitrice** : le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16mm et 28mm (++)
- **Légèrement inhibitrice** : le diamètre de la zone est compris entre 10mm et 16mm.(+)
- **Non inhibitrice** : lorsque le diamètre est inférieur a 10 mm (-)

I.2.7. Etude préliminaire de la toxicité aigüe :

▪ But

Evaluation de la toxicité aigüe de la poudre des feuilles séchées en utilisant l'essai limite de la méthode de l'ajustement des doses du protocole 425 de l'OCDE (2006).

➤ Préparation de l'infusé :

Un infusé a 10% (10 g de la poudre des feuilles séchées dans 100 ml de l'eau distillée) :

On a préparé cette infusé pour avoir une dose de 2.5g/kg




➤ Le protocole :

- Déposer 10 g de la poudre des feuilles séchées dans un bécher
- Ajouter 100 ml de l'eau distillée, portée à ébullition
- Laisser infuser pendant 15 à 20 min.
- Couvrir afin d'éviter l'évaporation.
- Filtrer à l'aide d'un papier filtre puis réajuster le volume à 100 ml

Un infusé a 20% (20 g de la poudres des feuilles séchées dans 100 ml de l'eau distillée) :

Nous avons préparé cet infusé pour avoir une dose de 5 g /kg .

- 20 g : le poids moyen des souris .

| | | |
|--------|---|---------|
| 0.04 g |  | 0.5 ml |
| 0.64 g |  | 8 ml |
| 80 g |  | 1000 ml |

0.5 ml : Le volume maximal de liquide qui pouvait être administré en une seule fois à une souris.

10 ml : le volume de la solution a préparée,

La concentration de la solution préparée = 80g/l.

I.2.7.1. Préparation des lots et administration

a) Préparation des lots :

- ✓ constituer 4 lots de 5 souris chacun
- ✓ le poids moyen des souris = 20 g
- Les animaux étaient privés de nourriture mais pas d'eau pendant la nuit précédant l'essai.

b) Le gavage :

- ✓ Bien tenir la souris, puis lui faire avaler la sonde.
- ✓ Une fois le bout de la sonde arrive à son estomac la substance est injectée doucement .le volume administré aux souris par la sonde est fixe à 0.5 ml.

- ✓ lot 01 : témoin : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'eau distillée
- ✓ lot 02 : chaque souris reçoit 0.5 ml de la solution du rebaudiaside A à la dose de 2g/kg
- ✓ lot 03 : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'infusé préparé à 10 %
- ✓ lot 04 : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'infusé préparé à 20 %

- ❖ Après l'administration de la substance, les animaux étaient à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures.

I.2.7.2. Observation

Après le gavage, les souris sont surveillées en permanence pendant 04 heures avec prise de notes sur les signes de toxicité apparentes.

Pour le reste de la période de l'expérience qui est de 14 jours les souris sont surveillées quotidiennement pour signaler s'il y a eu des morts ou des changements dans l'alimentation et la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux ou cliniques supplémentaires de toxicité.

Le jour J_{14} , toutes les souris restantes sont sacrifiées à la fin de l'étude et le nombre des souris déjà mortes est exprimé en pourcentage

II. Résultat et discussions :

II.1. Etude histo-anatomique :

Les résultats de l'étude histo-anatomique de la plante (tige, feuille et racine) montre que *Stevia rebaudiana* possède les principales caractéristiques structurales des dicotylédones (cambium, liber, bois hétéroxylé) justifiant donc sa position taxonomique.

L'étude histologique a révélé la richesse de la feuille et de la tige en poils tecteurs, caractérisant ainsi les Astéracées, de plus nous avons constaté la présence des cellules sclérifiées au niveau de la racine et l'absence des structures secondaires.

II.1.1. La tige :

- On remarque que les faisceaux criblo-vasculaires sont disposés sur un seul cercle ce qui est caractéristique des dicotylédones.
- La première couche représente un épiderme cutinisé avec des poils tecteurs pluricellulaires ce qui montre que l'organe est aérien (voir figure 14 et 15).
- On remarque également une symétrie axiale, un parenchyme cortical à méats entre le xylème et le phloème intercalé avec des amas de sclérenchymes, ce qui signifie que cet organe est une tige.
- Plus à l'intérieur on constate la présence d'un important parenchyme médullaire à méats. On constate aussi l'absence de poches sécrétrices sur cet organe.

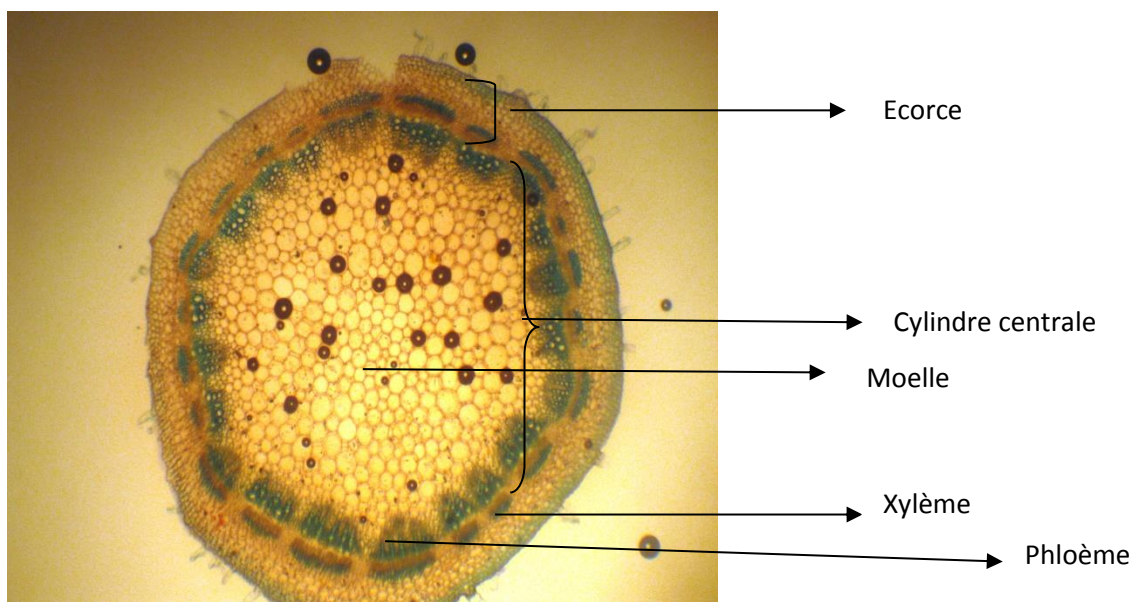


Figure 14 : Coupe transversale de la tige jeune de *Stevia rebaudiana* observée au microscope optique au grossissement (10X4)

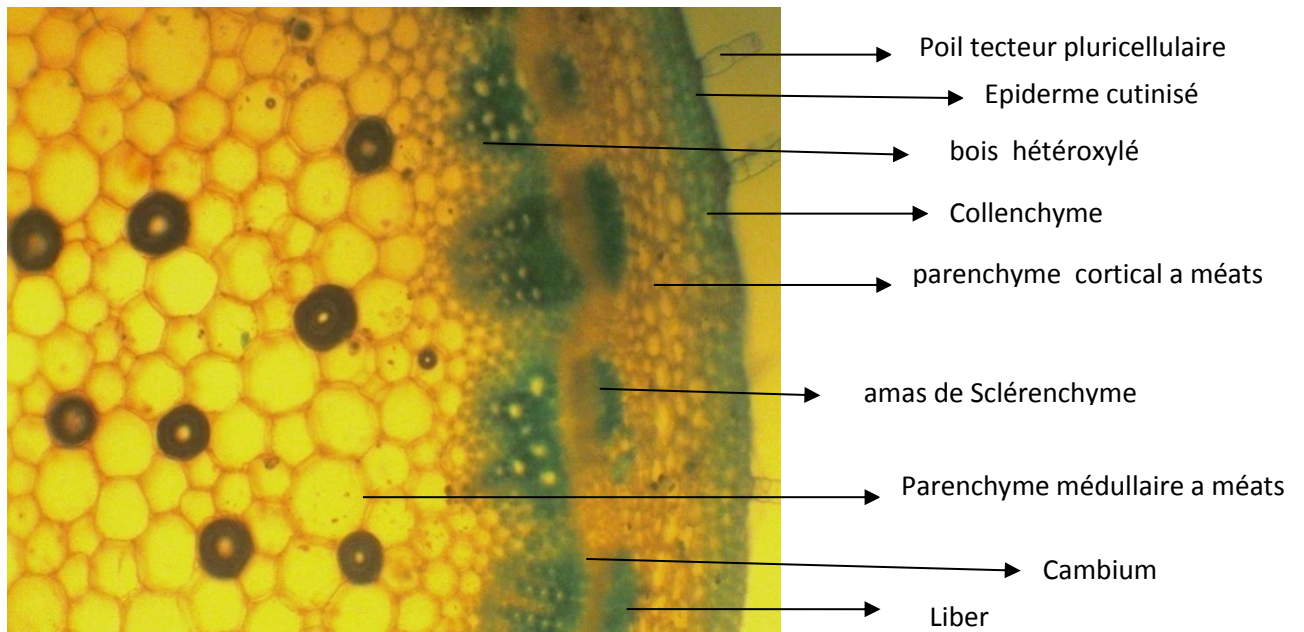


Figure 15: Portion d'une coupe transversale de la tige de *Stevia rebaudiana* observé au microscope optique au grossissement (10X10)

II.1.2. La racine :

- La coupe transversale de la racine montre de l'extérieur vers l'intérieur :
 - Le périderme, le parenchyme cortical a méats, des cellules scléreuses, un amas de sclérenchyme, un liber, un cambium, un bois hétéroxylé et une moelle .
 - On remarque la présence d'un périderme et du cambium ce qui est caractéristique des dicotylédones .
 - On observe également une symétrie axiale, un parenchyme cortical réduit avec des amas de sclérenchymes, la position du bois hétéroxylé centripète ce qui signifie que cet organe est une racine (Bruneton , 2009) (voir figures 16 et 17).

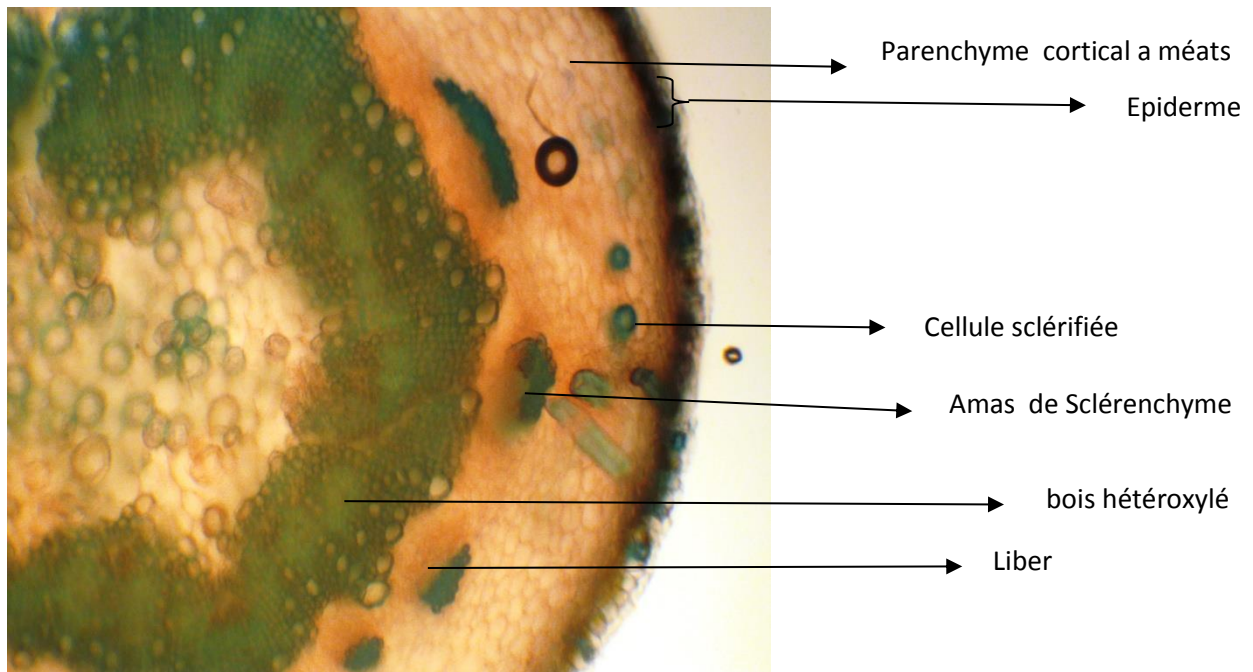


Figure 17:Portion d'une coupe transversale de la racine de *Stevia rebaudiana bertonii* observé au microscope optique au grossissement (10x10).

II.1.3. La feuille :

Les résultats de l'étude anatomique des feuilles du *Stevia rebaudiana* montrent que ces dernières présentent la structure générale de la feuille des dicotylédones (Judd et al,2002).

- On observe un épiderme, on remarque également une symétrie bilatérale et une forme aplatie, des poils tecteurs pluricellulaires. Cet organe est donc un limbe de feuille .
- Une nervure médiane très saillante abritée de faisceaux libéro-ligneux qui baignent dans du parenchyme cortical à méats Chaque faisceau libéro-ligneux est formé de bois et de liber. C'est une Dicotylédone (voir figures 18 et19).

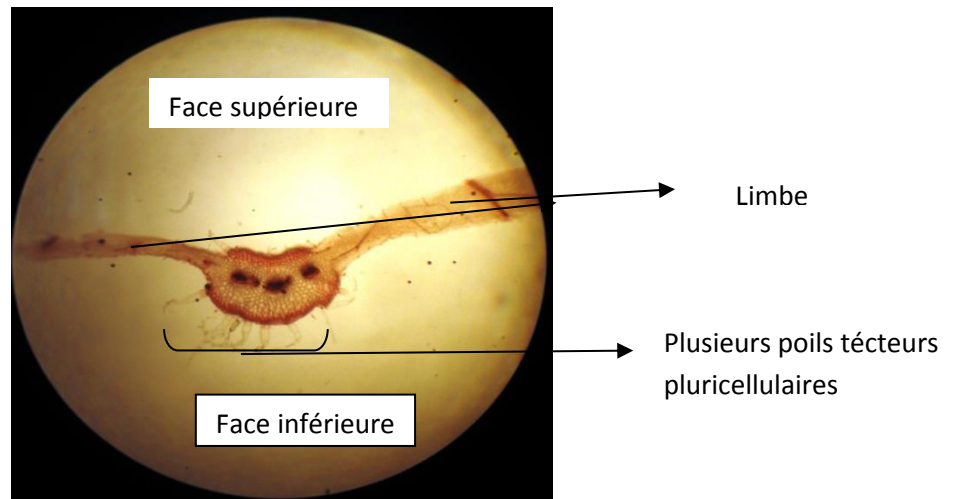


Figure 18 : Vue général de la coupe transversale de la feuille de *Stevia rebaudiana* observé au microscope optique au grossissement (10x4)

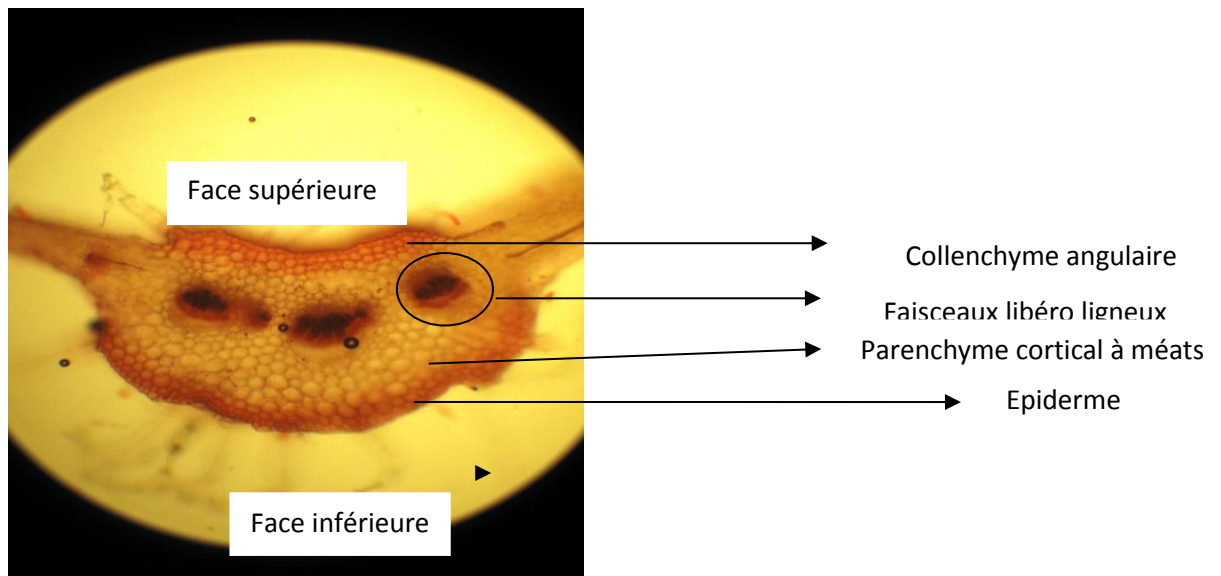
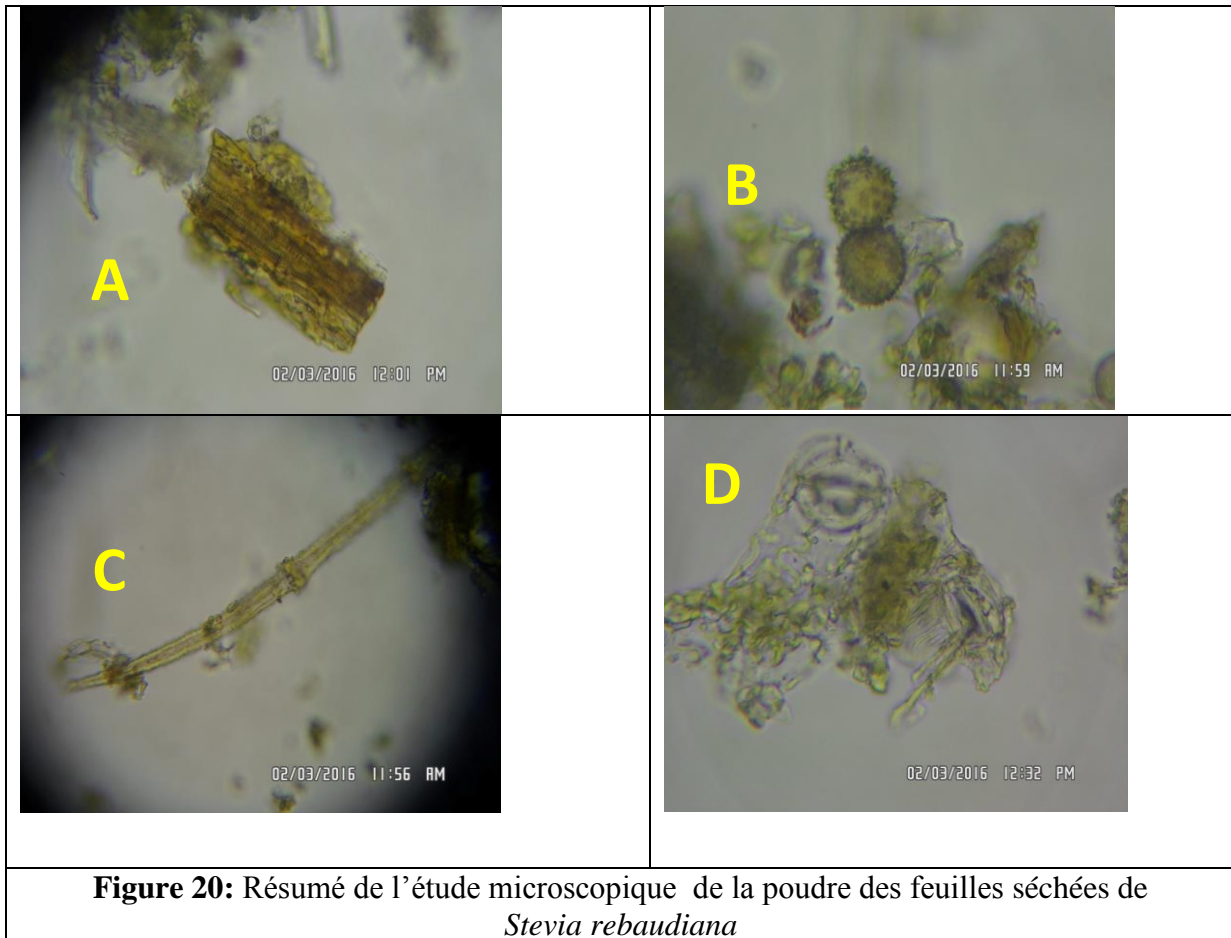


Figure 19 : Coupe transversale de la feuille de *Stevia rebaudiana* observé au microscope optique au grossissement (10x10)

Etude expérimentale

II.1.4. Etude microscopique de la poudre des feuilles séchées :

La lecture microscopique de la poudre des feuilles séchées à l'objectif X 40 a révélée l'existence des structure suivantes (figure 20) : Parenchyme palissadique, Stomate anisocytique , Grains de pollens à paroi echinulé caractéristique des Astéracées ,poils tecteurs abondants pluricellulaire.



- A : Fragment Du Parenchyme palissadique
- B : Grains de pollens à paroi echinulé caractéristique des Asteraceae
- C : poil tecteur pluricellulaire
- D : Stomate anisocytique

On remarque la présence de grains de pollen ,ce qui indique que la poudre commercialisée n'est pas pure a 100%.

II.2. Taux d'humidité :

Le résultat de la teneur en eau de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* est mentionné dans le tableau 04.

Tableau 04 : résultat de la teneur en eau de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* .

| | |
|------------------|---------------|
| Paramètre | Teneur en eau |
| Résultat | 7,4 % |

Selon le tableau 04, la teneur en eau de la poudre de feuilles sèches de *Stevia rebaudiana* est de 7,4% , cette valeur est proche de celles mentionnées par Mishra et *al.* (2010) ; Savita et *al.* (2004) et Kaushik et *al.* (2010) avec un intervalle de (7,0 à 7,7%). Abou-Arab et *al.* (2010) ont trouvés des valeurs inférieures avec 5,35 et 4,65% respectivement.

La variation de la teneur en eau des feuilles de *Stevia* peut être due à : l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, les différentes conditions environnementales (l'exposition aux conditions pédoclimatiques et la répartition géographique) .

II.3. Criblage phytochimique :

Les résultats du screening chimique réalisé sur la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* Bertoni sur (tableau 03) a révélé :

Tableau 05 : Résultats du screening chimique.

| N | Composés organiques | <i>Stevia rebaudiana</i> |
|----|------------------------|--------------------------|
| 1 | Alcaloïdes | +++ |
| 2 | Tanins | + |
| 3 | Tanins galliques | + |
| 4 | Tanins catéchétiques | - |
| 5 | Saponines | ++ |
| 6 | Flavonoïdes | +++ |
| 7 | Iridoides | +++ |
| 8 | Triterpènes et stérols | ++ |
| 9 | Anthocyanes | - |
| 10 | Leucoanthocyanes | - |
| 11 | Quinones libres | - |
| 12 | Quinones combinés | - |
| 13 | Coumarines | - |

Ou - : Absence totale ++ : Présence en quantité abondante
 + : Présence en trace +++ : Présence en quantité très abondante

La présence en quantité très abondante des : Alcaloïdes ; flavonoïdes et iridoïdes .

La présence en quantité abondante des tritérpènes et saponines.

La présence en trace des : tanins et tanins galliques.

L'absence des : quinones libres et combinés, des anthocyanes, des leucoanthocyanes, tanins catéchétiques et des coumarines, ce qui concorde avec les travaux de Siddique et al.(2014) qui ont rapporté que les constituants les plus abondants sont les alcaloïdes suivi par les tanins puis les saponines, tandis que Tadhani et Subhash, (2006) ont mentionné que les constituants les plus abondants dans la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* sont les tanins suivis par des alcaloïdes et des saponines

II.4. L'extraction des stévioides :

II.4.1. Identification par Infra-rouge : Voir le spectre en annexe

Tableau 06 : Interprétation du spectre obtenu avec l'extrait :

| Absorption caractéristique (cm ⁻¹) | Liaison présente |
|--|---------------------------|
| 3340 | O-H |
| 2973 | C=C-H , insaturation |
| 2885 | C-H |
| 1651 | >C=O |
| 1328 | C-O |
| 1045 | Ester, acide carboxylique |

Les vibrations d'élongation (C-H) des méthylènes et méthynes se situent entre 2919 et 2874 cm⁻¹. La bande caractéristique de la vibration de déformation des O-H est observée à 1348 cm⁻¹ quant à la large bande enveloppe caractéristique des différentes modes d'élongation O-H situées entre 3500 et 3200 cm⁻¹ . Les bandes de vibrations d'élongation C-O-C sont observées quant à elles entre 1150 et 1085 cm⁻¹.

Les bandes de vibrations des groupements ester exhibent des fréquences d'un mélange d'éthers. Ils montrent une bande intense entre 1260-1150 cm⁻¹ et une autre bande intense entre 1200-1000 cm⁻¹.

La figure 22 montre la structure chimique du stéviocide prétendu d'être majoritaire dans notre extrait.

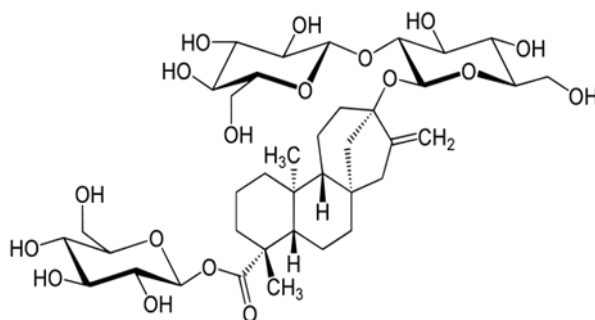


Figure 23 : Structure chimique du stéviol glycoside

Dans la région s'étendant de 3000 à 2500 cm^{-1} ; une remarquable bande intense à 2973 cm^{-1} relative au groupement méthyne (insaturation), une bande à 2885 cm^{-1} attribuée aux groupements méthyles, la bande dédoublée intense située à 1087 cm^{-1} et 1045 cm^{-1} révèle la présence de l'ester et de l'éther, en comparant les bandes caractéristiques des groupements fonctionnelles à la structure du composé nous constatons la présence de la majorité des groupements cités.

Notre résultat concorde avec celui trouvé par Inamake et al (2010).

La spectroscopie Infra Rouge à Transformer de Fourier (FTIR) de l'extrait est dominé principalement dans la région s'étendant de 3600 à 3200 cm^{-1} par une bande large caractéristique des groupements -O-H, de plus nous retrouvons une bande à 1380 cm^{-1} relative aux groupes hydroxyles vibrant dans le plan

II.4.2. Identification par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC):

Pour confirmer les constatations déjà faites en utilisant la spectroscopie infrarouge, nous avons utilisé la Chromatographie liquide à haute performance, nous avons comparé les temps de rétention des composés élués dans le Chromatogramme de l'extrait à ceux des différents étalons

Les chromatogrammes des étalons stéviol glycoside et Rébaudioside ont des temps de rétentions respectivement de 2,7 min et 7 min (Voir les chromatogrammes en annexes 2).

Le chromatogramme relatif à l'extrait montre deux pics majoritaires ; le premier à 2,57 min correspondant au stéviol glycoside constituant plus de 60% de la totalité de l'échantillon, le second situé à 7,5 min correspondant au Rébaudioside A. (voir la figure en annexe)

Selon des études réalisées par Asrul Afandi et al. (2013), Inamake et al (2010), Ena Gupta et al (2013) ; à l'état naturel, les feuilles de *stevia rebaudiana* Bertoni contiennent entre 5 et 10 % (w/w) de stéviol glycosides, selon les conditions climatiques, la saison, ... L'amélioration

Etude expérimentale

des conditions culturales, la sélection variétale, permettent aujourd'hui de disposer de cultures dont les feuilles ont des teneurs en stéviols glycosides supérieures à 20 % (w/w). Les proportions des quatre principaux stéviols glycosides sont les suivantes :

- Stevioside (5-10%)
- Rebaudioside A (2-4%)
- Rebaudioside C (1-2%)
- Dulcoside A (0,5-1%)

D'après ces données ; on peut confirmer que nos résultats concordent et se rapprochent de ces dernières ; ceci laisse à dire que notre extrait est majoritairement constitué par le stevioside puis le rebaudioside A (ceci est confirmé par les chromatogrammes des étalons) puis en proportions minoritaires par le rebaudioside C et le dulcoside A (tableau 07).

Tableau 07 : temps de retentions des différent composés.

| Temps de rétention (mn) | Identification du composé |
|-------------------------|---------------------------|
| 2,7 | Stéviocide |
| 2,9 | Dulcoside A |
| 7,1 | Rébaudioside A |
| 7,5 | Rébaudioside C |

II.4.3. Scanning par spectrophotomètre d'absorption dans l'UV-Visible :

Le scanning par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible permet de définir les maximas et minimas d'absorption des composés d'intérêt et dans notre cas de comparer les spectres obtenus avec les solutions étalon et échantillon.

Il est clair que le spectre obtenu avec la solution échantillon est identique à celui obtenu avec la solution étalon, ils présentent un maximum d'absorbance à 210nm (Voir les figures en annexe 2).

D'après l'analyse spectroscopique combiné à la chromatographie liquide, nous pouvons confirmer que le constituant majoritaire de notre extrait est bien le stéviocide.

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante :

Les résultats obtenus concernant l'extrait méthanolique de la poudre de *Stevia rebaudiana* Bertoni sont représentés dans le tableau 08 en annexe ; et figure 30:

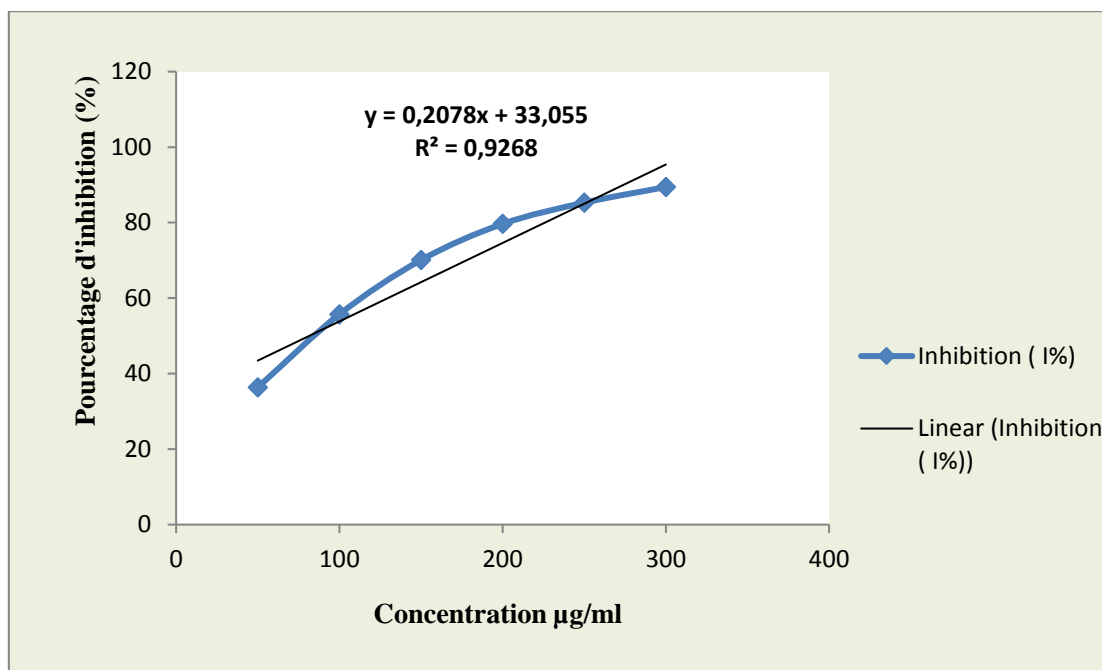


Figure 23 : Pouvoir reducteur de l'extrait Méthanolique de *Stevia rebaudiana* en fonction des concentrations.

La courbe (figure 23) a une allure exponentielle montrant une des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations .

On déduit que l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* a une activité anti-oxydante avec une concentration qui est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus pour l'acide ascorbique sont présentés dans le (tableau 07 en annexe 4 et figure 24).

Etude expérimentale

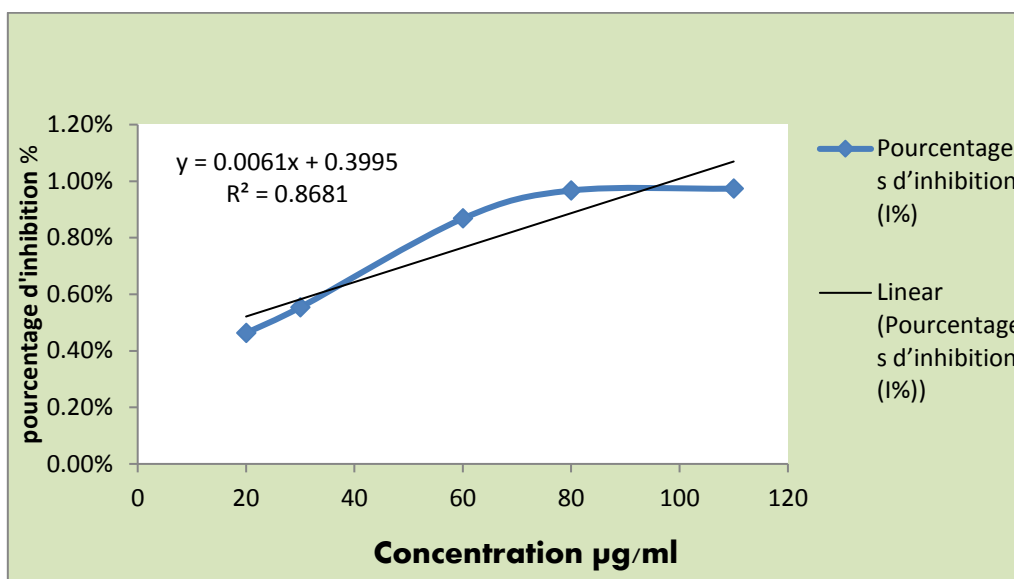


Figure 24: Pourcentages d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des concentrations.

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer une courbe croissante, présentant une phase stationnaire à partir de la concentration 80µg/ml qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire.

A partir de ces courbes, on a déterminé les concentrations inhibitrices de 50% de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana bertonii* et de l'acide ascorbique, qui figure dans le tableau 09 .

Tableau 10 : Concentrations effectrices de l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique.

| Echantillons | EC ₅₀ (µg/ml) |
|------------------------|--------------------------|
| L'extrait méthanolique | 81,88 |
| L'acide ascorbique | 25 |

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait issu de *Stevia rebaudiana* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que cet extrait méthanolique brut possède une activité antioxydante non négligeable. Avec un effet maximal de 89,42 % à la concentration de 300µg/ml, en comparaison à l'antioxydant standard (acide ascorbique) qui a montré un effet maximal de 97,35% à une concentration de 110 µg/ml.

La concentration qui piège 50 % des radicaux libres ou concentration effectrice (EC₅₀) a été déterminée pour l'extrait méthanolique et l'acide ascorbique respectivement à une concentration de 81,88 µg/ml et 25µg/ml.

Etude expérimentale

De ces valeurs, on déduit que l'extrait méthanolique de notre plante a une activité antioxydante concentration dépendante qui est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique ; mais il s'agit d'un extrait brut contenant un grand nombre de composés différents ; Il est donc très probable qu'il contient des composés majoritaires qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité plus importante.

Nous pouvons comparer nos résultats a une étude qui a été réalisées par Tadhani et al (2006) qui ont démontrées que les l'extrait des feuilles et la callosité du stevia constitueraient des sources d'antioxydants riches en phénols et flavonoïdes. Ils proposent donc d'incorporer, en plus du stéviol, les feuilles et la callosité dans les extraits. De cette façon, les édulcorants à base de stevia représenteraient des produits riches en antioxydants.

II.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

- Etude de l'effet inhibiteur d'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* :

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique de l'extrait methanolique de *Stevia rebaudiana* par la méthode de diffusion sur gélose ou la méthode du disque absorbant. La mesure du diamètre des zones d'inhibition y compris le disque (9 mm) permettent de déterminer cette activité antimicrobienne de cette plante in vitro. Le (tableau 11) indique les résultats des tests d'activité antimicrobienne des extraits issus de la plante *S.rebaudiana* sur les souches bactériennes d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Staphylococcus aureus*, *bacillus subtilis* , de *Candida albicans* , *Saccharomyces cerevisiae* .

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par l'extrait brut sontt exprimés en millimètre (mm).

| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| la solution concentre de l'extrait brut | 12 mm | 13mm | 19 mm | 16mm | <9mm | <9mm |
| La solution diluée d'extrait brut | 10mm | 10mm | <10mm | <10mm | <10mm | <10mm |

Etude expérimentale

Tableau 12 : Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut de *Stevia rebaudiana*

| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| la solution concentrée de l'extrait brut | + | + | ++ | ++ | - | - |
| La solution diluée de l'extrait brut | + | + | - | - | - | - |

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importante probablement du à leurs diversités structurales, Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes.

Selon l'échelle citée par Meena et Sethi(1994), on peut déduire que la solution concentrée de l'extrait méthanolique de *S.rebaudiana* présente une activité modérément inhibitrice sur *S.aureus* et *B.subtilis* et une activité légèrement inhibitrice pour *E.coli* et *P. aeruginosa* cette activité antibactérienne diminue et devient presque nulle en utilisant la même préparation mais a une concentration plus faible.

Les résultats indique aussi que les solutions aqueuses préparées à partir de l'extrait brut de *S.rebaudiana* n'ont pas une activité antifongique sur les 02 levures testées (*Condida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (ZI : <10mm)) (**figure 25 en annexe 3**)

Cette activité a été étudiée par plusieurs chercheurs (Debnath, 2008 ; Ghosh, Subudhi, et Nayak, 2008 ; Jayaraman et autres, 2008 ; Seema, 2010 ; Tadhani et Subhash, 2006) qui ont démontré que l'extrait concentré des feuilles de *Stevia rebaudiana* possède une activité anti bactérienne sur *Salmonella typhi*, *Aéromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus vulgaris* ...ce qui est comparable à nos résultats.

II.7. Etude de la toxicité aigüe :

- L'étude de la toxicité aigüe après administration par voie orale de 2g/kg (dose limite unique) de l'infusé de la poudre des feuilles séchées n'a indiqué aucun signe de toxicité. Il n'y avait aucun changement significatif de la consommation alimentaire ou de l'eau, ou du poids corporel pendant l'expérience.
- D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'infusé de la poudre des feuilles séchées est dépourvu d'effet aigüe, donc il peut être considéré comme une substance non toxique avec une DL50 supérieure a 5g/kg. Puisque il ya une analogie structurelle entre rebaudiosde A et le stevioside (compsants majoritaires des feuilles de *Stevia rebaudiana*) on peut donc comparer notre résultat aux études de Medon ,(1982); Toskulkao ,(1997) , qui ont montré que le stevioside est dépourvu de toxicité aigüe même à des doses très élevées (jusqu'à 15g/kg).

Conclusion et perspectives

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante riche en éléments nutritifs doux, naturels de la famille des Astéracées. Les feuilles de *Stévia* possèdent des composés fortement sucrés donnant à la plante ses vertus édulcorantes. Il s'agit des glycosides de stéviol, notamment le stéviolside et le rébaudioside A qui sont responsables de son goût sucré.

Outre cette propriété édulcorante, *Stevia rebaudiana* connaît actuellement, dans le monde entier, un intérêt croissant auprès des chercheurs, des agriculteurs, des grandes firmes commerciales et pharmaceutiques en raison de ses diverses vertus thérapeutiques et médicinales pour la santé humaine, en particulier pour les diabétiques et les personnes obèses, d'où l'intérêt porté par le Centre de Recherche et de Développement le CRD -SAIDAL à étudier cette plante qui est originaire du Paraguay.

Dans cette approche, nous avons fixé comme objectif l'extraction des steviolides possédants une saveur sucrée considérable que l'on peut estimer 300 fois supérieure à celle du sucre et nous avons obtenu les résultats suivants :

L'identification par (IR , HPLC et UV visible) de l'extrait de poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* a révélé que le constituant majoritaire est bien le stéviolside, le rébaudioside A ,et en proportions minoritaires le rébaudioside C et le dulcoside A .

Le screening phytochimique effectué sur les feuilles de *Stevie rebaudiana*, montre sa richesse en plusieurs composés et principes actifs tels que, les alcaloïdes ; flavonoïdes , monotérpènes ,tritérènes et stérols . L'abondance en ces principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier leurs multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles, elle est utilisée en tradithérapie notamment par les indiens guarani. .

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait issu de l'espèce *Stevia rebaudiana Bertoni*, selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante non négligeable, avec un effet maximal de 89,42 % à la concentration de 300µg/ml.

La solution concentrée de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* présente une activité modérément inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et une activité légèrement inhibitrice pour et *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité antibactérienne

Conclusion et perspectives

diminue et devient presque nulle en utilisant la même préparation mais a une concentration plus faible.

Les résultats indiquent aussi que les solutions aqueuses préparées à partir de l'extrait brut de *Stevia rebaudiana* n'ont pas une activité antifongique sur les deux levures testées (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*,

L'étude de la toxicité effectuée sur la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* indique que cette dernière est non-toxique .

Ces études restent préliminaires et méritent d'être complétées par d'autres travaux plus approfondis pour déterminer, d'une part les composés responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs rôles, pour cela il serait souhaitable de :

- ✚ Analyser quantitativement les composés chimiques contenus dans les feuilles par des méthodes adéquates, cela permettra de voir si dans le futur elle possède réellement un potentiel supérieur aux autres édulcorants.

En effet, elle possède des molécules prometteuses d'un point de vue thérapeutique. Cela permettrait de valider son innocuité ainsi que de trouver, peut-être, d'autres cibles thérapeutiques.

Nous espérons voir un jour le stéviolside et le rébaudioside A dans nos officines, en tant que principes actifs de spécialités anti-diabète ou anti-hypertension, pour le plus grand bien de nos patients.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABOU-ARAB A., ABU-SALEM M.F. 2010.** Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science.
2. **ASRUL A., SHAZANI Sarijan., RANAJIT KUMAR S. 2013.** Optimization of Rebaudioside A Extraction from *Stevia rebaudiana* (BERTONI) and Quantification by High Performance Liquid Chromatography Analysis.
3. **AMOUYAL C. ANDREELLI F. 2012.** Effets métaboliques des édulcorants. Réalités en nutrition et diabétologie. P 41: 25-28.
4. **AZE Y., TOYADA A., IMAIDA K., HAYASHI S., IMAZAWA T., HAYASHI Y., TAKAHASHI M. 1991.** Subchronic oral toxicity of stevioside in F344 rats. Bulletin of National Institute of Hygenic Science, P109: 48-54.
5. **BARBET - MASSIN C. 2015.** *Selectionner et cultiver Stevia rebaudiana bertoni en milieu tempere.* Exploration de la variabilite de la teneur et de la composition en glycosides de steviol. P : 21-22.
6. **BLOINO L. 2009.** Les edulcorants de synthese. Interet de sucralose par rapport aux autres edulcorants existants. P : 19-31.
7. **BRANDLE J.E., STARATT A.N., et GUZEN M. 1998.** *Stevia rebaudiana: It's agricultural, biological and chemicals properties.* Canadian Journal of Plant Science.. P78 : 527-536.
8. **BRUNETON, J. 2002.** Phytothérapie - Les données de l'évaluation, 256 p., Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Cachan.
9. **BRUNETON J., 2009.** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4^{ème} édition de médicales internationales (Tec et Doc), Paris: 1288. CHAABI M.
10. **BURITS M. AND BUCAR F,2000.** Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil- Phytother.Res. 14, P :323-328
11. **CARAKOSTAS M., PRAKASH I., KINGHORN A.D., WU C.D., SOEJARTO D.D. 2012.** Steviol Glycoside Dans : O' BRIEN NABORS L. Alternative Sweeteners : Third edition, revised and expanded New York, Marcel Dekker. P: 161.
12. **CONNER DE 1993.** Naturally occurring compunds. Antimicrobials in Food, ed. Davidson, P.M. and Branen, AL, New York: Marcel Dekker . P 441-468
13. **CUENDET, M., HOSTETTMANN, K. AND POTTERAT,O.,1997:** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta, 80,P 1144-1152.
14. **CURI R., ALVAREZ M., BAZOTTE R.B. 1986.** Effect of stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult Humans. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. P19 : 771-774.
15. **DELAVEAU, P. (1982).** Histoire et renouveau des plantes médicinales, 383 p., Albin Michel, Paris
16. **DICTIONNAIRE LAROUSSE** en Ligne – Edulcorants.
17. **DUBAU, C. 2010.** La *Stevia rebaudiana bertoni* ;Plante sucrée du Paraguay.P 7-10 ,32-41.

BIBLIOGRAPHIE

18. ENA G., SHALINI P., SHANTHY S., RAI C.K. 2013. Review Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana* .Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 7 (46). P : 3343-3353.
19. FOURNIER P. 1948. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editeur Paul Lechevalier. Tome II. P 504 : 286 -291.
20. GOETTEMOELLER J., CHING A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: Janick, J (eds) Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. P. 510–511.
21. GOYAL S., SAMSHER, GOYAL R. 2010. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a biosweetener: A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition.
22. GUARDANA GARDANA C., SIMONETTI P., CANZI E., ZANCHI R. PIETA P. 2003. Metabolism odstevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. J. Agri. Food Chem. P 51 : 6618–6622.
23. HAMDI-PACHA Y., BENYACHE F. BENAYACHE, S., BENAZZOUZ, M., SMATI, F. ET BENCHOUALA, C. 1993. Le moléculaire et l'effet de Caractérisation anti-bactérienne de quelques plantes algériennes : d'*Inula viscosa*L. et de *Centaurea pullata* L. Journal Algérien de Médecine 3 : P183-186.
24. HAMM P., LIM M.H., HOCHSTRASSER R.M. 1998. Structure of the amide I band of peptides measured by femtosecond nonlinear-infrared spectroscopy », *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, p. 6123.
25. HANDRO W., FERREIRA C.M. (1989). *Stevia rebaudiana*: Production of Natural Sweeteners. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medical and Aromatic Plants II. P 7 : 468-487.
26. HEBI M., EDDOUKS M. 2015. Évaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana* Evaluation of the antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* . Phytothérapie DOI 10.1007/s10298-015-0999-y.
27. HIMANSHU M., MANISH S., NARENDRA S. 2011. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia Rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences.P 3 : 242-248.
28. JAYARAMAN S., MANOHARAN M.S. et ILLANCHEZIAN, S. 2008. In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. P 7 : 1143-1149.
29. JUDD, W. S., C. S. CAMPBELL, E. A. KELLOGG, P. F. STEVENS, AND M. J. DONOGHUE. 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA
30. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 2011. Identification and Quantification of Major Steviol Glycosides in *Stevia rebaudiana* Purified Extracts by (1)H NMR Spectroscopy P 59 : 4378-4384.
31. KATARZYNA M., ZBIGNIEWK. 2015. *Stevia rebaudiana* Bertoni :chemical composition and functional properties. Acta Sci. Pol. Technol.Aliment., 14(2), 145–152. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.2.16.

BIBLIOGRAPHIE

32. KAUSHIK R., PRADEEP N., VAMSHI V., GEETHA M., USHA A. 2010. Nutrient composition of cultivated Stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology* .
33. KAZAKEVICH Y., MCNAIR H.,1996. Basic liquid chromatography. Textbook on High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
34. KOHDA H., KASAI R., YAMASAKI K., MURAKAMA K., TANAKA O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* P 15 : 981-983.
35. KONISHIMA T., TAKASAKI M. 2002. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. *Pure Appl. Chem.* P 74 : 1309-1316.
36. LAZARIN A. ; COUPLAN F. 2009. *Stevia le sucre vertueux*. Edition Sang de la Terre. Paris. 2009. p95.
37. LEVERRIER Z.2014. La Stévia : Une plante révolutionnaire dans le paysage des édulcorants actuels .P 14-17.
38. MANSOURI,A.,EMBAREK, E.; KOKKALOU,P.; KEFALAS, 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.*, 89: 411-420.
39. MEENA M.R., et SETHI V.1994. Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of Food Science Technology* P : 31 68-70.
40. MELIS M.S. 1995. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *Journal of Ethnopharmacology*.P28 : 129-134.
41. MELIS M.S. 1996. A Crude extract of *Stevia rebaudiana* increases the renal plasma flow of normal and hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* P 29 : 669-675.
42. MIDMORE, D.J., RANK, A.H., 2002. A new rural industrySteviato replace imported chemical sweeteners,RIRDC web publication, Project No. UCQ- 16A.
43. MIKHAIL TSWETT A. 1906. Adsorption analysis and chromatographic method. Application on the chemistry of the Chlorophylls. », *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, vol. 24, p. 384-393.
44. MISHRA P., SINGH R., KUMAR U., PRAKASH V. 2010. *Stevia rebaudiana*- A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* .
45. MORIN C. 2015. Le point sur les edulcorantsa base de stevia. P : 7-13,19-24.
46. MUANDA F.N. 2010. Identification de polyphenols, evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. P 27-32.
47. PARENT-MASSIN D. 2011. Edulcorants intenses : point d'actualité sur leur sécurité d'emploi et les dernières innovations. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. P 46.

BIBLIOGRAPHIE

48. **PENCHEV P.L. 2010.** Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plante par couplage de technique séparatives à basses et haut pression.Toulouse. P 239.
49. **PENNER R., SHANKS T., TIMCKE K., KRIGBAUM J., UNO J. 2012.** Stevia from Paraguay Document,P 1-2.
50. **RENGASSAMY C..2015.**La stévia (*Stevia rebaudiana*), sa place au sein des édulcorants et son avenir thérapeutique. P16-29,53-59.
51. **REVUE MEDICALE SUISSE – www.revmed.ch – 25 mars 2009.**
52. **ROCHETTE J.T. 1996.** Stevia rebaudiana Bert. (Astéracées): Etude bibliographique et expérimentale des diterpènes glycosylés. Thèse d'exercice : Lyon 1, P 134.
53. **SADOK G. 2009.** La phytothérapie. P 448.
54. **SALLE J.L 1991.**le totum en phytothérapie. Edition frisson roche, P13.
55. **SOEJARTO D.D. 2002.** Ethnobotany of Stevia and Stevia rebaudiana Dans : KINGHORN A.D.Stevia : The genus Stevia London, Taylor & Francis.P : 40-67.
56. **SERIO L. 2010.** La Stevia rebaudiana, une alternative au sucre .Phytothérapie P :26–32. © Springer-Verlag France 2010 DOI 10.1007/s10298-010-0526-4.
57. **SHIVANNA N., NAIKA M., KHANUM F., KAUL V.K. 2013.** Antioxydant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. Journal of Diabetes and Its Complications. P27 : 103-113.
58. **SHUKLA S., MEHTA A., MEHTA P. 2012.** Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia Rebaudiana Bert. Experimental and Toxicologic Pathology. P 64 : 807-811.
59. **SIMONSOHN B. (1997).** La Stévia rebaudiana : herbe douce des hauts plateaux du Paraguay : délicieusement sucrante, excellente pour la santé. Paris: Librairie de Médecis.
60. **SKOOG H., DOUGLAS A.,2007.** Principles of Instrumental Analysis 6th Edition.
61. **SOEJARTO, D.D., 2002.** Ethnobotany of Stevia and Stevia rebaudiana In :Kinghorn A.D. (Ed.),Stevia: The GenusStevia. Taylor and Francis, London and New York, P. 40–67
62. **TADHANI M.B., SUBHASH R. 2006.** In Vitro Antimicrobial Activity of Stevia Rebaudiana Bertoni Leaves. Journal of Pharmaceutical Research. P 5 : 557-560.
63. **THINES A-C.** La place de stevia rebaudiana au sein des edulcorants d'origine naturelle 2001. P 20-21, 31-41.
64. **TOMITA-TOSHIO S.N., ARAI T., SHIRAISHI, H.** Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from Stevia rebaudiana Bertoni towards enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and other foodborne pathogenic bacteria. P 1-5.
65. **TOSKULKAO C., CHATURAT L., TEMCHAROEN P.1997.** Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, ab dits metabolite, steviol, in several animal species. Drug chen. Toxicol, vol 20, n°1-2, p 31-44.

BIBLIOGRAPHIE

66. **TOYODA K., MATSUI H., SHODA T.1997.** Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. Food chem. Toxicol., vol 35, n° 6, p597-603.
67. **WAGNER V. 2012.** De Stevia rebaudiana à la Stévia : Parcours chaotique de L' « herbe sucrée » parmi les édulcorants. P 19-38.
68. **WOELWER R.U. 2012.** The Leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry P 606-886.
69. **WÖLWER-RIECK U. 2012.** The leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. P 60 : 886-895.
70. **WWW.DOCTISSIMO.FR** › Nutrition › Edulcorant › Zoom sur les édulcorants.
71. **XILI L., CHENGJIANY B., ERYI X. 1992.** Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. Food chem. Toxicol., vol 30, n° 11, p 957-965.
72. **YADAV A.K., SINGH S., DHYANI, D., AHUJA P.S. 2011.** A review on the improvement of stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)] P 1-2.
73. **YASUKAWA K., KITANAKA S., SEO S. 2002.** Inhibitory effect of stevioside on Tumor promotion by 12-O Tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Biological & Pharmaceutical Bulletin. P 25 : 1488-1490.
74. **Yu C., Xu K., Shi Y., 2011.** The spectrum model established for measuring the contents of Rebaudioside A and Stevioside quickly in the leaves of Stevia rebaudiana Bertoni. 2010 International Conference on Energy, Environment and Development (Iceed2010) P 5 : 855-861.



Figure 12 : l'évaporation de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* avec l'évaporateur rotatif



Figure 13: Dispositif du soxhlet

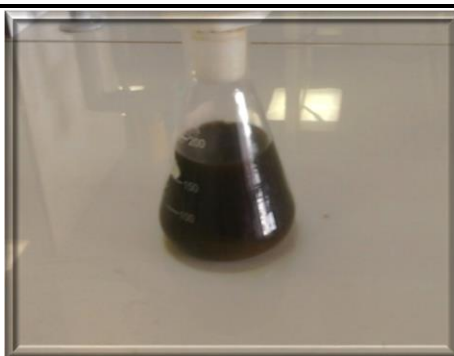


Figure (14) : Extrait brut méthanolique de *Stevia rebaudiana*



Figure (15) : Etapes de purification de l'extrait brut méthanolique de *Stevia rebaudiana* avec le charbon actif



Figure (18) : Evaporation à sec sous pression réduite de la solution méthanolique de *Stevia rebaudiana* dans un évaporateur rotatif.



Figure(19) : L'extrait méthanolique

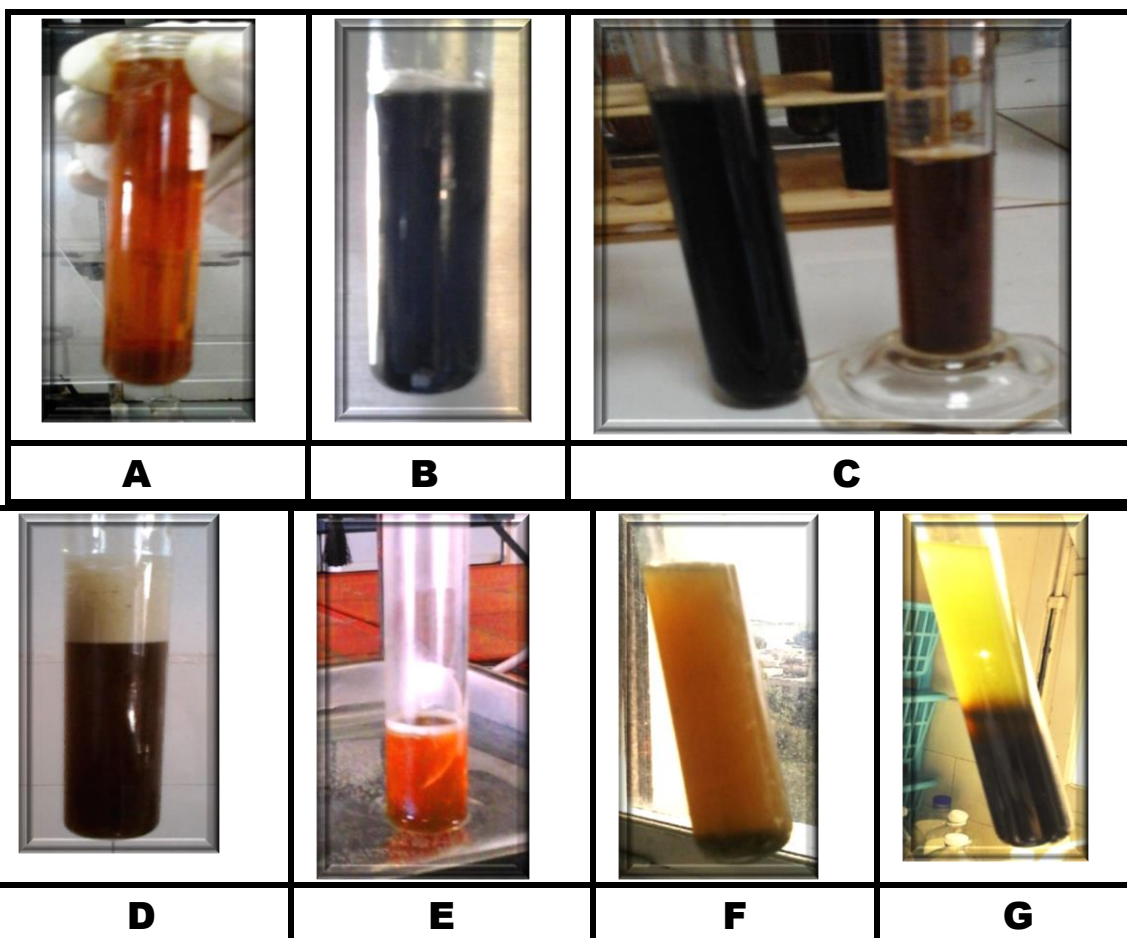


Figure 28 : Résultats du screening phytochimique de la poudre des feuilles séchées de *Stevia rebaudiana*

Annexe 3

Ou

A : Mise en évidence des alcaloïdes .

E : Mise en évidence des flavonoïdes

B : Mise en évidence des tanins.

F : Mise en évidence des iridoïdes (monoterpènes).

C : Mise en évidence des tanins galliques.

G : Mise en évidence des triterpènes et stérols

D : Mise en évidence des tanins catéchiques.

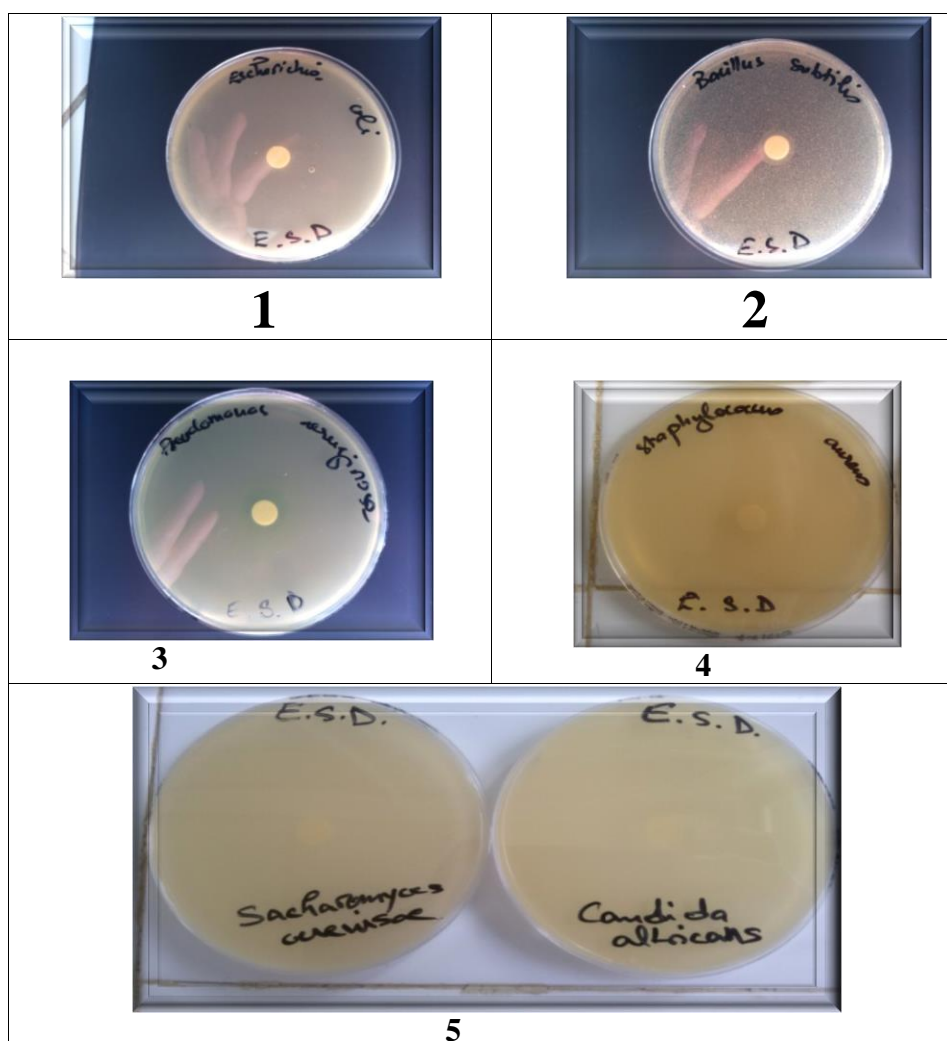


Figure 32: L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait méthanolique dilué de *Stevia rebaudiana*

Ou :

1 : L'effet de l'extrait dilué sur *Escherichia coli*.

2 : L'effet de l'extrait dilué sur *Bacillus subtilis*.

Annexe 3

3 : L'effet de l'extrait dilué sur *Pseudomonas aeruginosa*.

4 : L'effet de l'extrait dilué sur *Staphylococcus aureus*.

5 : L'effet de l'extrait dilué sur *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

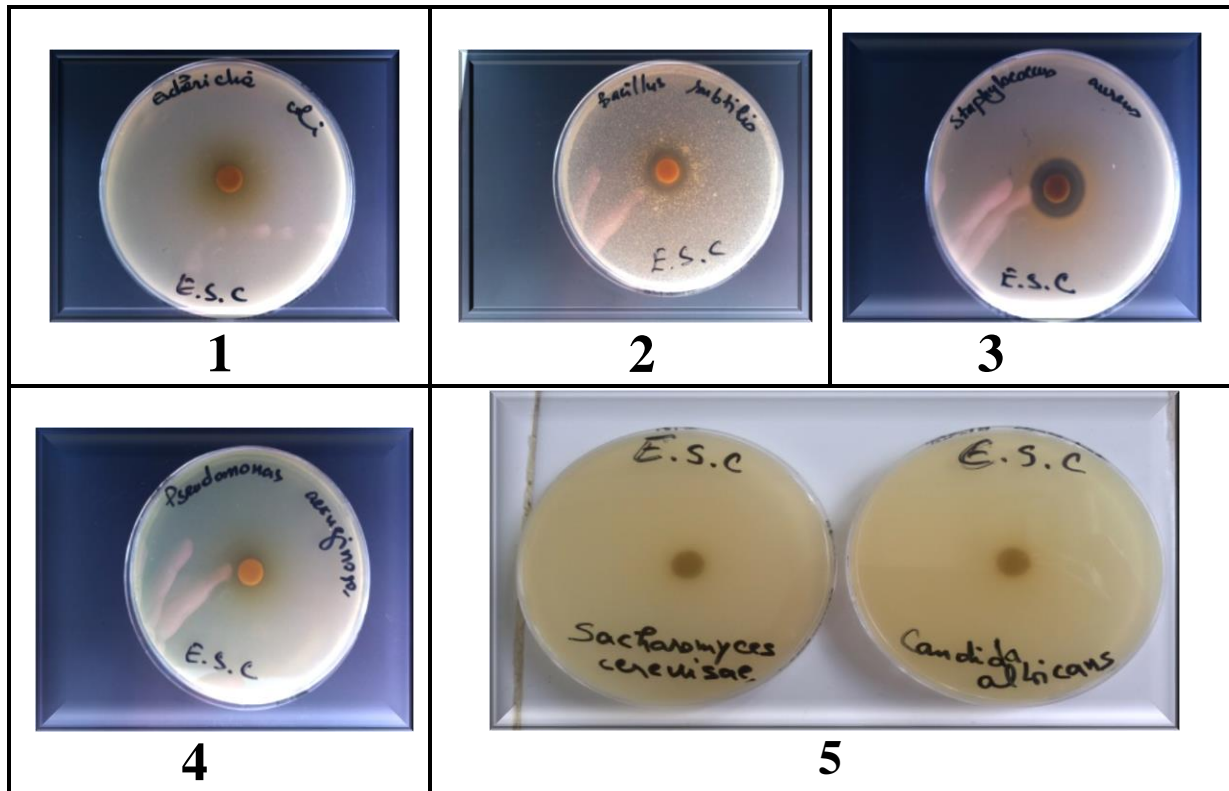


Figure (33) : L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait Methanolique concentré de *Stevia rebaudiana*

Ou :

1 : L'effet de l'extrait concentré sur *Escherichia coli*.

2 : L'effet de l'extrait concentré sur *Bacillus subtilis*.

3 : L'effet de l'extrait concentré sur *Staphylococcus aureus*.

4 : L'effet de l'extrait concentré sur *Pseudomonas aeruginosa*.

5 : L'effet de l'extrait concentré sur *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Annexe 4

Tableau 08 : Densités optiques et pourcentages d'inhibitions des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Stevia rebaudiana* Bertoni

| Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) | Densité optique (DO) | Pourcentages d'inhibition (I%) |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 50 | 0,385 | 36.36 % |
| 100 | 0,268 | 55.70 % |
| 150 | 0,181 | 70.08 % |
| 200 | 0,123 | 79.66 % |
| 250 | 0,089 | 85.28 % |
| 300 | 0,064 | 89.42 % |

Tableau 09 : Densités optiques et pourcentages d'inhibition des différentes concentrations de l'acide ascorbique

| Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) | Densité optique (DO) | Pourcentages d'inhibition (I%) |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 20 | 0,325 | 46,28% |
| 30 | 0,27 | 55,37% |
| 60 | 0,08 | 86,77% |
| 80 | 0,02 | 96,69% |
| 110 | 0,016 | 97,35% |

Annexe I

- **Préparation de réactif de Bouchardât**

Iode.....2,5g

KI.....5g

Eau distillée.....100.

- **Préparation de réactif de Dragendorff**

Carbonate de bismuth.....5g

Délayer dans 50ml d'eau distillée + 10ml d'acide HCl concentré, après effervescence + 25g de KI, agiter et compléter à 100ml.

- **Préparation de réactif de Mayer**

HgCl₂.....1,36g

KI.....25g

Eau.....100ml.

- **Préparation de réactif de Stiasny**

Formol 30%.....100ml

HCl concentré50ml.

- **Préparation du rouge Congo**

Dissoudre 1g de rouge Congo dans 100 ml d'ammoniaque, bien agiter puis ajuster la solution à 1000ml. Conserver dans un flacon opaque.

- **Préparation du vert de méthyle**

Dissoudre 1g de vert de méthyle dans 100ml d'acide acétique à 10%, bien agiter puis ajuster la solution à 1000ml. Conserver dans un flacon opaque.

- **Préparation de réactif de Gazet du Chatelier**

Mélanger dans une fiole de 250 ml, 60g d'acide lactique pure et 45g d'acide lactique saturé à froid, de soudan III. Faire dissoudre à part 1.10g de sulfate d'aniline dans 70 ml d'eau distillée chaude et laisser refroidir. Mélanger cette solution à la solution acide. faire dissoudre 1g d'iodure de potassium dans 10ml d'eau distillée ,ajouter 10g d'alcool à 95% puis 0.10g d'iode de bisublimé et mélanger .Ajouter 6g d'acide chlorhydrique pur. Mélanger les différentes solutions et filtrer.

Annexe I

Verrerie et matériels de laboratoire :

- ✓ Tubes à essai
 - ✓ Pipettes graduées
 - ✓ Poire propipette
 - ✓ Bécher
 - ✓ Entonnoir
 - ✓ Papier filtre
 - ✓ Eprouvettes graduées
 - ✓ Spatule
 - ✓ Erlen meyer
 - ✓ Fioles jaugées
 - ✓ Lame à rasoir
 - ✓ Lame porte objet 76 x 26 mm.
 - ✓ Lamelle 20 x 26 mm.micropline
 - ✓ Pincés à pointe lancéolée
 - ✓ Cartouche en cellulose
 - ✓ Soxhlet
 - ✓ Verres de montre
 - ✓ Vernis à ongles balance électrique
 - ✓ Plaque chauffante électrique
 - ✓ Bain marie
 - ✓ Loupe binoculaire (wild m7a)
 - ✓ Broyeur à couteaux ika imalab type 20
 - ✓ Microscope optique (leica)
 - ✓ La sonde gastrique
-

Annexe I

solvants et réactifs :

- Acétate de sodium
 - Chloroforme
 - Chlorure ferrique (FeCl_3) a 2%
 - Eau distillée
 - HCL concentré
 - Acide chlorhydrique (hcl 1N)
 - Acide sulfurique (H_2SO_4 2N)
 - Acide sulfurique concentré
 - Ammoniaque $\frac{1}{2}$
 - Ether diéthylique
 - Coupaux de magnésium
 - Le réactif de Dragendroff(Voir Annexe I)
 - Le réactif de stiasny(Voir Annexe I)
 - Propanol
 - Ethanol à 95° (Biochem)
 - Méthanol.

 - L'acide ascorbique
 - DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)
 - Glycérine.
 - Solution d'acide acétique (CH_3COOH) diluée à 1%.
 - Solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) ou eau de Javel (Bref)
 - Vert de méthyle (Fluka chemica) (Voir Annexe I) .
 - Rouge de Congo (Fluka chemica) (Voir annexe I).
 - Réactif de Gazet (Voir annexe I)
-