Matériel végétal

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la récolte des espèces étudiée dans cette étude, **« *Scrophulariaceae et liliaceae* ».** La récolte est effectuée au Edough (Sraidi –Annaba-) le 18 mars 2017.

La partie (feuilles, bulbe) de la plante récoltée a ensuite été séchée pendant trois semaines puis broyée en poudre pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

La zone d'étude, localisée dans la partie Nord-Est du massif de l'Edough et plus précisément au Nord-Est de la ville d'Annaba, se prolonge dans la mer méditerranéenne avec une longueur de 1785 m et une largeur de 785 m. La zone est limitée au Nord-Ouest et Sud-Est par la mer méditerranéenne au Sud-Ouest par le prolongement du massif de l'Edough proprement dit. Ce dernier correspond à un vaste ensemble anticlinal en forme de dôme asymétrique d'environ 50 km de long et 20 km de large **(Hammor. 1998).**

Les plantes étudiées

Nous avons travaillé sur 03 espèces décrites comme endémique sensu-strict :

a) ***Scilla numidica*** :

Décrite par **Quézel et Santa** dans leur ouvrage « Nouvelle Flore d'Algérie Tome 1 et 2 ». *Scilla numidica* Poiret. Feuilles à marges ciliées ou velues; oblongues-linéaires ou lancéolées. Bractée florale très longue. Grappe toujours courte, très large et même subhémisphérique. Anthères jaunâtres. Ovaire à loges 4-6 ovulées. Fleurs de couleur très variable Forêts, broussailles, pâturages **(Quézel et Santa.1962).**



Figure14 :Scilla numidica.

b) ***Scilla maritima* :** décrite dans le précédent chapitre (chapitre 1).



Figure15 : Scilla maritima.

c) *Scrophularia tenuipes* :

Plante annuelle. Inflorescence bien plus contractée, à fleurs portées par des pédicelles tout au plus 2 fois plus longs que le calice. Feuilles en général cunéiformes. Divisions du calice ovales-obtuses. Etamines exsertes Rocailles

(nous n'avons pas pu prendre *Scrophularia tenuipes* en photo faute de l'utilisation de toute la récolte et de l'endroit du terrain qui est très difficile a accéder) nous avons opter pour la photo de l'herbier du muséum national de Paris).



Figure16 :*Scrophularia tenuipes* (Muséum national d'histoire naturelle de Paris)

I. Test phytochimique

I.1. Saponosides

2g de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau.

On porte à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml.

A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (tube de 16 cm de haut et de 16 mm de diamètre) 1, 2, … 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. dans lequel hauteur de mousse est plus proche de 1 cm.

La présence des saponines est indiquée par un indice de mousse supérieur à 100 **(Rizk. 1982).**

Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

I = Hauteur de la mousse (en cm) dans le x tube X 5 / 0,0x

Où:

I: Indice de mousse**.**

Hauteur de mousse dans le x tube: Hauteur de mousse dans le tube plus proche de 1cm**.**

x: Numéro de tube dans lesquels la mousse plus proche de 1 cm (**Ben Kherara. 2010**).

I.2. Tanins

1,5 g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de méthanol 80 %.

Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes.

L'ajout de FeCl3 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins.

- La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques
- au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques **(Rizk.1982).**

I.3. Quinones libres

Un gramme de matériel végétal sec et broyé est placé dans un tube avec15 à 30 ml diethyl ether.

Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés.

La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 (1g NaOH/100ml eau)

Si la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet c'est-à-dire la présence de quinone (**Ribéreau. 1968).**

I.4. Stérols et terpènes

1 g de plante broyée est mis à macérer en flacon bouché avec 20 ml d'éther pendant

24 heures. Quelques gouttes de la solution éthérée sont évaporées sur un verre de montre.

Le résidu est dissous dans 2 gouttes d'anhydride acétique.

L'addition d'une goutte d'acide sulfurique pur développe, en présence de produits stéroliques ou terpéniques.

- une coloration mauve virant au vert ;
- un essai comparatif est fait avec l'acide sulfurique seul et la coloration éventuelle et notée.

Un résultat négatif à ces deux tests indique l'absence de composés stéroliques ou terpéniques.

I.5. Anthraquinones

2 g de matériel végétal en poudre sont mélangés à10 ml de $CHCl_3$.

Après un chauffage de quelques min et une filtration, les extraits chloroformique de chacun des organes, on ajoute du KOH aqueux 10 %.

Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge **(Rizk.1982).**

I.6. Recherche des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

I.6.1. Principe

En présence de NaOH 1N (1g NaOH/100ml eau), de HCl concentré et des coupeaux de Magnésium, les flavonoïdes donnent les réactions de coloration caractéristique. La même réaction effectuée au bain marie en absence de coupeaux de Magnésium, l'apparition de la coloration rouge confirme la présence des leucoanthocyanes.

I.6.2. Mode opératoire

1 g de matériel végétal placés dans un Erlenmeyer sont infusés dans 25 ml d'eau distillée pendant 30 minutes.

Après filtration, prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube.

Additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai, 1 ml de NaOH, 1ml d'eau distillée et 1ml de HCl concentré et des copeaux de Magnésium.

I.7. Mise en évidence des anthocyanes

1 g de matériel végétal sont placés dans un Erlenmeyer puis infusés dans 25 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, 6 ml d'infusé sont prélevé et introduite dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube.

Quelques gouttes d'ammoniaque sont ajoutées, la réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyanes **(Hariri.1991).**

I.8. Alcaloïde

Test de Mayer

À 0,5 g de matériel végétal en poudre, on ajoute 15 ml d'ethanol 70 %. Après une agitation de 24 h, on laisse reposer l'extrait jusqu'à décantation complète, suivie d'une filtration et d'une évaporation (met la solution dans un erlen et tu le met sur la plaque chauffante jusqu'à évaporation) à sec. Le résidu est repris dans quelques ml d'HCl 50 %.

La formation d'un précipité jaune, après ajout de quelques gouttes du réactif de Mayer (5g de KI et 1,358g de HgCl2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée), témoigne de la présence d'alcaloïdes **(Randerath. 1971).**

I.9. Extrait éthanolique.

30 g de plante séchée et broyée sont agités en présence de 300 ml d'un mélange éthanol-eau (90-10). Après filtration, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à siccité.

Le rendement se situe entre *0.1* et *4* g. Ces extraits sont utilisés pour l'activité antibactérienne **(Farnswor.1966).**

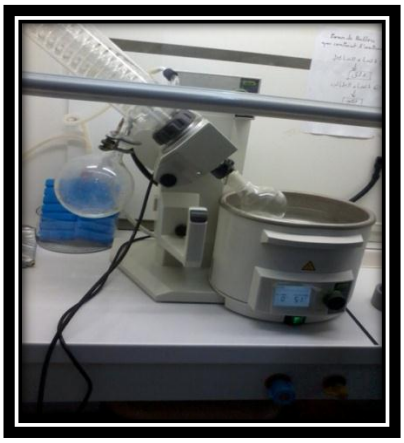


Figure17 : évaporateur rotatif.

Nous avons réalisé ces testes sur :

- Parties aériennes de *Scilla numidica.*
- Bulbes de *Scilla numidica*.
- Bulbes de *Scilla maritima.*
- Parties aériennes de *Scrophularia tenuipes.*

L'identification de ces espèces a était effectuer par Mr Hamel Tarek maitre de conférence a l'université Badji Mokhtar Annaba.

II. Activité antibactérienne

Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes utilisées dans cette recherche pour l'activité antibactérienne sont des souches référencées une Gram + c'est: (S*taphylococcus aureus* ATCC 25923) et une souche Gram- (*Escherichia coli* ATCC 25922). Ces souches obtenues du Institut de Pasteur en Algérie, et sont conservées dans le réfrigérateur dans des tubes à visses contenant milieu nutritive jusqu'à l'utilisation.

Milieu de culture

On utilise gélose nutritive Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes aux différents concentrations d'extraits éthanoliques.



Figure18: Milieu de culture (gélose Mueller Hinton).

II.1. Détermination de DI (diamètre d'inhibition)

L'evaluation de l'activité antibactérienne par les extraits ethanologique et décocté des plantes étudiées *Scilla numidica* (feuille, bulbe), *Scilla maritima, Scrophularia tenuipe* a une concentration de 10mg/ml (antibiogramme) **(Treki *et al.* 2009).**

Cette technique repose sur l'apparition d'une zone d'inhibition dans le milieu de culture deux souches bactériennes: *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Autour du disque contenant l'extrait des plantes ainsi des puits **(Bssaibis. 2009).**

II.2. Préparation des dilutions des extraits (concentration)

Concentrations 10mg/ml des plantes étudiers Scrophulria tenuipe, Scilla maritima bulbe, Scilla numidica (feuille et bulbe), ont été préparé par DMSO (20ml DMSO/200ml eau distillée 10%) **(Meddour *et al*. 2013).**

II.3. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir de papier d'wattman, avec un diamètre de 6 mm.

Ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave et conservés jusqu'à l'utilisation.

II.4. Préparation de milieu de culture

On réalise la stérilisation et la surfusion de milieu de culture (Muller Hinton) à l'aide d'autoclave pendant 15 min à 121°C, puis on le versé dans les boites de Pétri à 4 mm de hauteur et on laisse quelques minutes jusqu'à la solidification **(Harrar. 2012).**

II.5. Inoculum

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler Par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- L'ensemencement doit se faire en moins en quelques minutes après la préparation de l'inoculum.

II.6.Ensemencement

- La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzen;
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse);
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas;
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose;
- Les disques sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunzen (**Djelloul Daouadji. 2010**).

Nous avons réalisé le teste de puits qui repose sur la réalisation d'un puit de 5mm où on dépose la même concentration des disques **(Topisirovic. 2006).**

II.7. Incubation et Lecture

Après incubation 18-24 heures à 37°C dans l'étuve, Les résultats sont observés, en mesurant les diamètres d'inhibition **(Boudjouref.2011).**

- Nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles des feuilles de *Scrophularia tenuipes* ainsi que les fleures de *Scilla numidica* et faut du rendement nous n'avons pas pu procéder aux études approfondis où nous avons obtenu un pourcentage de 0,2% c'était impossible d'accentuer le pourcentage ce si est du a la difficulté de la récolte donc nous avons optez a la dernier minute à changer les paramètres d'études.