

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمّار تليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT



كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم علوم المادة  
Département Des Sciences De La Matière

## Mémoire de MASTER

**Domaine :** Sciences de la matière  
**Filière :** Chimie  
**Option :** Chimie organique appliquée

**Par :**

**BENSAFIEDDINE Fraïha**

**THEME**

---

# **Etude de l'effet antiurolithiasique *in vitro* des extraits de trois plantes médicinales locales**

---

*Soutenu publiquement le devant le jury composé de:*

M <sup>r</sup> .	HADBAOUI Zineb	M.C.B	Présidente
M <sup>me</sup> .	BENAROUS Khedidja	M.C.B	Examinatrice
M <sup>me</sup> .	HAMIA Chahrazed	M.C.B	Examinatrice
M <sup>r</sup> .	DJERIDANE Amar	M.C.A	Rapporteur

*Année Universitaire 2014/2015*

# *Dédicaces*

*Je dédie cette thèse*

*A MES CHÈRES PARENTS*

*Je vous remercie pour le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés*

*Le fruit de vos innombrables sacrifices*

*A MES CHÈRES ET ADORABLE FRÈRES ET SŒURES*

*ET surtout ma petite sœur SALIMA que j'adore*

*A TOUS MES AMIES*

*A TOUS LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPE A L'ELABORATION  
DE CE TRAVAIL*

*A TOUS CEUX QUE J'AI OMIS DE CITER*

*Bensafieddine Fraïha*

# Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier mon Dieu qui m'a donné le courage pour terminer ce modeste travail.

Mon mémoire a été réalisée au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat sous la direction, du professeur YOUSFI Mohamed, que m'a beaucoup aidé dans mes études. Son écoute et ses conseils m'ont permis de cibler mes candidatures et de trouver ce mémoire me correspondait totalement.

Je tiens à remercier vivement mon directeur de mémoire, le docteur DJERIDANE Amar pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de ce mémoire. Grâce aussi à sa confiance, j'ai pu m'accomplir totalement dans mes recherches avec son aide précieuse dans les moments les plus délicats.

*Je tiens à remercier mademoiselle BNEALIA Halima et monsieur JOKHDEM Khaled pour les conseils qu'ils ont su me prodiguer au cours de ce mémoire.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à monsieur SAIDAT Abou bakar, monsieur FERHAT Mahmoud, mademoiselle BELARACH Souad, qui ont bien voulu répondre longuement aux demandes que je leur ai adressées pour réaliser ce travail.*

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci aussi pour mes enseignements, qu'ils ont travaillé avec nous pendant les années du cursus universitaire.

## *Liste Des Notations*

<b>A</b>	:	Acétone
<b>A.E</b>	:	Acétone / Eau
<b>A<sub>éch</sub></b>	:	Absorbance de l'échantillon
<b>A<sub>t</sub></b>	:	Absorbance de témoin
<b>CAS</b>	:	Chemical Abstracts Service
<b>CCM</b>	:	Chromatographie sur couche mince
<b>CS</b>	:	Citrate de Sodium
<b>C1</b>	:	Calcul 1 de type acide urique
<b>C2</b>	:	Calcul 2 de type urate de calcium
<b>D%</b>	:	Constant de dissolution
<b>DRX</b>	:	Diffraction des rayons X
<b>E</b>	:	Eau
<b>GAE</b>	:	Equivalent en acide gallique (Gallique Acide Equivalent)
<b>I %</b>	:	Le pourcentage d'inhibition
<b>M</b>	:	Méthanol
<b>M.E</b>	:	Méthanol / Eau
<b>m<sub>0</sub></b>	:	Masse du calcul avant contact
<b>m<sub>f</sub></b>	:	Masse du calcul après contact
<b>PT</b>	:	Teneur en polyphénol Totaux
<b>R (%)</b>	:	Rendement d'extraction
<b>Ti</b>	:	Temps d'induction
<b>UV-Vis</b>	:	Ultra-violet-visible



## Liste Des Figures

<b>Figure 1</b>	: Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm)	<b>10</b>
<b>Figure 2</b>	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>15</b>
<b>Figure 3</b>	: L'allure générale de la courbe turbidimétrie	<b>18</b>
<b>Figure 4</b>	: Courbe de cristallisation d'oxalate de calcium sans inhibiteur	<b>18</b>
<b>Figure 5</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujets sains en présence des extraits de la partie aérienne de <i>Herniaria fontanesii</i>	<b>19</b>
<b>Figure 6</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujets sains en présence des extraits de la partie aérienne de <i>Pithuranthos scoparius</i>	<b>20</b>
<b>Figure 7</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits des racines de <i>Pithuranthos scoparius</i>	<b>20</b>
<b>Figure 8</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits de la partie aérienne de <i>Cynodon dactylon</i>	<b>20</b>
<b>Figure 9</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits des racines de <i>Cynodon dactylon</i>	<b>21</b>
<b>Figure 10</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence de la tisane	<b>21</b>
<b>Figure 11</b>	: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence de médicament Succinamide pharbiol	<b>21</b>
<b>Figure 12</b>	: Photo de la plaque CCM analytique monodimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> sous la lampe UV (366nm)	<b>26</b>
<b>Figure 13</b>	: Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> sous la lampe UV (366nm)	<b>26</b>
<b>Figure 14</b>	: Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> sous la lampe UV (254nm)	<b>27</b>
<b>Figure 15</b>	: Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> sous la lampe UV (366nm) après la pulvérisation avec $AlCl_3$	<b>27</b>

<b>Figure 16</b>	: Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> après la pulvérisation par la vanilline sulfurique	<b>27</b>
<b>Figure 17</b>	: Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de <i>pithuranthos scoparius</i> sous la lampe UV (366nm) après la pulvérisation par le réactif de Libermann-Buchard	<b>27</b>
<b>Figure 18</b>	: Spectre de diffraction des rayons X du calcul (1)	<b>35</b>
<b>Figure 19</b>	: Diffractogramme de l'analyse qualitative de calcul (1)	<b>35</b>
<b>Figure 20</b>	: Spectre de diffraction des rayons X du calcul (2)	<b>36</b>
<b>Figure 21</b>	: Diffractogramme de l'analyse qualitative du calcul (2)	<b>36</b>

## *Liste Des Tableaux*

<b>Tableau 1</b>	: Les plantes investiguées et leur utilisation traditionnelle	<b>3</b>
<b>Tableau 2</b>	: Réactifs chimiques utilisés	<b>4</b>
<b>Tableau 3</b>	: Résultats de screening phytochimique	<b>12</b>
<b>Tableau 4</b>	: Rendement d'extraction et teneur en polyphénols	<b>14</b>
<b>Tableau 5</b>	: Pourcentage d'inhibition des extraits étudiées et standards à des concentrations égales 1g/l	<b>22</b>
<b>Tableau 6</b>	: Effet des trois plantes médicinales sur la dissolution <i>in vitro</i> des calculs urinaires	<b>25</b>

## ملخص

إن ثراء المنطقة السهبية بالنباتات الطبية و الاستعمال المتنوع لهذه النباتات بمنطقة الأغواط، دفعنا لإجراء دراسة الفعل التثبيطي لمستخلصات نبات النجم و فتات الحجر و القزيع على تشكل حصوات الكلى من نوع اوكسالات الكالسيوم .

قمنا أولاً، بدراسة المسح الفيتو كيميائي مع التحليل الكمي للمكونات الفينولية للنباتات الثلاثة. أظهرت النتائج أن المستخلصات غنية بـ : *tanins catéchiqes* و *C-,O-hétérosides à génies réduites*، كما أنها تحتوي على مركبات فينولية تتراوح قيمها ما بين 0,867 و 5,160 ميليغرام مكافئ من حمض الغاليك بالنسبة لوحد غرام من المادة الجافة.

تمت دراسة الفعل التثبيطي لمستخلصات النباتات الثلاثة على تشكل حصوات الكلى باستعمال نموذجين مختلفين. قمنا في نموذج قياس التعكير بطريقة مطيافية الأشعة المرئية و فوق البنفسجية بدراسة تأثير المستخلصات ذي تركيز 1 جرام/لتر على تبلور اوكسالات الكالسيوم الناتجة عن إضافة محلول اوكسالات الصوديوم ذي تركيز 25ممول/لتر إلى بول شخص صحيح. في حين يركز النموذج الكتلي على قياس التغير في كتلة الحصى من نوع اورات الكالسيوم و حمض اليوريك بعد وضعها في 5مل من كل مستخلص ذي تركيز 5 غرام/لتر لمدة 15 يوماً. تم مقارنة الفعل التثبيطي لتشكل الحصيات في كلا الاختبارين، بمثبطين مرجعيين و هما : سيترات الصوديوم و سوكسينميد فاريبول. أظهرت النتائج المتحصل عليها بالنسبة لكلا الاختبارين، أن مستخلص ميثانول/ماء لجذور القزيع يملك نسبة تثبيط تبلور الحصيات جد عالية ( أكثر من 40%) مقارنة بالمثبطين المرجعيين " سيترات الصوديوم و سوكسينميد فاريبول " .

تعد هذه النتيجة خطوة كبيرة نحو إيجاد علاج فعال ضد تشكل الحصيات الكلوية. لكن يجب التأكد من هذه الدراسات و ذلك بإجرائها على جسم حي للتحقق من صحة نتائج المختبر في مساهمة النباتات الثلاثة في علاج تشكل الحصى.

**الكلمات المفاتيح:** النباتات الطبية، المسح الفيتو كيميائي، الحصيات الكلوية، اوكسالات الكالسيوم، الفعل التثبيطي لتشكل حصوات الكلى.

## RÉSUMÉ

La richesse de la zone steppique par les plantes médicinales et la diversité d'emplois de ces plantes en médecine traditionnelle dans la région de Laghouat nous a poussé à faire une étude de l'effet inhibiteur des extraits de *Herniaria fontanesii*, *Pithuranthos scoparius* et *Cynodon dactylon* sur la formation des calculs urinaires de type oxalate de calcium.

Tout d'abord, nous avons fait une étude phytochimiques ainsi une analyse quantitative des composés phénolique de différents extraits des trois plantes. Les résultats obtenus ont prouvé que nos extraits sont riches en tanins catéchiqes et en C- et O-hétérosides à génies réduites, avec des teneurs en phénols totaux allant de 0,867 à 5,160 mg équivalents en acide gallique par 1 g de la matière sèche.

L'activité d'antiurolithiasique *in vitro* de divers extraits des plantes a été réalisée par deux modèles différents. Dans le modèle turbidimétrique, on se propose de déterminer spectrophotométriquement l'effet des extraits de concentration 1 g/L sur la cristallisation oxalocalcique, induite par ajout d'oxalate dans des urines du sujet sain. Tandis que, le modèle gravimétrique s'appui sur la mesure de la variation de masse des calculs rénaux de type urate de calcium et acide urique, après les mettre en contact avec 5 ml des extraits de concentration 5g/L pendant 15 jours. Dans les deux tests, l'activité antiurolithiasique a été comparée à celle de deux inhibiteur antiurolithogénèse de référence : le citrate de sodium et le Succinimide pharbiol. Les résultats obtenus montrent clairement que l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* a donné un pouvoir antiurolithiasique, mesuré par les deux tests, très important (>40 % d'inhibition) comparativement aux inhibiteurs de référence.

Toutefois, ce résultat est un grand pas vers la recherche d'un remède efficace contre la formation de lithiase urinaire et le travail devra être confirmé par des études *in vivo* afin de valider ces observations *in vitro* sur les apports de ces trois plantes dans le traitement de la lithiase oxalocalcique.

**Mots clés** : Plantes médicinales, screening phytochimique, calculs urinaires, oxalate de calcium, antiurolithiasique.

## ABSTRACT

The richness of the steppe zone by the medicinal plants and their diversity traditional uses in the region of Laghouat, allowed us to study the inhibitory effect of *Herniaria fontanesii*, *Pithuranthos scoparius* and *Cynodon dactylon* extracts on the formation of calcium oxalate kidney stones.

Firstly, we have carried out phytochemical screening and quantitative analysis of phenolic compounds of various extracts from the three plants. The obtained results proved that our extracts are rich in catechic tannins and C-, O-heterosides, with a total phenolic content ranged from 0.867 to 5,160 mg of gallic acid equivalent per 1 g of dry matter.

The *in vitro* antiurolithiasic activity of different plants extracts has been carried out by two different models. In the turbidimetric assay, we have determined spectrophotometrically the effect of the extracts (1 g/L) on the oxalocalcic crystallization, induced by addition of oxalate in urines from healthy subject. Whereas, the gravimetric assay is based to measure the variation of calcium urate and uric acid renal calculi weight, after putting them in contact with 5 ml of the extracts (5g/L) during 15 days. In the two assays, the antiurolithiasic activity was compared with that of two antiurolithogenesis inhibitory standards: sodium citrate and Succinimide pharbiol. The achieved results measured by the two tests, show clearly that the *Pithuranthos scoparius* roots hydromethanolic extracts have provided very important antiurolithiasic power (> 40% of inhibition) compared to the standard inhibitors.

However, this result is a great step forward towards the search for an effective treatment for the urinary calculi formation. But, this work will have to be confirmed by *in vivo* experiments in order to validate these *in vitro* observations on the contributions of these three plants in the treatment of the oxalocalcic renal calculi.

**Key words:** Medicinal plants, Phytochemical screening, Kidney stones, Calcium oxalate, antiurolithiasic.

# *Table des matières*

Liste des notations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
I. Introduction générale	1
II. Matériel et méthodes	3
II.1. Matériels	3
II.1.1. Matériels utilisés	3
II.1.2. Matériel végétal	3
II.1.3. Réactifs chimiques	4
II.2. Méthodes	4
II.2.1. Préparation des extraits	4
II.2.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)	5
II.2.3. Screening phytochimique des extraits	5
II.2.3.1. Les tanins	5
II.2.3.2. Les alcaloïdes	6
II.2.3.3. Les anthocyanes	6
II.2.3.4. Les flavonoïdes	6
II.2.3.5. Les saponines	6
II.2.3.6. Les dérivés anthracéniques libres	6
II.2.3.7. Les dérivés anthracéniques combinés	7
II.2.3.8. Les composés réducteurs	7
II.2.3.9. Les coumarines	7
II.2.3.10. Les stérols et triterpènes	8
II.2.3.11. Les amidons	8
II.2.4. Dosage des phénols totaux	8
II.2.5. Evaluation de l'activité antiurolithiasique des extraits	8
III. Résultats et discussion	10
III.1. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince	10
III.2. Analyse phytochimique des extraits	11
III.3. Quantification des composées phénoliques	14
III.4. Evaluation de l'activité antiurolithiasique	16
IV. Conclusion générale	28
V. Références Bibliographiques	29
VI. Annexe	35



## I. Introduction générale

Dans les dernières décennies, les vertus thérapeutiques des plantes médicinales ont permis d'avoir une grande importance pour la santé des individus et des communautés (**C. Lartigau-Roussin ,2002**). De ce fait, l'Organisation mondiale de la santé a soutenu l'établissement d'une base pour la conservation des plantes médicinales et a encouragé les pays en voie de développement à organiser la médecine traditionnelle dans des cadres réglementaires. Ainsi, des milliers de plantes médicinales recensées à ce jour sont utilisées par 80 % de la population mondiale pour lutter contre diverses maladies. Donc la recherche a été concentrée sur l'évaluation scientifique des drogues traditionnelles de l'origine végétale qui sont riches en des produits du métabolisme secondaire comme, les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes...etc. (**Organisation mondiale de la santé, 2003**).

En Algérie, la médecine douce est encore largement sollicitée par la population pour plusieurs raisons qui se trouvent être les mêmes dans d'autres pays. Essentiellement, les patients ne sont pas satisfaits des traitements qu'ils reçoivent et perdent confiance envers leurs médecins et préfèrent des cures à base de plantes qui semblent être plus naturelles, sans effets secondaires inévitables et pas coûteuses. Par exemple dans le cas de la lithiase urinaire, les médicaments conventionnels comme les diurétiques, les anti-inflammatoires et les inhibiteurs de certains métabolites sont les seuls médicaments utilisés dans le traitement de la lithiase oxalocalcique, avec des effets secondaires néfastes (**D. Juyal et al , 2010**).

La lithiase urinaire, urolithiase ou anciennement « maladie de la pierre » est une maladie due à la présence de calculs dans le corps humain (rein, vessie, uretère,...), qui est très fréquente et connue depuis l'Antiquité puisque des calculs ont été retrouvés dans des organes de momies d'Egypte et d'Amérique. Elle est définie comme le résultat d'une précipitation anormale à l'intérieur du tractus urinaire. Cette précipitation se fait le plus souvent à partir des constituants normaux de l'urine. On considère que 2 à 15% de la population mondiale souffre de calculs urinaires. La fréquence est la plus élevée entre 30 et 50 ans, avec une nette prédominance masculine (**F. Atmani et S.Khan , 2000**).

La lithiase rénale est devenue très fréquente dans les pays occidentaux, en parallèle avec l'élévation du niveau de vie et avec les modifications des habitudes alimentaires qui en résultent. Il est donc certain que les facteurs d'environnement jouent un rôle majeur à l'origine de la lithiase rénale, notamment de la lithiase oxalocalcique qui est devenue la forme prépondérante puisqu'elle affecte environ 10% de la population dans les pays industrialisés. Toutefois, les

facteurs génétiques jouent également un rôle important, et il existe plusieurs formes de lithiase d'origine héréditaire où l'anomalie génétique est la cause directe de la formation des calculs (A. Guyton et J. Hall, 2006). D'après les études et l'évolution de la maladie lithiasique et l'analyse d'un calcul on peut préciser les composées les plus fréquentes qui sont ; l'oxalate de calcium (sous forme mono- ou di-hydratée), le phosphate de calcium (surtout l'hydroxyapatite), l'acide urique, le phosphate d'ammonium et de magnésium et la cystine. (F. Atmani et S. Khan, 2000).

Vu la propagation des maladies lithiasiques en Algérie et la richesse de la région de Laghouat en plantes médicinales, l'objectif de notre travail est d'améliorer l'état de santé des populations par l'utilisation des médicaments à base des plantes médicinales et plus spécifiquement de proposer une solution possible aux problèmes liés aux lithiases urinaires. De ce fait, nous nous sommes intéressé dans ce mémoire à l'étude de l'effet inhibiteur des extraits de *Cynodon dactylon* (L), *Pithuranthos scoparius* et *Herniaria fontanesii* sur la formation de lithiase urinaire de type oxalocalcique *in vitro*.

La première partie de ce travail a été consacrée à la préparation des extraits puis au dosage des phénols totaux des substances végétales actives à partir des trois plantes choisies. L'étude de l'activité antilithiasique des extraits *in vitro*, a été traitée dans la deuxième partie. Pour ce faire, nous avons choisis deux tests. Dans le premier test, dont le but de diminuer le facteur cristallogène et d'éviter la formation des calculs par précipitation de l'oxalate de calcium, nous avons entrepris l'étude *in vitro* sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique en présence des extraits susceptibles d'inhiber le processus de précipitation. L'inhibition de cette cristallisation oxalocalcique a été étudiée spectrophotométriquement dans un modèle turbidimétrique des solutions thermostatées à 37°C à 620 nm. Dans le deuxième test, l'étude de l'activité antilithiasique a été achevée par un modèle gravimétrique par la mise en évidence du pouvoir de dissolution de deux types des calculs urinaires (urate de calcium et acide urique) à l'aide d'extraits des plantes antilithiasiques évoquées ci-dessus.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Matériels




#### II.1.1. Matériels utilisés

- Spectrophotomètre (Shimadzu 1601) , Appareil de diffraction des rayons X (Philips)

#### II.1.2. Matériel végétal

Les plantes ont été récoltées de la région de Sidi Makhlouf, environ 40 km du nord-est du centre ville de la willaya de Laghouat, au mois de décembre 2014 (**Tableau 1**). Les plantes investiguées sont séchées à l'abri de la lumière pendant 2 mois.

**Tableau 1: Les plantes investiguées et leur utilisation en médecine traditionnelle**

Description de la plante	Photo
<p><b>Nom latin:</b> <i>Herniaria fontanesii</i>  <b>Famille:</b> <i>Caryophyllacées</i>  <b>Nom vernaculaire:</b> Fetat el Hdjar  <b>Description :</b> Vivace très ramifiée, suffrutescente et pubescente (long : 30 cm). Feuilles elliptiques, oblongues oblancéolées ou oblongues spatulées (long : 5 mm, large : 2 mm), pubescentes, à la base atténuée, à l'apex obtus. Fleurs avec 5 sépales obovaires (long : 1 mm), et 5 étamines, apétales, groupées par 3-7 en glomérules axillaires ou terminaux. Utricules ellipsoïdes (long : 1 mm).  <b>Utilisation traditionnelle :</b> Diurétique, troubles respiratoires, réduire les calculs, hypertension artérielle (A .Nait Mbark et al, 2000).</p>	
<p><b>Nom latin :</b> <i>Pithuranthos Scoparius</i>  <b>Famille :</b> <i>Apiécée</i>  <b>Nom vernaculaire :</b> Guezah  <b>Description:</b> C'est une plante herbacée, aphyllé, à tiges souvent très ramifiées. Ombelle à involucre, ovoïde à 6 bandelettes. C'est une plante herbacée, formant des touffes : tiges florifères érigées bien plus longues, à ombelles latérales, à pédoncule court (1 - 3 cm). Les fleurs est de couleurs blanches.  <b>Utilisation traditionnelle :</b> Purgatif digestible, traitement des maladies rénales, problèmes des voies urinaires (N. Boutaghane et al ,2004).</p>	
<p><b>Nom latin :</b> <i>Cynodon dactylon (L).</i>  <b>Famille :</b> <i>Poacée</i>  <b>Nom vernaculaire :</b> Enejjem  <b>Description :</b> C'est une plante vivace rhizome longuement Rampant sur la surface du sol environ 2 à m de long, elle est très ramifiée portant de nombreuses feuilles dressées à longue gaines.  <b>Utilisation traditionnelle :</b> Le chiendent est connu pour ses effets diurétiques, pour faire disparaître les calculs rénaux, pour ses effets fébrifuges et pour soulager les inflammations de la prostate (A. Rad , 2012).</p>	

### II.1.3. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

**Tableau 2 : Réactifs chimiques utilisés**

Produit	Marque
Acétone, méthanol, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Folin-Ciocalteu, acide gallique, citrate de Sodium, l'acide sulfurique, cyclohexane, d'éthyle éther, acétate d'éthyle, Ammoniac, Iode, Iodure de potassium, chlorure de fer (FeCl <sub>3</sub> ), Magnésium pure (Mg), vanilline.	Sigma- Aldrich
Anhydride acétique, acide acétique, réactif de Fehling,	Prolabo
Acide chlorhydrique (37%), Chloroforme, chlorure de mercure	Fluka
Oxalate de sodium	BHD
CCM analytique 20x20cm gel de silice 60	Merck
Nitrate de bismuth	Laboratory reagent

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Préparation des extraits :

Il existe deux méthodes utilisées fréquemment dans l'extraction des principes actifs ; extraction à froid « macération » et extraction à chaud « infusion et décoction ». Dans notre travail nous avons choisi l'extraction par macération et par décoction.

Concernant l'extraction par décoction, 2 g de chaque partie de la plante (la partie aérienne d'*Herniaria fontanesii* et la partie aérienne et les racines de *Cynodon dactylon* et *Pithuranthos scoparius*) a été broyé et portée à l'ébullition dans 100 ml d'eau distillé durant 5 minutes. Tandis que, l'extraction par macération a été réalisée sur 2 g de la matière végétale sèche finement broyée par 4 systèmes de solvants: acétone (100%), méthanol (100%), acétone-eau (50%-50%) et méthanol-eau (50%- 50%), pour une durée de 24 heures à température ambiante. Après chaque extraction, le filtrat est évaporé sous vide à l'aide d'un Rota vapeur, puis le résidu sec obtenu est pesé et solubilisé dans des volumes différents du méthanol

absolue, d'acétone et d'eau distillée selon la solubilité des résidus. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. Nous avons obtenu alors, 5 extraits acétoniques, 5 extraits méthanoliques, 6 extraits aqueux, 5 hydrométhanoliques et 5 extraits hydroacétoniques.

### II.2.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

Après l'extraction, une CCM analytique a été réalisée pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans les différents extraits bruts à analyser.

La séparation a été effectuée dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié (Éther diéthylique / acétate d'éthyle 7 / 3 v / v) en utilisant une plaque CCM de dimension 10x10cm en gel de silice. Après migration la plaque est séchée à l'air libre et révélée par une lampe UV à une longueur d'onde  $\lambda = 366$  nm.

Une autre chromatographie sur couche mince (CCM) bidimensionnelle a été menée sur l'extrait hydrométhanolique des racines de la plante *Pithuranthos scoparius* pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut concorder cette activité antiuroolithiasique. Pour cela, l'extrait a été élué sur une plaque CCM de silice en utilisant deux solvants appropriés (solvant 1 : acétate d'éthyle / dichlorométhane / cyclohexane ; 4,7 / 3,5 / 1,76 v / v / v et solvant 2 : dichlorométhane / méthanol / eau 5 / 4,16 / 0,84 v / v / v). L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. Les réactifs utilisés pour le présent travail sont ; le réactif à la Vanilline sulfurique (révélateur polyvalent), le réactif d' $\text{AlCl}_3$  (révélateur des flavonoïdes), le réactif de Dragendorff (révélateur des alcaloïdes) et le réactif de Liebermann-Burchard (réactif des stérols, stéroïdes et triterpènes).

### II.2.3. Screening phytochimique des extraits

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation effectués sur les extraits préparés selon la méthodologie suivante :

#### II.2.3.1. Les tanins

2 mL d'une solution diluée des extraits de concentration 1 g/L a été placée dans un tube à essai. Ensuite, on ajoute quelques gouttes du chlorure ferrique (1%) à l'extrait diluée. En présence de tanins galliques on observe une coloration bleue noire alors qu'en présence de tanins catéchiques cette coloration est brune verdâtre (A. Rizk, 1982).

### II.2.3.2. Les alcaloïdes :

Grace aux réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes nous en avons utilisé deux tests à savoir le réactif de Mayer et le réactif de Wagner car certains alcaloïdes peuvent être sensibles à certains tests et non détectables par d'autres (**R. Randerath, 1971**).

1mL d'extrait dilué de concentration 1g/L a été introduit dans des tubes à essai, puis 5 gouttes de réactif de Mayer ou de 2 gouttes du réactif de Wagner ont été ajoutées. Après l'agitation, on laisse les solutions à séjourner pendant 24h. Après la centrifugation avec une vitesse de 2000 r/min pendant 5 min, s'il apparaît un précipité blanc jaunâtre avec le réactif de Mayer ou un précipité brun avec le réactif de Wagner, c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (**M.Paris et al, 1969**).

### II.2.3.3. Les anthocyanes

2mL de solution d'HCL (2N) a été ajouté à 1mL d'extraits diluée de concentration 1g/L. Ensuite, on ajoute quelques gouttes d'ammoniac concentré. En présence des anthocyanes on observe une coloration rose ou rouge qui vire au bleu-violacé (**M.Debray et al, 1971**).

### II.2.3.4. Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 1 mL de l'extrait diluée (1g/L) avec 1 mL d'AlCl<sub>3</sub> (2%). Après 15 min d'incubation à la température ambiante les flavonoïdes sont mis en évidence si une couleur jaune s'apparaît. (**M.Debray et al, 1971**; **M.Paris et al, 1969**).

### II.2.3.5. Les saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 2mL de la solution diluée (1g/l) de chacun d'extraits dans des tubes à essais. Chaque tube est agité pendant 15 secondes puis, laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1cm indique la présence des saponines (**E.Trease et W.Evans, 1987**).

### II.2.3.6. Dérivés anthracéniques libres

1ml de chacun d'extraits dilués de concentration de 1 g/L est ajouté à 1ml de NH<sub>4</sub>OH 10 fois diluée. Après l'agitation pendant 15 secondes, la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthracéniques libres (**A.Diallo, 2005**).

### II.2.3.7. Les dérivés anthracéniques combinés

#### ✓ O-hétérosides

On ajoute 2mL de chloroforme à 2mL de chaque extrait diluée de concentration (1g/L). Ensuite, on soutire la phase organique et on l'introduire dans un tube à essai puis on ajoute 1mL de NH<sub>4</sub>OH 10 fois dilué. Après l'agitation, la présence d'anthraquinones est relevée par la coloration rouge plus ou moins intense. (A.Diallo, 2005).

#### ✓ O-hétérosides à génines réduites

3 à 4 gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10% a été ajouté à 1mL de chaque extrait diluée de concentration 1g/L ; puis, on chauffe pendant 5 min au bain marie à 100 C°. Après refroidissement, on ajoute 2ml de chloroforme. Ensuite, on ajoute 1mL de NH<sub>4</sub>OH 10 fois dilué à la phase organique. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthrones, une coloration rouge intense apparaît. (A.Diallo, 2005).

#### ✓ C-hétérosides

On reprend la phase aqueuse qui a été conservé au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 1mL d'eau distillée et on ajoute 1ml de FeCl<sub>3</sub> à 10%. Ensuite, on introduit les tubes à essai dans un bain marie bouillant pendant 30 min, puis on laisse à refroidir et on ajoute ensuite 1mL de chloroforme. Après, on ajoute 1mL de NH<sub>4</sub>OH 10 fois dilué. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides (A. Diallo, 2005).

### II.2.3.8. Les composés réducteurs

A 1 mL de la solution à analyser de concentration 1g/L, on ajoute 20 gouttes de réactifs de Fehling puis on chauffe dans un bain marie à 100 C° pendant 1h. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs (E.Trease et W.Evans, 1987).

### II.2.3.9. Les coumarines :

1 ml de chaque extrait de concentration 1g/L est placé dans un tube à essai. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté à l'ébullition dans un bain marie pendant quelques minutes. Ensuite, 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH 10% dilué a été ajouté et deux taches ont été mises sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (A.Rizk, 1982).

### II.2.3.10. Les stérols et triterpènes :

On mélange 1mL de chaque extrait diluée de concentration 1g/L avec 0,5 mL de l'anhydride acétique, puis on ajoute acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides (E.Trease et W.Evans, 1987).

### II .2.3.11. Les amidons :

1mL d'extrait dilué de concentration 1g/L a été introduit dans des tubes à essai, puis 5 gouttes de réactif d'amidon ont été ajoutées, L'obtention d'une coloration bleu violacé indique la présence d'amidon. (E.Trease et W.Evans, 1987).

## II.2.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu (N. Boizot et al, 2006). 100 µl de chaque extrait ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 5% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique (mg/g EAG).

## II.2.5. Evaluation de l'activité antiurolithiasique des extraits

### II.2.5.1. Modèle turbidimétrique

Ce modèle consiste à l'étude de la cristallisation oxalocalcique entre les urines et l'oxalate de calcium, sans et avec inhibiteur, afin d'évaluer la capacité inhibante des extraits préparés. Ce modèle turbidimétrique permet de travailler à des pH et température contrôlés. (C. Hennequin et al, 1993).

Les urines de 24 heures, d'un homme sans antécédents lithiasiques, ont été collectées et conservées dans une bouteille en verre sans ajout d'agent antibactérien. En présence d'oxalate de sodium et à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu 1601) et d'un bain marie, maintenant la température de travail à 37°C à un pH de 6,8, l'activité antiurolithiasique des

extraits a été examinée en termes de formation d'oxalate de calcium par la mesure de l'absorbance de turbidité à 620 nm.

Pour mieux suivre l'évolution de la cristallisation avec le modèle turbidimétrique mis en place, nous avons déterminé tout d'abord le temps réactionnel correspond à la croissance d'oxalate de calcium est expérimentalement mesurable après l'incubation d'urine dans un bain marie à 37°C. Après 30 min on prend 1mL d'urine et on ajoute un volume de 1 mL d'oxalate de sodium (25 mM) préalablement maintenu à 37°C, puis on déclenche immédiatement la mesure. On obtient ainsi, la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps et on détermine alors, le temps d'induction  $T_i$  qui correspond à une durée moyenne de 300 secondes.

La mesure de l'effet antiurolithiasique des extraits a été déterminée comme suit : 100µl d'extrait diluée (1 g/L) a été ajouté à 1 ml d'urine incubé dans un bain marie à 37 C° et 1 ml d'oxalate de sodium. Après 300 secondes d'incubation à 37 C° et à l'obscurité, on mesure l'absorbance du mélange réactionnel à 620 nm contre un blanc. Nous avons utilisé également deux substances chimiques comme bon inhibiteurs de cristallisation de calculs ; le citrate de sodium qui présente une sensibilité et une fiabilité assez importante et le SUCCINIMIDE PHARBIOL qui est classé comme l'un des médicaments ont un usage très important dans le domaine pharmacologique contre la maladie de la lithiase rénale. Tous les tests ont été effectués en quintuplicate. Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution d'extrait et de références à des concentrations égales 1g/L nous ont permis d'exprimer l'activité antiurolithiasique par le pourcentage d'inhibition (I %).

$$I \% = ((A_t - A_I) / A_t) \times 100$$

$A_t$  : Absorbance mesuré en absence d'inhibiteur ;  $A_I$  : Absorbance mesuré en présence d'inhibiteur

### II.2.5.2. Modèle gravimétrique

Evaluation de l'activité antiurolithiasique par la méthode gravimétrique des extraits préparés ainsi que les standards ont été entrepris par la mesure de la masse éliminée (dissoute) de calcul. L'étude de ce modèle a été effectuée par deux types de calculs rénaux (Urate de calcium et acide urique) (voir annexe). La première étape consiste à laver les fragments de calculs par de l'eau distillée et les mettre dans l'étuve à température 40C° pour le séchage. Après le séchage, les fragments des calculs on été mises en contact avec 5 ml de chaque extrait (ou référence) de concentration 5g/L dans l'étuve à température de 37C° pendant quinze jours. Après cette période de contact, les calculs ont été sortis du milieu expérimental, lavés à l'eau distillée, séchés à 40°C durant 16 heures, puis pesés à l'aide d'une balance de précision pour évaluer la

perte de masse. L'activité antiurolithiasique a été exprimée par le pourcentage de dissolution du calcul rénal (D %).

$$D \% = ((m_0 - m_f) / m_0) \times 100$$

D% : constant de dissolution,  $m_0$ : masse du calcul avant contact ;  $m_f$  : masse du calcul après contact

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince

Pour un essai d'analyse qualitative de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM), puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les fractions méthanoliques et acétoniques, hydrométhanolique, hydroacétonique, aqueux, des deux parties de chaque plante étudiée sur une plaque de gel de silice en utilisant le système suivant : (Ether diéthylique/ acétate d'éthyle) (7/3) (v/v).

Après observation des plaques dans une chambre noire d'une CCM et en s'appuyant sur les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous UV, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent dans la composition des extraits de plantes. Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence plusieurs taches qui absorbent à une longueur d'onde de 366 nm (**Figure 1**). Ces différents spots présentent des taches de couleur violette, bleue, blanche fluorescente, jaune, orange et marron, qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires (C. Manach *et al*, 2004).

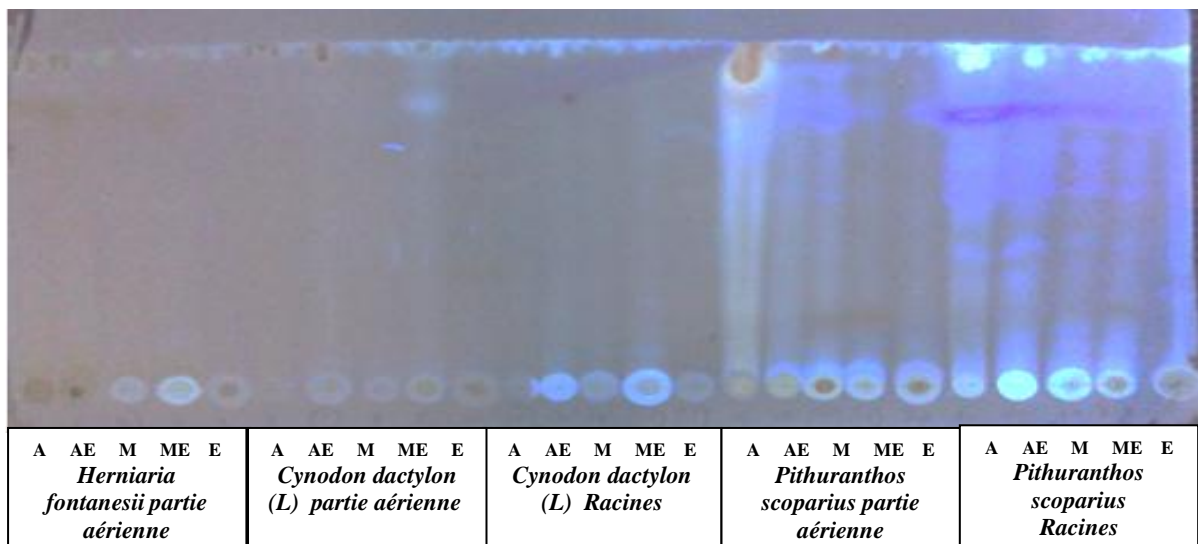


Figure 1 : Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366 nm)

D'ailleurs, nous avons enregistré que tous les différents extraits de chaque partie de plante présentent presque les mêmes chromatogrammes. De plus, les extraits des racines de la plante *Pithuranthos scoparius* et les extraits de la partie aérienne de *Herniaria fontanesii* renferment un grand nombre de molécules comparativement aux autres extraits. Ainsi et après une simple comparaison entre les chromatogrammes des différents extraits, il apparaît clair et évident que certains taches sont communes. En revanche, d'après l'analyse qualitative et l'étude de l'activité antiuroolithiasique de ces extraits qui ont montré des différences significatives, on peut constater l'existence des produits actifs qui n'ont pas été détectés sur le chromatogramme. En effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution.

### III.2. Analyse phytochimique des extraits

Dans le but de rechercher les différentes classes des substances secondaires dans les extraits d'*Herniaria fontanesii*, de *Pithuranthos scoparius* et de *Cynodon dactylon*, nous avons effectué un screening phytochimique par la mise en place d'un ensemble de réactions de caractérisation de différents composés chimiques à savoir : les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les anthocyanes, les terpènes, les amidons, les coumarines, les dérivés anthracéniques et les composés réducteurs.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé les tests phytochimiques sur les deux parties des plantes étudiées avec différents solvants d'extraction.

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi, une réaction franchement positive est représentée par (+++), une réaction moyennement positive est représentée par (++), une réaction faiblement positive est représentée par (+) et l'absence de la substance est représentée par (-). Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

On constate d'un test à l'autre que les tanins catéchiques et les *O*. Hétérosides à génie réduits sont les groupes chimiques les plus fréquents. On les retrouve dans les différentes parties des trois plantes et on note l'absence de tanins galliques, dans tous les échantillons. C'est aussi le cas des anthocyanes, des amidons, des coumarines, des dérivés anthracéniques libres et des stérols et triterpènes.

Tableau 3: Résultats du screening phytochimiques

Les plantes	La partie de la plante	Les solvants	Les Groupes chimiques														
			tanins		Alcaloïdes		Anthocyanes	Amidon	Flavonoïdes	Saponines	Coumarines	Stérols et triterpènes	Dérivés anthracéniques libres	Dérivés anthracéniques combinés			Composés réducteurs
			Gallique	Catéchiques	Mayer	Wagner								C. Hétérosides	O. Hétérosides	O. Hétérosides à génies réduits	
<i>Herniaria fontanesii</i>	Partie aérienne	A	-	+	-	+++	-	-	++	-	-	-	-	+	-	+	-
		A.E	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	++	-	+	-
		M	-	+	-	+++	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	+	-
		M.E	-	++	-	+	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+	-
		E	-	-	-	++	-	-	+	+	-	-	-	+++	-	+	-
<i>Pithuranthos scoparius</i>	Partie aérienne	A	-	+	+	+	-	-	++	-	-	-	-	+++	-	+	-
		A.E	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
		M	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+	-
		M.E	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	+	+
		E	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+++	-	+	++
	Racine	A	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
		A.E	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
		M	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
		M.E	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
		E	-	+	-	++	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+++	+
<i>Cynodon dactylon</i>	Partie aérienne	A	-	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	+	-
		A.E	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
		M	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	++	-	+	-
		M.E	-	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
		E	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	Racine	A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++	-
		A.E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+
		M	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-
		M.E	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-
		E	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	++	-	++	++

A : Acétone (100%), A.E : Acétone/eau (50%/50%). M.E : Méthanol / eau (50%/50%), E : eau (100%) ; (-) Absence de principe actif ; (+) Traces de principe actif ; (++) Présence moyenne de principe actif ; (+++) Riche en principe actif.

D'ailleurs, les alcaloïdes sont présents dans tous les extraits d'*Herniaria fontanesii*. La réaction de Wagner est positive dans toutes les fractions par contre la réaction de Mayer est négative pour la même plante. Pour les autres extraits, les résultats varient d'un extrait à l'autre et d'un échantillon à l'autre.

Les résultats ont affirmé aussi que les saponines présents dans tous les extraits aqueux de différentes parties des plantes testées. Ils montrent aussi l'absence des O. Hétérosides dans tous les extraits de plantes étudiés.

L'apparition des composés réducteurs est aussi constatable dans presque tous les extraits de *Pithuranthos scoparius* et de *Cynodon dactylon* notamment ceux qui renferment de l'eau, sauf les extraits de la plante *Herniaria fontanesii* qui donne des tests négatifs en ces composés.

Les flavonoïdes sont aussi présents dans presque tous les extraits des plantes étudiées sauf les racines de la plante *Cynodon dactylon*. Ils se présentent en quantités variables, avec une dominance importante dans les extraits de la partie aérienne d'*Herniaria fontanesii*.

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits des deux parties de trois plantes ont révélé une considérable présence des C. hétérosides dans tous les extraits, notamment la plante d'*Herniaria fontanesii*.

Cette étude phytochimique qualitative montre que tous les groupes chimiques identifiés au niveau de tous les extraits de trois plantes étudiées, leur confèrent des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie. Toutefois, peu d'étude a été réalisées sur le plan phytochimique de la plante d'*Herniaria fontanesii* (A. Nait Mbarek et al, 1996).

Cependant, l'absence de certains principes actifs dans les extraits des différentes parties de plantes investiguées comme les coumarines, les anthocyanes, les stérols et les terpènes ne justifie pas que ces plantes sont pauvres en ces composés mais, les méthodes d'extraction et les systèmes de solvants utilisées dans notre travail ne sont pas satisfaisantes pour l'extraction des métabolites désirés.

Par exemple, des tests phytochimiques réalisés par certains chercheurs (A. Houaria et al, 2014, H. Adida et al, 2015 ; M. Dahiaa et al, 2009 ;) sur les extraits des deux parties de *Pithuranthos scoparius* ont révélé une forte présence de coumarines dans certains extraits. De plus, les terpénoïdes sont présents aussi dans presque tous les extraits étudiés. Tandis que, nos extraits

présentent des tests négatifs en ces métabolites. D'ailleurs, certains chercheurs (N. Arumugam *et al*, 2014 ; K.Suresh *et al*, 2008) rapportent dans leurs travaux que la plante *Cynodon dactylon* contiennent des stérols et des terpénoïdes, ce qui ne corrobore pas avec nos résultats.

### III.3. Quantification des composées phénoliques

Les résidus de chaque extraction sont pesés pour calculer le rendement ; celui-ci varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité. Les résultats obtenus (**Tableau 4**) montrent que les extraits secs obtenus représentent un aspect visqueux de couleurs différentes avec des rendements qui varient entre 2,4 et 38, 835 %.

Cependant, les rendements les plus importants sont enregistrés dans les parties aériennes suivis des racines. La valeur la plus importante est convenue à l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *Herniaria fontanesii*, tandis que la valeur la plus faible est trouvée dans l'extrait acétonique des racines de *Pithuranthos scoparius*. Il est constatable aussi, que les plus faibles quantités du résidu sec ont été aperçues dans les extraits acétoniques comparativement aux autres extraits. De ce fait, on peut déduire que les plantes étudiées renferment un matériel riche en composés à caractère polaire.

**Tableau 4 : Rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux**

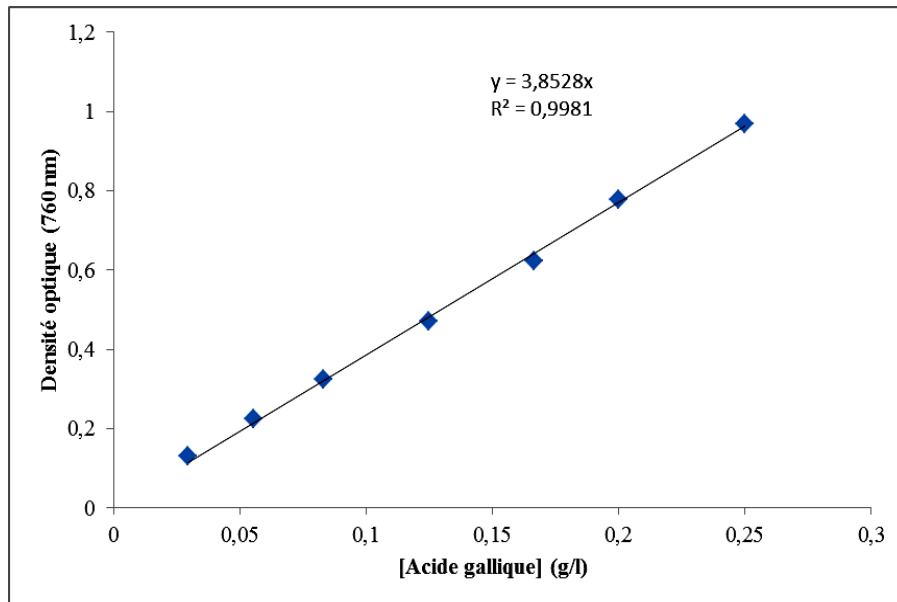
	<i>Cynodon dactylon (L.)</i>				<i>Pithuranthos scoparius</i>				<i>Herniaria fontanesii</i>	
	Partie aérienne		Racines		Partie aérienne		Racines		Partie aérienne	
	R(%)	PT (mg/g)	R(%)	PT (mg/g)	R(%)	PT (mg/g)	R(%)	PT (mg/g)	R(%)	PT (mg/g)
A	30,46	1,377 ±0,025	7,57	0,867 ±0,021	5,05	2,143 ±0,016	2,40	0,984 ±0,016	7,23	4,971 ±0,036
A.E	32,00	2,710 ±0,118	12,73	2,051 ±0,017	22,02	4,839 ±0,140	15,67	1,542 ±0,053	34,31	2,755 ±0,026
M	20,57	1,880 ±0,0276	13,91	1,333 ±0,017	12,72	3,58 ±0,132	10,49	6,230 ±0,091	37,27	2,489 ±0,013
M.E	16,57	5,160 ±0,197	12,90	0,822 ±0,015	10,44	2,133 ±0,069	16,21	4,745 ±0,249	38,83	4,926 ±0,030
E	20,13	2,759 ±0,026	13,42	1,369 ±0,051	19,43	4,607 ±0,075	18,01	2,754 ±0,022	25,65	0,968 ±0,042

(R (%) : Rendement d'extraction, PT : Teneur en polyphénols totaux (mg/g)

Le dosage des phénols totaux a été effectuée par la méthode de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes adoptées dans la plupart des travaux concernant les antioxydants naturels. Elle est considérée comme étant la meilleure méthode spectrophotométrique pour la quantification des polyphénols totaux.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 2**) et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (GAE) par gramme de la matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le (**Tableau 4**).

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux, on constate que les taux en composés phénoliques sont variables et qui s'étalent entre 0,867 et 5,160 mg GAE/g de la matière sèche.



**Figure 2: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans les extraits méthanoliques et hydrométhanoliques. Tandis que, les teneurs les plus faibles sont remarquées pour les extraits acétoniques. En outre, nous avons enregistré que les extraits méthanoliques qui ont donné un rendement le plus important en résidu sec ont offert aussi une teneur importante en phénols totaux. Ce résultat pourra être expliqué par le fait que la polarité des extraits influe sur le type de composés extraits.

Aussi, nous avons constaté la partie aérienne contiennent des proportions plus élevées de polyphénols comparativement aux racines de mêmes plantes et la même remarque pour le rendement. Ces résultats montrent principalement que les composés phénoliques ne sont pas abondants au niveau des racines ce qui revient probablement à la solubilité relative des polyphénols présents dans cette partie. En fait, la solubilité des polyphénols est conditionnée par le type de solvant utilisé. Ainsi, pour une haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié (Z. Mohammedi et F. Atik, 2011 ; Z.Wissam et al , 2012 ; W. Aboshora et al, 2014). D'ailleurs, la répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été rapportée par plusieurs auteurs (V.Rao, 2012 ; F. Gianmaria et al, 2011 ; G.Pace et al, 2014).

L'inconvénient majeur de ce test est que le réactif du Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux composés phénoliques, mais il réagit avec tous autres composés qui contiennent un groupement OH comme les sucres, les protéines et les pigments par ce qu'une telle extraction ne donne pas que les composés phénoliques. De-ce-fait, les valeurs obtenues en phénols totaux ne représentent pas les teneurs réelles de ces substances dans les plantes investiguées.

### III.3. Evaluation de l'activité antiurolithiasique

La maladie de lithiase urinaire a affligé l'humanité depuis l'antiquité et peut persister avec des conséquences médicales graves, durant toute la vie d'un patient. En outre, l'incidence des calculs rénaux a été augmentée dans les sociétés occidentales dans les dernières années, en association avec le développement économique (P. Rieu , 2005).

Actuellement, la phytothérapie ou la médecine traditionnelle a été employée pour l'évaluation d'antiurolithiasique, et certaines plantes médicinales sont utilisées d'une manière traditionnelle pour le traitement des calculs urinaires. Parmi les plantes antiurolithiasiques les plus réputées des familles : les *caryophyllacées*, les *fabacées* et les *apiacées* (A. Amar et al, 2010).

Dans notre étude on a choisi trois plantes médicinales locales à savoir ; *Herniaria fontanesii*, *Pithuranthos scoparius* et *Cynodon dactylon*. Le choix de ces plantes est basé sur des données ethnopharmacologiques indiquant leur l'utilisation en médecine traditionnelle locale contre la lithiase urinaire.

L'évaluation de l'activité antiurolithiasique *in vitro* des extraits des plantes investiguées a été effectué par deux tests (modèles) chimique *in vitro* ; un modèle turbidimétrique mesurant ainsi l'inhibition de formation d'oxalate de calcium en présence et en absence d'inhibiteur et un

modèle gravimétrique mettant en évidence le pouvoir de dissolution des calculs urinaires composés d'urate de calcium et d'acide urique par les extraits de nos plantes.

La cristallisation de diverses substances a fait l'objet de nombreux travaux, particulièrement celle de l'oxalate de calcium. On retrouve plusieurs modèles de cristallisation *in vitro* qui ont en commun des solutions sursaturées en ions cristallisables. Certains modèles reposent sur la variation de la concentration des substances cristallisables, alors que d'autres se basent sur l'ensemencement de la solution par des cristaux qui amorcent la cristallisation (F. Abdelmalek et al, 2001 ; S. Vamsi et al, 2014). Après avoir provoqué la cristallisation, le but reste à évaluer cette dernière par différentes techniques telle que la conductimétrie, la spectrophotométrie et la méthode sur gel (A. Kumar et al, 2013 ; A. Patil et al, 2014).

Pour l'ensemble de ces études, la première espèce cristalline qui se forme est l'oxalate de calcium trihydraté ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), cette forme instable donne spontanément la structure la plus stable qui est l'oxalate de calcium monohydraté ou whewellite (A. Aggarwal et al , 2010 ; S. Tayal et al, 2012).

Les travaux réalisés sur les processus de cristallisation et d'inhibition *in vitro* ont permis de préciser les conditions thermodynamiques et cinétiques de la cristallisation de l'oxalate de calcium et de tester l'activité et le pouvoir d'inhibition de substances chimiques et/ ou naturelles. Le modèle d'étude des inhibiteurs de la cristallisation oxalocalcique que nous avons adopté est basé sur le principe de la turbidimétrie se référant sur la croissance cristalline qui comporte la nucléation, la croissance et l'agrégation. La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure le trouble (absorbance) qui existe dans une solution. La valeur de l'absorbance A est déterminée par rapport à une valeur de référence

Dans notre travail, la cristallisation de l'oxalate de calcium *in vitro*, a été effectuée par le modèle turbidimétrique dans un système fermé à 37°C, car il est plus simple, possède une bonne reproductibilité, suit la cristallisation d'une façon continue et capable de montrer clairement les trois phases (P. Antinozzi et al, 1992).

L'allure générale des courbes obtenues par la turbidimétrie est représentée par trois parties (Figure 3). Une première partie correspond à l'étape de nucléation cristalline qui est caractérisée par un temps d'induction  $T_i$ . Une phase ascendante de forte croissance, linéaire sur une large partie de temps correspondant à la croissance cristalline qui est caractérisée par un deuxième paramètre cinétique qui est la pente turbidimétrique. Enfin, une lente décroissance passant par un

maximum et traduisant la phase d'agrégation qui présente un intérêt important dans l'étude de la cristallisation (F. Abdelmalek et al, 2001 ).

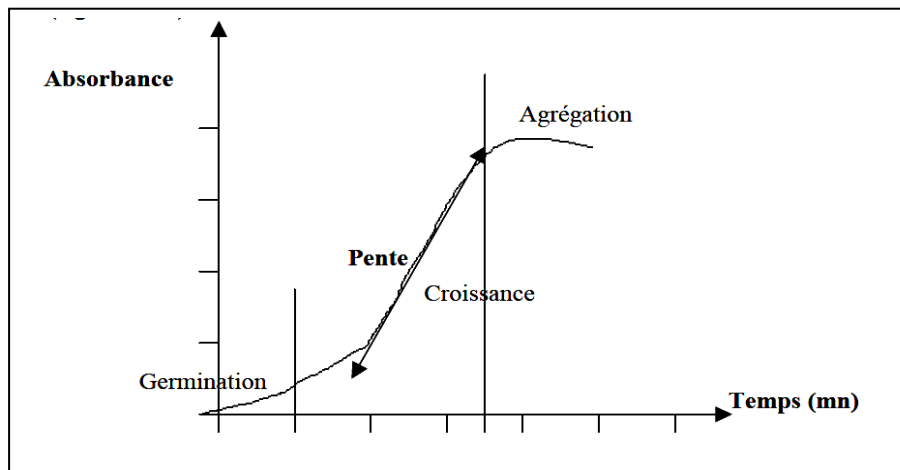


Figure 3: L'allure générale de la courbe turbidimétrique (F. Abdelmalek et al, 2001 )

La formation du calcul rénal est un processus complexe qui résulte d'une succession de plusieurs événements physico-chimiques comprenant, la nucléation, la croissance de noyau et en fin l'agrégation qui caractérisé par une croissance puis une stabilité de densité (S. Dodola et al, 2008). Pour empêcher ce défaut de fonctionnement physiologique, différents extraits de trois plantes médicinales locales (*Herniaria fontanesii*, *Pithuranthos scoparius* et *Cynodon dactylon*) sont employées par l'étude de leur activité antiurolithiasique comparativement à deux inhibiteurs de référence choisis.

Dans notre étude, l'incubation d'urine de 24h d'un homme sans antécédents lithiasiques avec l'oxalate de sodium de concentration 25 mM à 37 C° et à pH=6,8 résulte la précipitation de l'oxalate de calcium. Les mesures des densités optiques d'oxalate de calcium formés en fonction du temps nous on permit de tracer la courbe suivante (Figure 4) :

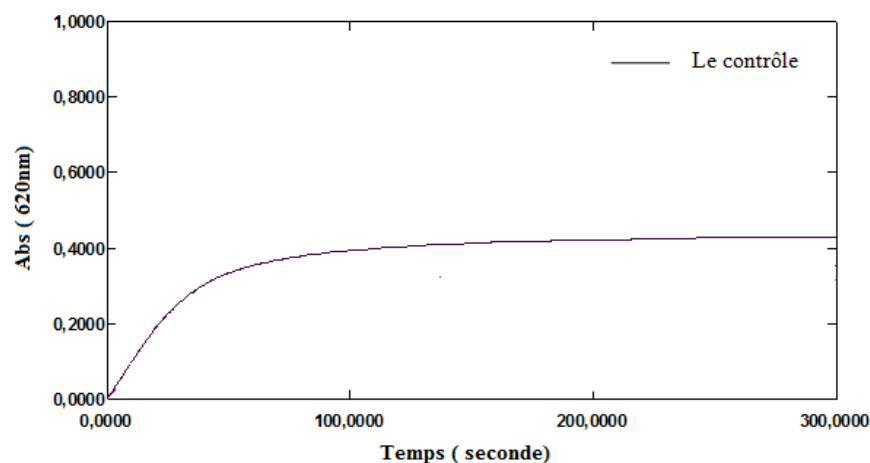


Figure 4: Courbe de cristallisation d'oxalate de calcium sans inhibiteur

Premièrement, la courbe ci-dessus possède une allure similaire à celle obtenue par turbidimétrie et rapporté dans des travaux courants (A.Bensatal, 2010 ; F. Abdelmalek et al, 2001 ).

D'après cette courbe, on constate que le temps réactionnel correspond à la croissance d'oxalate de calcium est égale à 300 secondes. Après la détermination de ce paramètre d'agrégation, nous avons tenté ensuite à l'étude du pouvoir antiurolithiasique de nos extraits.

Après avoir déterminé les conditions optimales qui répondent au mieux au modèle retenu, nous avons entrepris ensuite l'étude proprement dite de la cristallisation en présence de nos extraits. Egalement, nous avons testé deux substances inhibitrice comme référence ; le citre de sodium l'inhibiteur le plus étudié dans d'autres modèles et le succinamide parbiol pour son action inhibitrice vis-à-vis d'oxalate de calcium. Pour tous les inhibiteurs étudiés (extraits et références), nous avons travaillé avec des concentrations égales à 1g/L. Chaque courbe de cristallisation de différents extraits de chaque partie de plante a été comparée à celle sans inhibiteur (contrôle) et à celle avec référence (Figures 5-11).

Dans un souci de simplicité de courbes obtenues, nous avons utilisé les abréviations suivantes : A : Extrait acétonique, AE : Extrait hydroacétonique, M : Extrait méthanolique, ME : Extrait hydrométhanolique, E : Extrait aqueux et CS : Citrate de sodium.

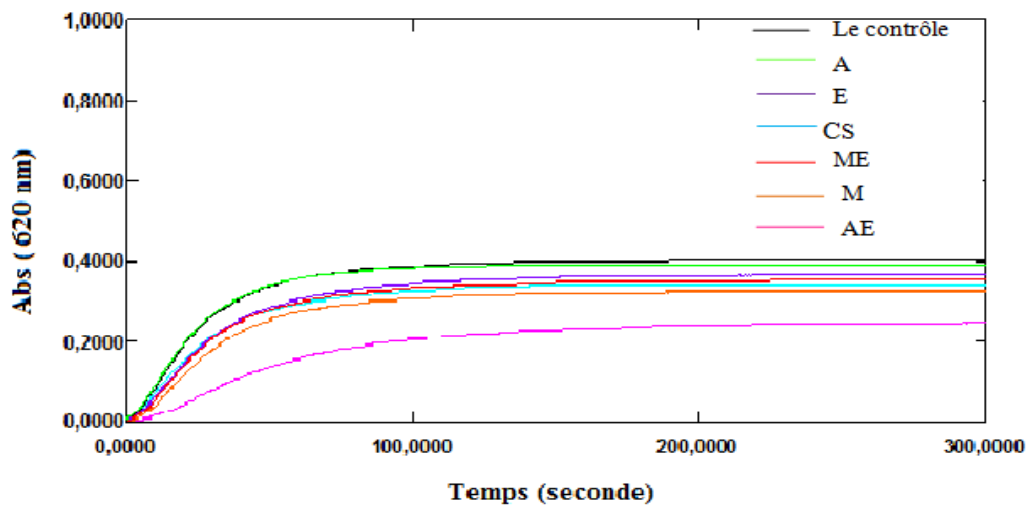


Figure 5 : Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits de la partie aérienne d'*Herniaria fontanesii*

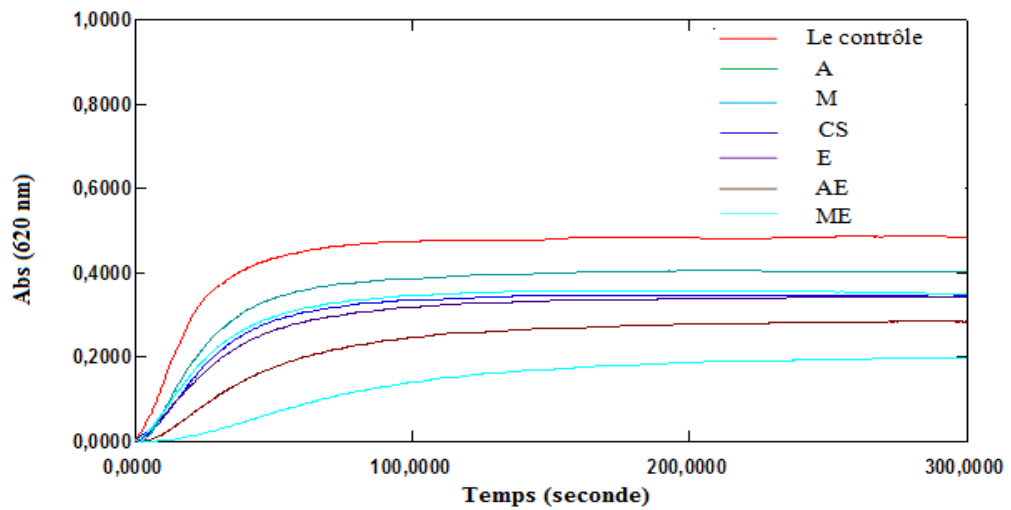


Figure 6: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits de la partie aérienne de *Pithuranthos scoparius*

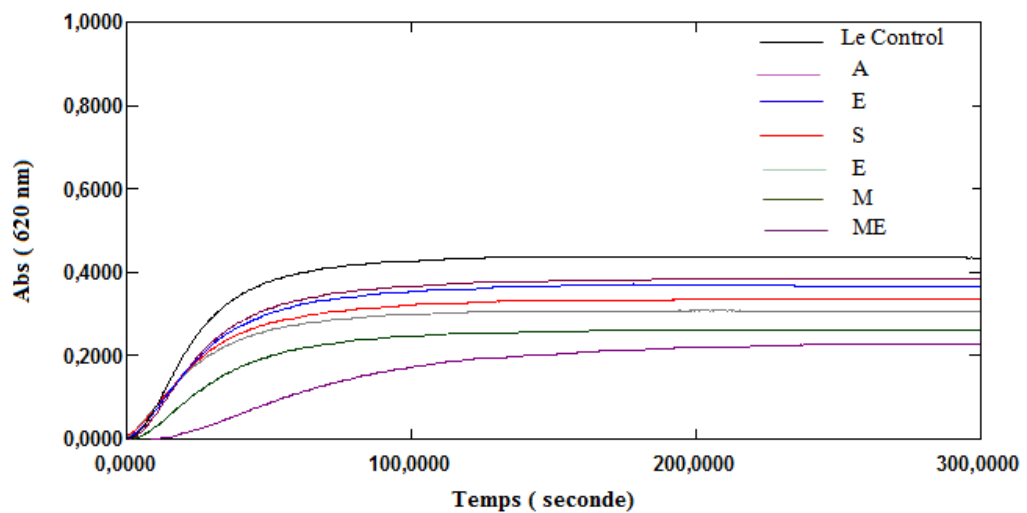


Figure 7: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits des racines de *Pithuranthos scoparius*

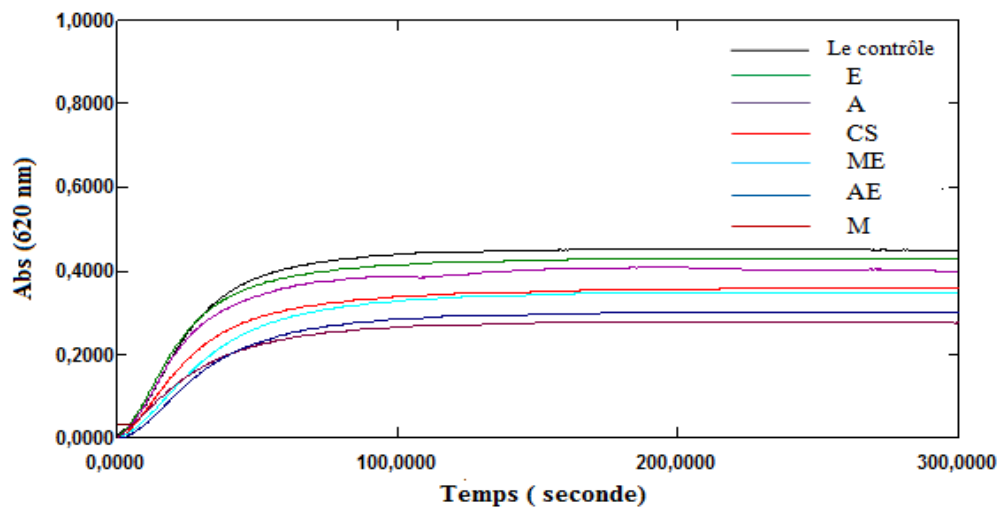


Figure 8: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits de la partie aérienne de *Cynodon dactylon*

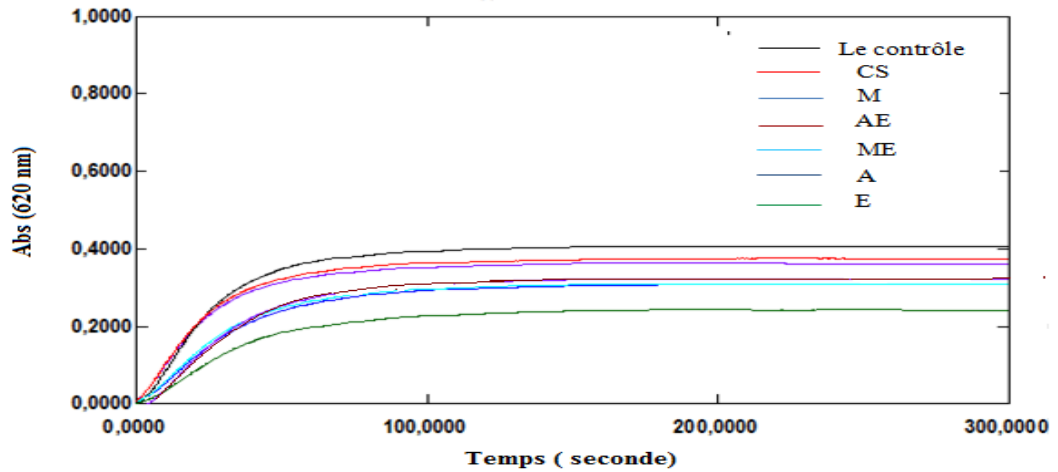


Figure 9: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence des extraits des racines de *Cynodon dactylon*

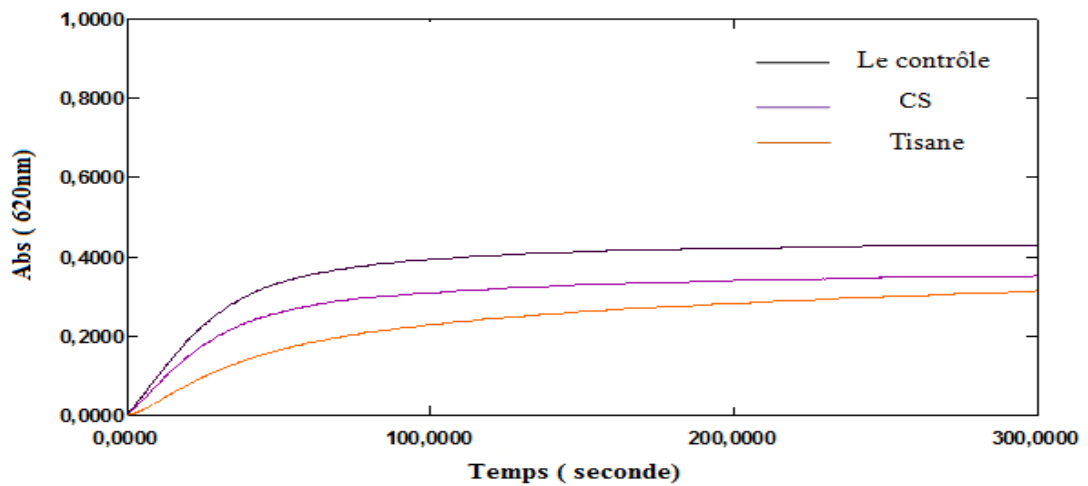


Figure 10: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence de la tisane

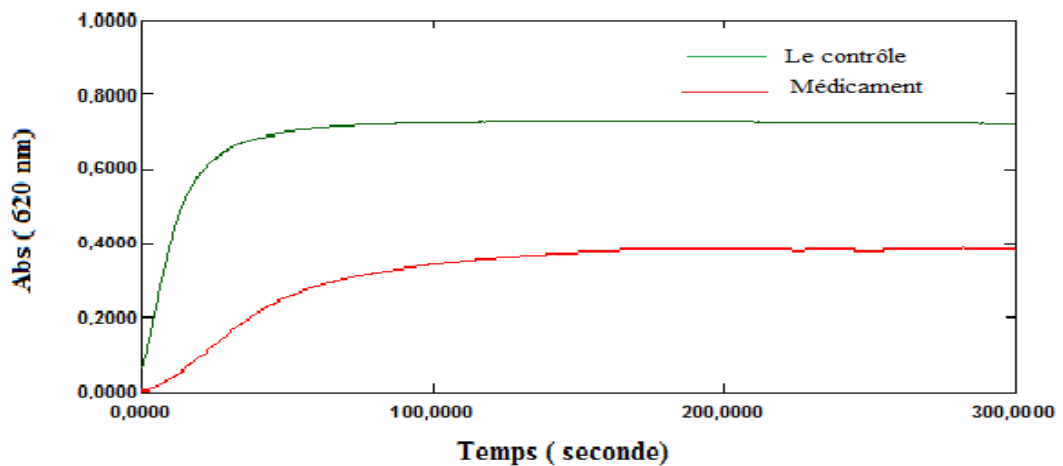


Figure 11: Cristallisation de l'oxalate de calcium dans les urines de sujet sain en présence de Succinamide pharbiol

D'après les figures précédentes (5-11), on observe que les courbes de cristallisation en présence d'extraits ont même allure qu'en l'absence d'inhibiteur. Ils montrent aussi, que l'inhibition change avec la nature de l'extrait. Le temps d'induction ( $T_i$ ) varie aussi avec la nature de l'extrait suggérant que le mode d'inhibition est une complexation.

D'après les courbes de cristallisation obtenues, nous avons tenté de quantifier le pouvoir inhibiteur (I) exprimé en % par rapport à un témoin. Ce pourcentage d'inhibition oxalocalcique a été calculé à partir de cinq essais manuels effectués afin de réduire au minimum des erreurs expérimentales systématiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 5) :

**Tableau 5: Pourcentage d'inhibition de cristallisation oxalocalcique des extraits et standards pour des concentrations égales à 1 g/L**

	Pourcentage d'inhibition (%)				
	<i>Cynodon dactylon</i> (L.)		<i>Pithuranthos scoparius</i>		<i>Herniaria fontanesii</i>
	Partie aérienne	Racines	Partie aérienne	Racines	Partie aérienne
Acétone	16,79 ±0,71	40,53 ±0,53	8,92 ±0,40	11,40 ±0,45	4,59 ±0,12
Acétone/Eau	35,88 ±0,62	31,79 ±0,62	40,22 ±0,67	30,43 ±0,55	47,05 ±0,75
Méthanol	41,77 ±0,76	23,00 ±0,53	19,40 ±0,41	36,63 ±0,52	24,69 ±0,85
Méthanol/Eau	25,27 ±1,09	40,27 ±0,75	51,14 ±0,51	40,35 ±0,80	22,43 ±0,56
Eau	12,12 ±0,61	50,59 ±0,61	22,04 ±0,48	18,69 ±0,75	11,34 ±0,99
		<b>Tisane</b>	<b>Citrate de Na</b>	<b>Succinimide pharbiol</b>	
		49,78 ±0,08	21,14 ±0,21	60,39 ±0,49	

Dans la médecine, il existe plusieurs traitements médicaux possibles contre la lithiase rénale. Parmi les médicaments les plus prescrits pour le traitement d'appoint des lithiases rénales de nature oxalique prédominante est le Succinimide pharbiol (*Ministre chargé de la Santé et de la Sécurité Sociale, 2006*). De ce fait, l'activité antiurolithiasique de nos extraits a été référée à ce médicament de référence.

D'après les résultats obtenus, on aperçoit que les extraits testés découvrent des activités antiurolithiasique remarquables avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 20 %. En revanche, ils existent certains extraits ont une activité anticristallooxalocalcique relativement faible par rapport au standard (Citrate de sodium). Mais comparativement au médicament de

référence, seul l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *Pithuranthos scoparius* et l'extrait aqueux des racines de *Cynodon dactylon* ont offert des pourcentages d'inhibitions (51,14 et 50,59%) proches à ce standard.

D'autre part, on observe que les valeurs du pourcentage d'inhibition (4,59-50,59%) obtenus varient selon le type du solvant d'extraction et la partie de la plante utilisée. D'ailleurs, ces valeurs atteignent une valeur maximale de 50,59% pour l'extrait aqueux de la partie racines de *Cynodon dactylon*. Toutefois, les extraits hydrométhanoliques et hydroacétoniques exhibent les valeurs anticristalloxalocalcique les plus importants. De même, aucune corrélation positive n'a été détectée entre les pourcentages d'inhibition et les teneurs en phénols totaux.

D'après les analyses phytochimiques, les extraits qui renferment des composés flavonoïdiques octroient des activités anticristalloxalocalciques marquantes et cela concorde avec les conclusions formulées dans la littérature qui indiquent que les flavonoïdes réduisent la cristallisation oxalocalcique (F. Grases *et al*, 2009).

Ainsi, l'extrait hydroacétonique de la partie aérienne de *Herniaria fontanesii* qui est prescrite pour le traitement des calculs urinaire (F. Atmani *et S.Khan*, 2000) a donné un taux d'inhibition élevé de 47,05%. Ceci est probablement dû à la présence des polyphénols qui forment un complexe avec les cations du calcium (S. Doddola *et al*, 2008).

Egalement, on remarque que l'extrait hydrométhanolique de *Pithuranthos scoparius* de la partie aérienne et des racines empêchent 51,14% et 40,35% respectivement la précipitation d'oxalate de calcium. Ceci peut être interprété par le fait que les extraits possèdent des composés inhibiteurs tels que les tanins. Ces composants renferment des fonctions acides directement impliqués dans la complexations des ions de calcium et par conséquent la cristallisation oxalocalcique se réduit (I. Das *et al*, 2005 ; J. Catherina *et al*, 1988).

À la même concentration, l'extrait hydrométhanolique et l'extrait hydroacétonique de la partie aérienne de *Cynodon dactylon* inhibent la cristallisation oxalocalcique avec des pourcentages excédant 35%. Cela peut être dû à la présence des alcaloïdes. En revanche, l'extrait acétonique et l'extrait aqueux inhibent de faibles taux d'inhibition. D'ailleurs, les extraits acétonique et aqueux des racines de la même plante accordent de bonnes inhibitions (supérieure à 40,50%), ce qui peut être dû à leur richesse en saponines (P. Soundararajan *et al*, 2006).

Ainsi, nous avons constaté que les extraits inhibant de pourcentage d'inhibition oxalocalcique supérieur à 47 %, possèdent tous des tanins catéchiques, des *C*-Hétérosides et des *O*-Hétérosides à génines réduits. On pense alors, que l'activité anticristallooxalocalcique d'extraits pourra être due à l'existence de ces trois familles phytochimiques.

Après le screening anticristallooxalocalcique de nos extraits par le modèle turbidimétrique, un autre essai a été réalisé pour tester la dose la plus efficace des extraits examinés vis-à-vis la dissolution des calculs rénaux ; c'est le modèle gravimétrique. Pour cela, nous avons comparé l'effet des extraits ayant des pourcentages d'inhibition supérieure à 40 %, en les mettant en contact avec des fragments de deux types de calculs collectés chez différents patients souffrant de lithiase rénale.

Bien qu'en Algérie comme dans tous les autres pays, l'oxalate de calcium soit la forme cristalline la plus courante. Pour cela, nous avons choisi des calculs de type acide urique et son sel l'urate de calcium parce que ce type de calcul est souvent plus difficile à traiter et à prévenir par les procédures urologiques et médicales actuellement disponibles.

Tout d'abord, des analyses structurales par diffraction des rayons (DRX) sont menées sur les deux types de calculs afin d'identifier leur structure cristalline. D'après les diffractogrammes obtenus des deux type de calculs et comparativement aux diffractogrammes de deux composés de référence (acide urique et urate de calcium) (Voir annexe), on a pu affirmer que le type du calcul 1 c'est l'acide urique de numéro de CAS : 54495-64-6 et de formule  $C_5H_4N_4O$  ; tandis que, le deuxième calcul est à base d'urate de calcium de numéro de CAS : 36-1619 et de formule  $C_{10}H_6CaN_8O_6$ .

L'exposition des calculs aux extraits choisis ayant des concentrations de 5 g/L, n'a entraîné aucunes modifications perceptibles ni après 24 heures ni après trois jours. Alors, les calculs ont été laissés au contact des extraits pendant deux semaines et l'activité des extraits a été évaluée en calculant le taux de dissolution de calculs après séjour dans le milieu expérimental en comparant le poids résiduel de calculs par rapport à leur poids initial (**L. Saso et al, 1998**). La capacité de dissolution des calculs par les différents extraits ainsi que les inhibiteurs de référence durant deux semaines est illustrée dans le tableau suivant (**Tableau 6**) :

**Tableau 6: Effet des extraits de plantes sur la dissolution *in vitro* des calculs urinaires**

	Pourcentage de dissolution (D%)									
	<i>Cynodon dactylon</i> (L.)				<i>Pithuranthos scoparius</i>				<i>Herniaria fontanesii</i>	
	Partie aérienne		Racines		Partie aérienne		Racines		Partie aérienne	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Acétone	-	-	9,11	1,35	-	-	-	-		
Acétone/Eau	-	-	-	-	10,26	30,33			16,49	17,89
Méthanol	8,96	3,07	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthanol/Eau	-	-	6,30	28,6	13,44	9,68	46,39	14,72	-	-
Eau	-	-	14,68	5,45	-	-	-	-	-	-
			Tisane		Citrates de Na		Succinimide pharbiol			
			C1	C2	C1	C2	C1	C2		
			17,33	24,56	11,72	6,88	42,47	75,95		

(C1 : calcul 1 de type acide urique ; C2 : calcul 2 de type urate de calcium)

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 6, les extraits de plantes se sont révélés qualitativement et quantitativement plus actifs que la solution de citrate de sodium et moins actifs que le médicament (Succinimide pharbiol) utilisés comme références. D'ailleurs, la solution de citrate de sodium a donné des taux de réduction de masse vau 11,72% et 6,88% du calcul 1 et du calcul 2 respectivement. Tandis que, l'emploi du médicament a montré un pouvoir de solubilisation supérieur par rapport aux extraits et cela en présence des deux types morphologiques de calculs C1 et C2 avec de pourcentages de dissolution vau à 42,47% et 75,95% respectivement.

Cependant, l'étude comparative du pouvoir de dissolution des extraits de plantes sur les deux calculs durant 15 jours, affirme que l'extrait de hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* avait un effet plus marqué avec un pourcentage de 46,39 % de réduction de la masse du calcul 1. Alors que l'extrait hydroacétonique de la partie aérienne de *Pithuranthos scoparius*, l'extrait méthanolique des racines de *Cynodon dactylon* et l'extrait de tisane entraînaient respectivement une perte de poids du calcul 2 égale à 30,33 %, 24,56 et 28,6 %. Par contre on marque une faible réduction de poids sur les deux types du calcul par les extraits méthanolique et les extraits acétoniques des deux parties de *Cynodon dactylon* avec des pourcentage de dissolution compris entre 1,37 et 9,11 %.

Par ailleurs, certains extraits dissolvaient aussi bien les calculs de type acide urique que de type urate de calcium et vice versa. Cela suggère que la dissolution des calculs par les extraits de plantes est un processus dont le mécanisme est probablement indépendant de l'état de surface du calcul, ce qui pourrait expliquer l'efficacité observée du médicament sur les deux types de calculs.

Le bon pouvoir dissolvant de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sur les calculs étudiés résulte d'une interaction entre l'acide urique et les molécules présentes dans cet extrait au cours du processus de dissolution. D'après l'analyse phytochimique de cet extrait, on pense que son activité dissolvante pourra être due à la présence de polyphénols de type tanins ou flavonoïdes ainsi que les dérivés anthracéniques. Cette constatation est soutenue par certains travaux de recherche (K.Tanzeer, 2009 ; N. Oyewo et al, 2012).

D'ailleurs, le screening phytochimique par CCM mono et bidimensionnelle de cet extrait a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes (Réactif d' $AlCl_3$ , fluorescence jaune sous lumière UV) (Figure 12-15). Aussi, on peut émettre l'hypothèse que les composés polaires, qui apparaissent en marron révélés à la vanilline sulfurique, sont des hétérosides (Figure 16).

Les spots semblent contenir des triterpènes apparaissent en coloration bleue violette par révélation à la vanilline sulfurique (Figure 16) et fluorescence bleu à 366 nm par révélation avec le réactif de Liebermann et Burchard) (Figure 17). Ces constats ont été faits par certains chercheurs (M Akhanovna et al, 2012). Subséquemment, l'objectif de ce travail sera ultérieurement focalisé à isoler les composés majoritaires de cet extrait afin de tester leur pouvoir antiurolithiasique.



Figure 12 : Photo de la plaque CCM analytique monodimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sous lampe UV (366nm).



Figure 13 : Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sous lampe UV (366nm).

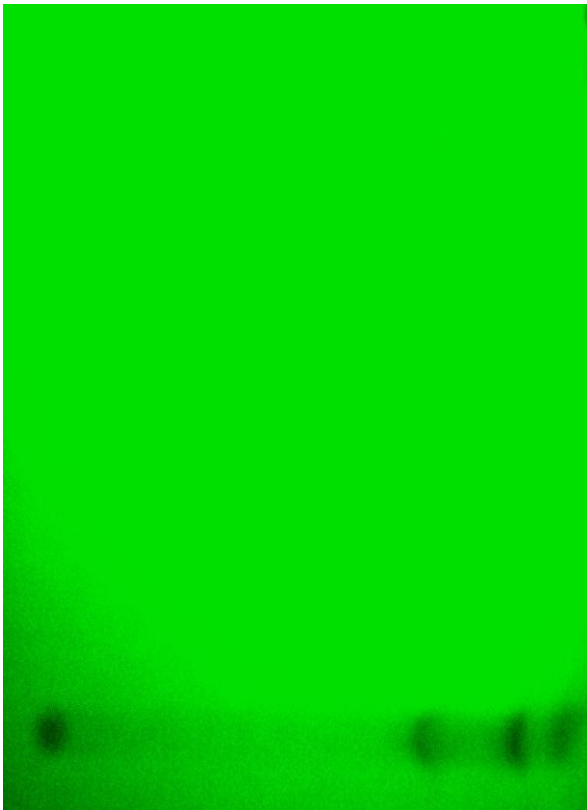


Figure 14 : Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sous lampe UV (254nm)

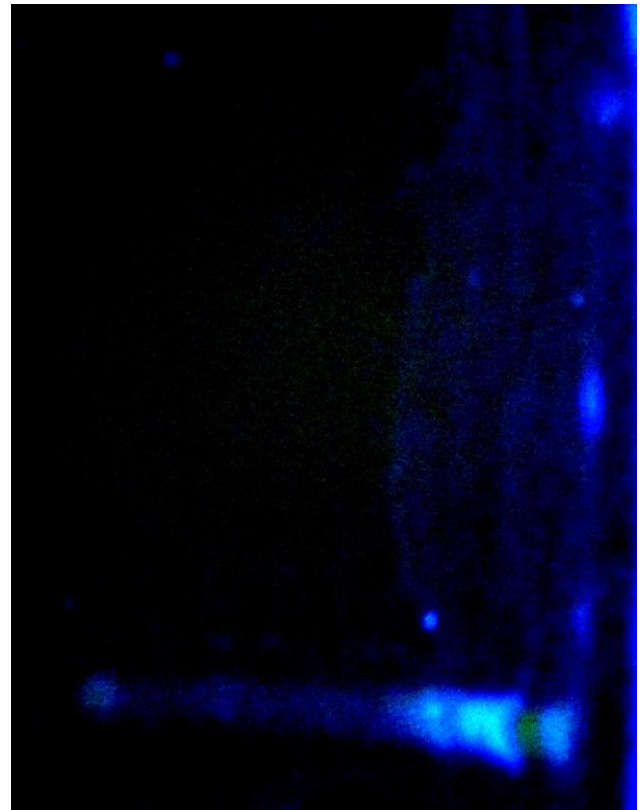


Figure 15 : Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sous lampe UV (366nm) après pulvérisation avec  $AlCl_3$  (1%)

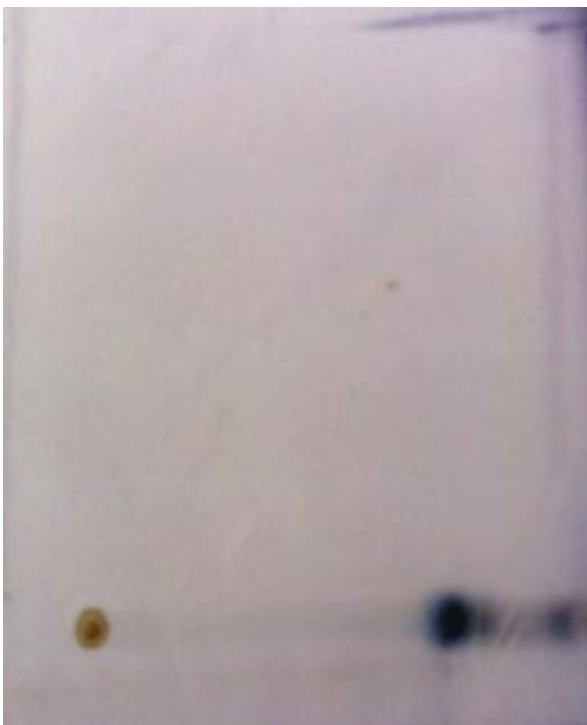


Figure 16 : Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* après pulvérisation par la vanilline sulfurique



Figure 17 : Photo de la plaque CCM analytique bidimensionnelle de l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* sous lampe UV (366nm) après pulvérisation par le réactif de Libermann- Burchard

L'examen de l'ensemble des constituants chimiques présents dans les différentes plantes utilisées suggère qu'un mécanisme d'action indépendant du pH est responsable de l'effet solvant constaté. Cet effet pourrait être lié à la formation de complexes calcul-principe actif, par exemple acide urique-flavonoïdes, acide urique-tanins ou encore acide urique-alcaloïdes dont la stabilité serait assurée par des liaisons hydrogènes et des liaisons hydrophiles entre les groupements fonctionnels des principes actifs et les fonctions carbonyles ou amines de la molécule d'acide urique ou son sel l'urate de calcium. Les complexes formés seraient beaucoup plus solubles que l'acide urique lui-même, entraînant ainsi la dissolution des calculs.

En conclusion, les résultats des expériences de dissolution *in vitro* des calculs ont démontré l'efficacité des extraits des trois plantes particulièrement l'extrait hydrométhanolique des racines du *Pithuranthos scoparius*. Le screening phytochimique réalisé sur cet extrait a prouvé par ailleurs, qu'elles contiennent différents groupes de composés chimiques qui seraient à l'origine de son activité biologique. Ces extraits pourraient donc constituer un traitement intéressant pour les calculs urinaire.

#### **IV. Conclusion générale**

Dans le but de traiter un problème de santé (la lithiase urinaire), de diminuer le facteur cristallogène et d'éviter la formation des calculs par précipitation de l'oxalate de calcium, nous avons entrepris l'étude *in vitro* sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique (méthode turbidimétrique) et la dissolution des calculs rénaux (méthode gravimétrique) en présence de différents extraits des trois plantes sahariennes de la région de Laghouat à savoir *Herniaria fontanesii*, *Pithuranthos scoparius* et *Cynodon dactylon*.

La méthode turbidimétrique nous a permis de suivre la cinétique de formation de lithiase calcique et de déterminer le pouvoir d'inhibition dans les différents extraits des plantes étudiés. D'après les résultats obtenus, tous les extraits de trois plantes, présentent un pouvoir antilithiasique confirmé notamment l'extrait hydrométhanolique de *Pithuranthos scoparius*, comparativement aux inhibiteurs de synthèse (Citrate de sodium et Succinimide parbiol). Le pouvoir antiurolithiasique de ces plantes est dû probablement à la présence des tanins catéchiques, aux flavonoïdes et aux *O*-hétérosides à génines réduites. Outre, l'activité antiurolithiasique de *Herniaria fontanesii* et *Cynodon dactylon* est déjà connue dans la médecine traditionnelle, cependant la plante *Pithuranthos scoparius* qui présente un effet antilithiasique très important est inconnue. D'ailleurs, aucune étude de l'effet antiurolithiasique n'a été effectuée sur *Herniaria fontanesii* et *Pithuranthos scoparius*.

L'effet de ces plantes a été étudié également par modèle gravimétrique. Les changements dans les caractéristiques structurales par la perte de masse des calculs rénaux de type urate de calcium et acide urique après traitement avec les extraits de plantes, suggèrent que seul l'extrait hydrométhanolique des racines de *Pithuranthos scoparius* exerce un effet de solubilisation remarquable sur les calculs oxalocalcique comparativement à deux solutions de référence de Citrate de sodium et de Succinimide pharbiol (5 g/L). Ce résultat est un grand pas vers la recherche d'un remède efficace contre la formation de lithiases urinaires.

Enfin, cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes dans le traitement de la lithiase urinaire, mais il serait nécessaire de confirmer ce travail par des études *in vivo* afin de valider ces observations *in vitro* sur les apports de ces plantes dans le traitement de la lithiase oxalocalcique. Egalement, des essais complémentaires seront essentiels pour objectiver un bénéfice scientifiquement démontré de certains des extraits testés sur la solubilisation d'autres types de calculs rénaux. Par ailleurs, Il serait nécessaire de chercher à déterminer les molécules responsables à l'activité antiurolithiasique des racines de la plante *Pithuranthos scoparius*.

## V. Références bibliographiques

A. Aggarwal, S. Tandon , S. Singla, C. Tandon. Diminution of Oxalate Induced Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Inhibition of Calcium Oxalate Crystallization *in vitro* by Aqueous Extract of *Tribulus terrestris*. International Braz J Urol Vol, 2010 , 36 (4), p 480-489..

A. Amar, D. Harrache, F. Atmani, G. Bassou, F. Grillon, "Effect of *Parietaria officinalis* on the crystallization of calcium oxalate, in urine, *Phytothérapie*, 2010, 8 (6), p 342.

A. Bensatal . Etude phytoscreening chimique et antilithiasique de quelques espèces végétales (*Pistacia atlantica Desf* , *Artemisia campestris L* , *Tamarix gallica L*) de la région de Djelfa . Thèse de doctorat , 2010, p 91.

A. Diallo , Biologiques de *Syzygium guineense* WILLD .thèse de doctorat en pharmacie.université de BAMAKO , 2005 , P 40-42.

A. Guyton, J. Hall. Textbook of Medical Physiology . Philadelphia Saunders , 2006, 11 , p307-325.

- A. HOURIA, F. ESMA, D. RABAH , D.Mezouar . In vitro antibacterial activity of *Pituranthos scoparius* from Algeria. Int. J. Biol Chem. Sci, 2014 , 4 , p 2095-2108.
- A.Kumar, B. Saran, G. Harshada, R. Keerthi, N. Vandana,. Evaluation of *In vitro* Antiurolithiatic Activity of Vaishvanara Churna . Journal of Medicinal Plants Studies, 2013, 1, (3), p142-144.
- A. Nait MBark, D. Guillaume, O. Kol, Z. Charrouf . Triterpenoid saponins from *Herniaria fontanesii* , Plant chemistry, 1996, 43( 5), p 1075.
- A.Nait Mbark , Z . Charouf, V. Wray, M . Nimtz , T. Schopke.Monodesmosidic saponins from *Herniaria hirsuta*. Pharmazie ,2000, 4 ,p 690 .
- A. Patil, A. Subhash Kale , H. Madhukar . Screening the *In vitro* Calcium Oxalate Crystal Inhibition Potential of *Abutilon indicum* L a Common Weed Plant from the Indian Medicine System. Austin J Biotechnol Bioeng ,2014 , 1 (6) .
- A. Rad, M. Hajzadeh, Z. Rajaei, M. Hadi, Preventive effect of *Cynodon dactylon* against ethylene glycol-induced nephrolithiasis in male rats . Avicenna J. Phytomedicine, 1( 1), 2011, p 14–23.
- A .Rizk., Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia, **52** (2), 1982, p 35-42.
- C.Hennquin , V.Lalanne , M.Daudon, B.Lacour ,T.Drueke . Anew approach to studying inhibitors of calcium oxalate crystal growth . Urol Res , 1993, 121 , P 101-108.
- C. Lartigau-Roussin. Médecine traditionnelle à Mayotte. Bull bat- Hist & Géo Mayotte, 2002, 6, p 1.
- C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr, 2004, 79, p 727-47.
- D. Juyal , G. Bisht, , A. Singh . Antilithiatic Effect of Ethanolic Extract of *Stevia Rebaudiana* Bert, Kinesither Rev , 2010, 523, p 517–523 .
- D. Kone , Enquêtes ethnobotanique de six plantes Maliennes – extraction, identification d'alcaloïdes caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydant. Thèse de Doctorat. Université de Paul Verlaine de Metz et Université de Bamako , 2008, p3.

- E. Trease, W. Evans. Pharmacognosie. Billiaire Tindall, 1987, 13, p 61-62.
- F. Abdelmalek, D. Harrache, A. Addou, S. Taleb, A. Semmoud. Etude par turbidimétrie de la cristallisation oxalocalcique en présence de quelques inhibiteurs. *J. Ethnopharmacol*, 2004, 6, p. 96.
- F. Atmani, S. Khan. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU Int*, 2000, 85(6), p 621-5.
- F. Gianmaria, I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, Gabriele Pinto and Antonino Pollio. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties. A Review *Molecules*, 2011, 16, p 1486-1507.
- F. Grases, M. Ramis, C. Bauzá, J. March. Effect of *Herniaria hirsuta* and *Agropyron repens* on calcium oxalate urolithiasis risk in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 45(3), 1995, p 211-214
- G. Pace, P. Lima, F. Vianello, C. Renata, C. Campos, M. Galhardo. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5, p 1065-1082
- H. Adida, N. Benariba, A. Bechiri, E. Chekroun, R. Djazir. Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pithuranthos scopariu*. *Phytothérapie*, 2015, p 1-6.
- I. Das, S. Gupta, S. Ansari, V. Pandey, S. Ansari. Inhibition and dissolution of calcium oxalate crystal by *Benrbris Vulgaris* -Q and other metabolites. *Journal of Crystal Growth*, 2004, 1267, p 645.
- J. Catherina, V. Staveren, J. Eerden, C. Frank, V. Veggel, S. Harkema, D. Reinhold. Complexation of neutral guests and electrophilic metal cations in synthetic macrocyclic hosts. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110(15), p 4994.
- K. Randerath. Alcaloïdes, amines et autres composés basiques dans la chromatographie sur couches minces. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1971, 2, p 87.
- K. Suresh, P. Deepa, R. Harisaranraj, V. Achudhan. Antimicrobial and Phytochemical Investigation of the Leaves of *Carica papaya* L., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Euphorbia hirta* L., *Melia azedarach* L. and *Psidium guajava* L., *Ethnobotanical Leaflets*, 2008, 12, p 91.

K. Tanzeer. In Vitro and in Vivo Studies on Antilithiatic Properties of *Trachyspermum Ammi* , doctoral thesis . University of Information Technology, Solan. ,2009 , p 56.

L.Saso, G.Valentini,M. Leone,E. Grippa., B.Silvestrini , Development of an in vitro assay for the screening of substances capable of dissolving calcium oxalate crystals. *Urol Int* , 1998,61,p210.

M. Akhanovna, B. Boua , K. Kouadio, B. Yves-Alain. Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2013, 8, p 02 - 12

M. Dahia, L. Siracusa, H. Laouer , G. Ruberto, Constituents of the Polar Extracts from Algerian *Pituranthos scoparius*. *Natural Product Communications* , 2009 , 4 (12) .

M.Debray, H.Jacquemin, R. Razafindrambo, Travaux et documents de l'Orstom , Paris, 8, 1971, p 150 .

M.Dopico-García, P.Valentão,L. Guerra., P.Andrade , R.Seabra . Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white Vinho Verde grapes . *Analytica Chimica Acta* , 2007, 583, p 15-22.

Ministre chargé de la Santé et de la Sécurité Sociale, 31 mai 2006, p2

M. Paris, A. Bouket, R. Paris .les flavonoïdes du *Fagara laurentii* de Wild Isolement d'une flavonoïde identifiée à l'hespéridoside. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 1969,6,p 123 – 131.

N. Arumugam, T. Boobalan, P. Raja Rajeswari ,M. Duraimurugan. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Cynodon dactylon* and *Carica papaya*. *Research in Biotechnology*.2014 ,5(5): p 21-31.

N. Boizot , J. Charpentier. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.Cah. Tech. INRA, 2006, 1, p79-82.

N. Boutaghane, A. Nacer, Z. Kabouche, Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from algerian septentrional sahara. *Phytothérapie*, 2004, 40 (6) , p 606–607

N.Oyewo, E. Bukoye, M. Adewumi, A.Sanmi . Immunomodulation Capabilities of Aqueous Leaf Extract of *Phyllanthus amarus* in male Wistar Rats . Report and Opinion, 2012, 4 (1) , p 22-37.

Organisation mondiale de la santé (OMS) Aide-mémoire n° 134, révisé mai 2003

P. Anrinozi , C. Brown , D. Punch .Calcium oxalate monohydrate crystallisation : citrate inhibition of nucleation and growth steps , Journal of cryqtal Grouwth ,1992, 125, P 215

P..Patel , N.Nayak , H.Patel, M. Patel , M. Seralai, T. Gandhi. Inhibition of calcium oxalate crystallization by the fruit extracts of *Solanum Xanthocarpum* Schrad , wendl and *Pedaliium murex* Linn. International journal of pharmaceutical Reserch , 2010 , 2( 4 ), P 46 - 52 .

P.Rieu.Lithiases d'infection .Annales d'urologie , 2005, 39, p 16

P. Soundararajan , R.Mahesh , T.Rmesh , V.Begum. Effect of *Arva lanata* on calcium oxalate urolithiasis in rats. Indian Journal of Experimental Biology , 2006, 44,p981-986

R. Gayonj ,E. Peyanud, P.Sudraud .composés phénoliques IN "Traité d'œnologie science et techniques du vin". Ed.Dunod ISBN , 1982 , 2, P 477.

S.Doddola , H.Pasuplati , B.Konganti;K.V.S.R.G.parasad.Evaluation of *Sesbania grandiflora* for antiurolithiasic and antioxidant propertis . JNat Med ,2008, 44 , p300

S. Tayal, S. Duggal, P. Bandyopadhyay, A. Aggarwal, S. Tandon, C. Tandon. Cytoprotective role of the aqueous extract of *Terminalia chebula* on renal epithelial cells. Int Braz J Urol, 2012, 38, 204-14.

V. Rao. Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health (Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties). InTech , 2012 , 2.

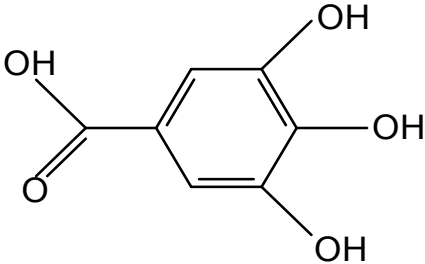
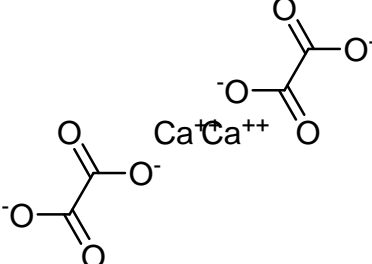
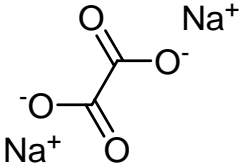
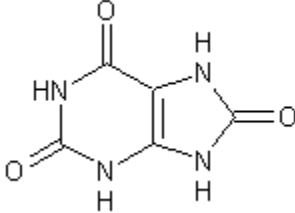
S. Vamsi, M. Raviteja , G. Siva .*In-vitro* antiurolithiatic potential of various extracts of *Mucuna pruriens*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2014 , 5(9): p 3897-3902.

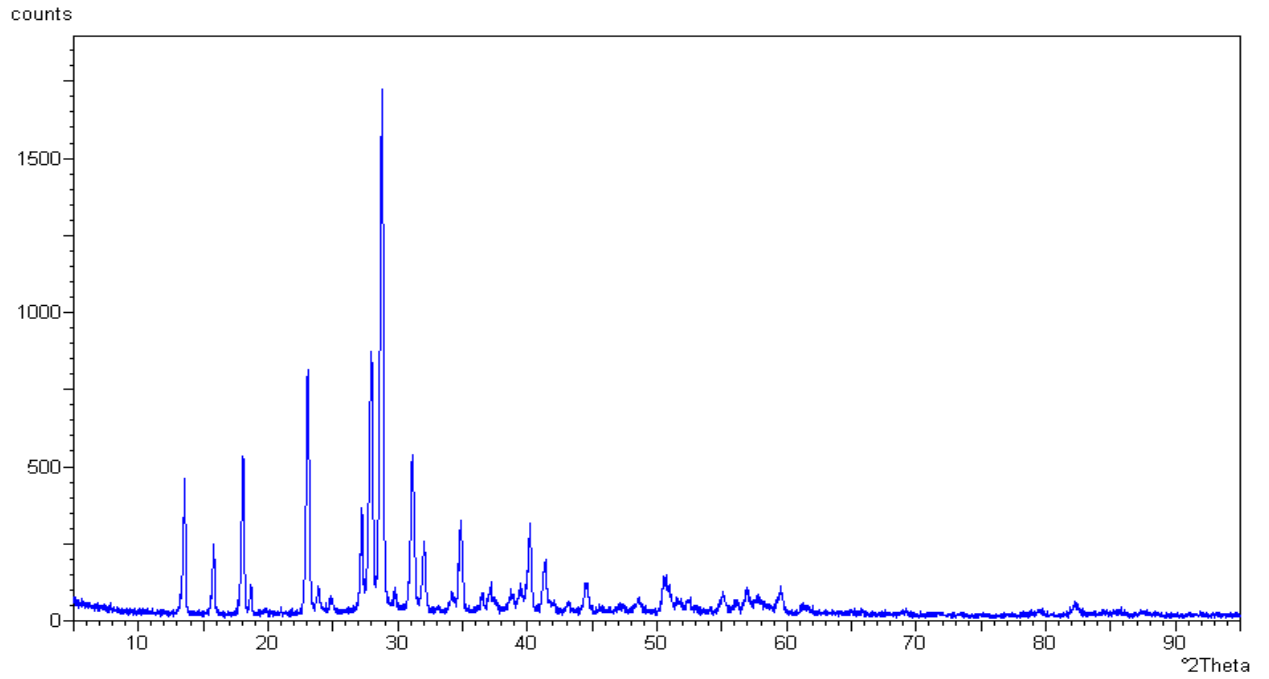
W. Aboshora, Z. Lianfu, M. Dahir, M. Qingran, S. Qingrui, L. Jing, N. Qaid ,M .Al-Haj and A.Farga Ammar. Effect of Extraction Method and Solvent Power on Polyphenol and Flavonoid Levels in *Hyphaene Thebaica* L Mart (*Arecaceae*) (Doum) Fruit and it's Antioxidant and Antibacterial Activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* , 2014, 13 (12),p 2057-2063.

Z. Mohammedi , F. Atik . Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst . *International Journal of Pharma and Bio-Sciences*, 2011 ,1 ( 2) , p 209 .

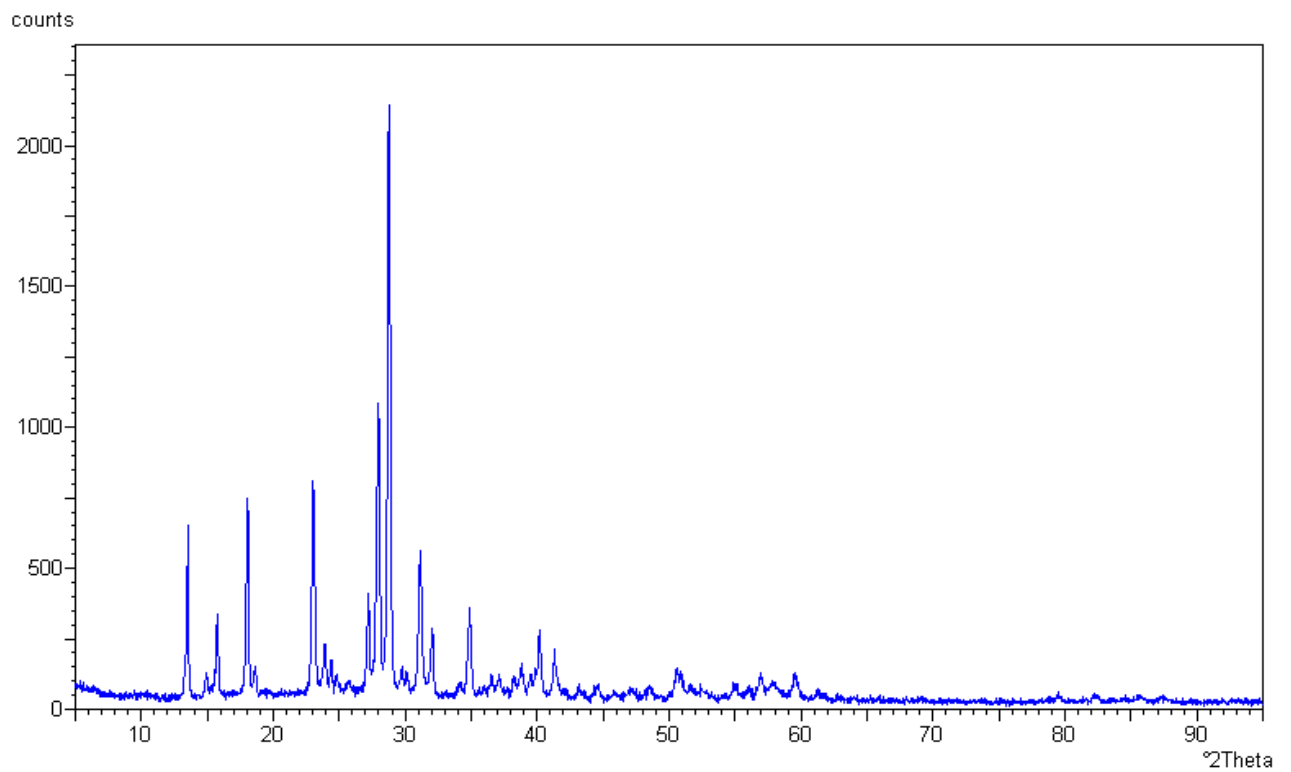
Z. Wissam, B. Ghada, A. Wassim, K. Warid . Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel . *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , 2010, 3, p 675-682.

## VI. Annexe

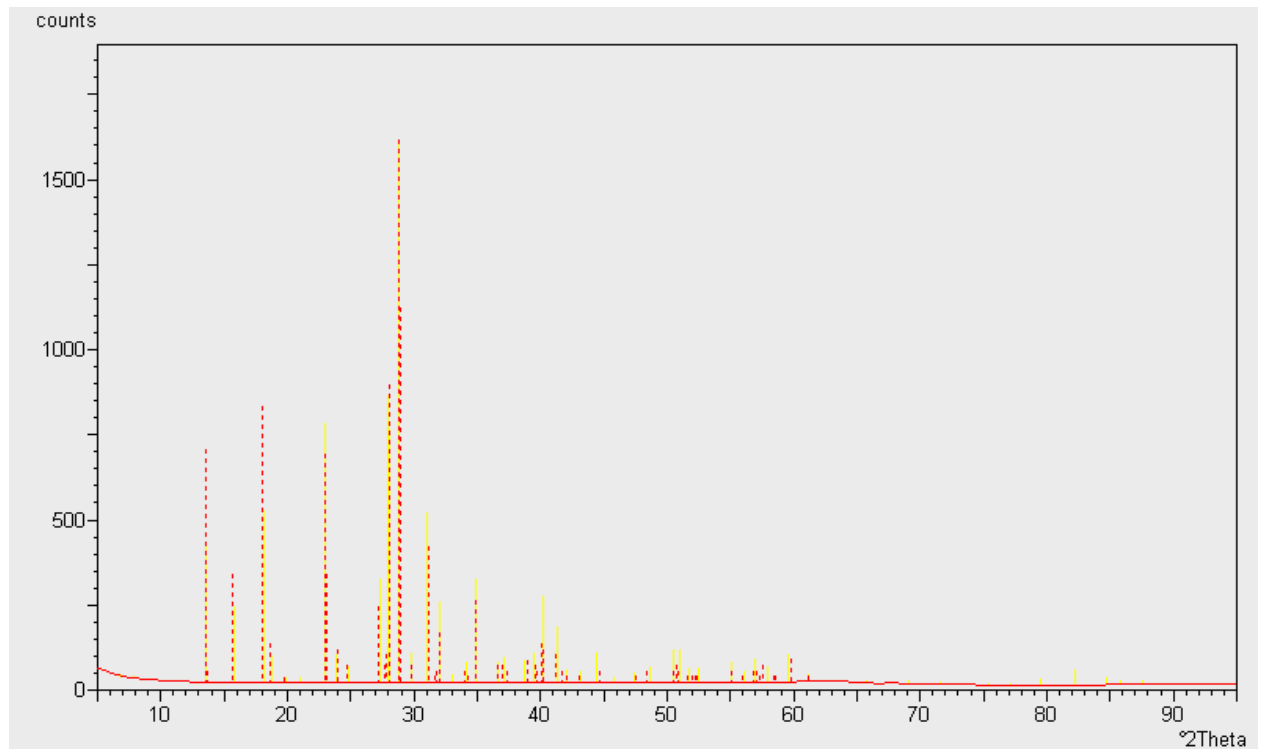
 <p style="text-align: center;"><b>Acide gallique</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Oxalate de calcium</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Oxalate de sodium</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Acide urique</b></p>



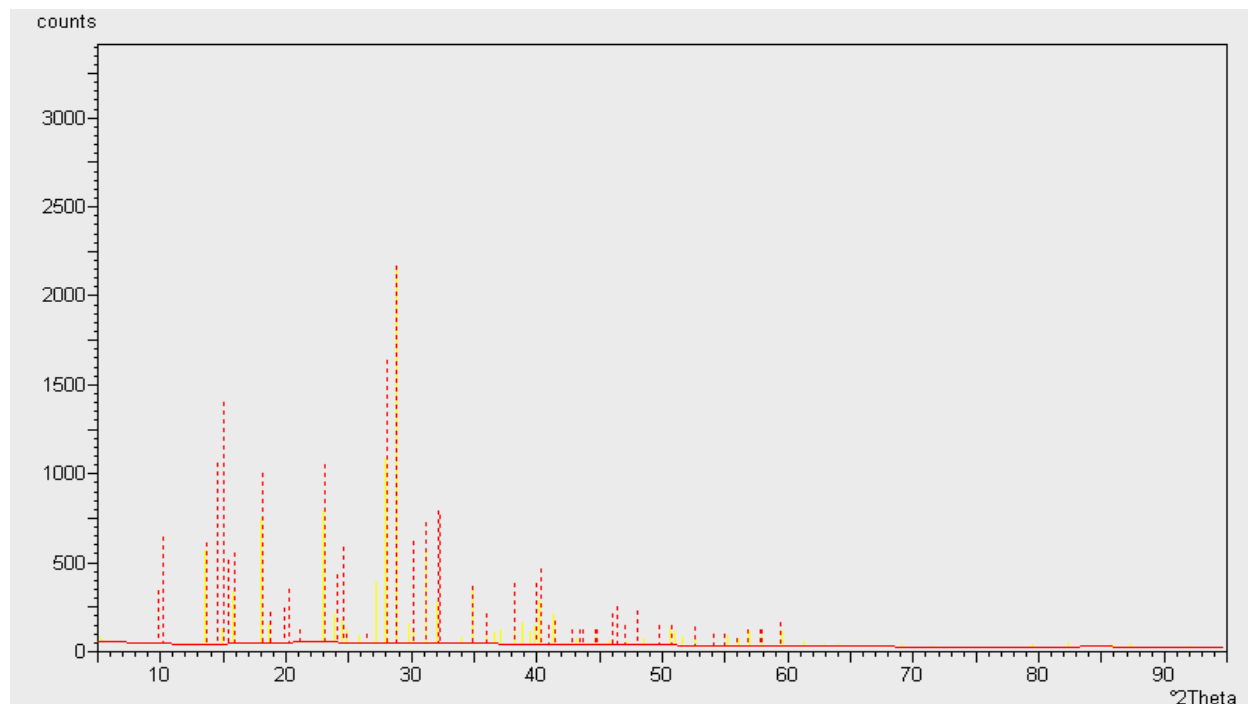
**Figure 18: Spectre de diffraction des rayons X du calcul 1**



**Figure 19: Spectre de diffraction des rayons X du calcul 2**



**Figure 20: Diffractogramme de l'analyse qualitative du calcul 1**  
(Courbe rouge : acide urique, Courbe jaune : calcul recherché)



**Figure 21: Diffractogramme de l'analyse qualitative du calcul 2**  
(Courbe rouge : urate e calcium ; Courbe jaune : calcul recherché)

<b>ERRATA</b>		
<b>Localisation</b>	<b>Remplacer ...</b>	<b>Par ...</b>
Page de Résumé	De 0,867 à 38,835 mg/g	De 0,867 à 5,160 mg/g
Page 8	Un pH de 7,4	Un pH de 6,8
Page 8	le temps d'induction $T_i$ qui correspond au temps écoulé entre l'addition de l'oxalate de sodium et le moment où la croissance.	Le temps réactionnel correspond à la croissance d'oxalate de calcium
Page 10	Les fractions méthanoliques et dichloraméthanolique .	Les fractions: méthanoliques , acétoniques , hydrométhanoliques , hydroactoniques , aqueux .
Page 10	(acétate d'éthyle / méthanol/eau)(8/1/1)	(Éther diéthylique / acétate d'éthyle 7 / 3 v / v)