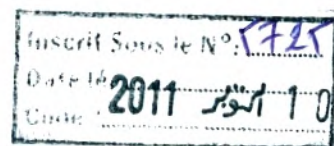


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE /  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE PRODUITS NATURELS  
MEMOIRE DE MAGISTER



Intitulé

**Etude phytochimique et pouvoir antimicrobien de  
*Mesembryanthemum crystallinum. L* (Ficoïde glaciale)**

*Présenté par : Mme REBIAHI née RAHMOUN Malika*

Membres du jury :

Président : Mr CHABANE SARI. D  
Examineurs : Mr LAZOUNI. H.A  
Mr ABDELOUAHED D.E  
Promoteur : Mme BELARBI M.

Professeur Université de Tlemcen  
MCA Université de Tlemcen  
Professeur Université de Tlemcen  
Professeur Université de Tlemcen

2010-2011

## DEDICACES

*J'exprime mon profond respect et ma gratitude à mes parents Brahim et Fadila, pour leurs sacrifices et leur amour.*

*A mes beau parents, surtout ma belle-mère que je ne remercierai jamais assez.*

*A ma tante Zakia, si chère à mon cœur, merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*A mon cher mari Sid Ahmed, pour sa patience et sa présence, je te dois toute ma vie.*

*A mes filles chéries Hiba, Anfel et Aya, que dieu les garde et les protège.*

*A ma sœur Amina, son mari Mustapha et ses enfants Wissem, Nazih et Malak.*

*A mon frère Amine, son épouse Selma et ses enfants Nouha et Monsif.*

*A mon frère Ali, à qui je souhaite beaucoup de réussite dans la vie.*

*A mon beau-frère Mustapha, son épouse Souad et ses enfant Meriem et Hachimi*

*A mes belles sœurs Fatima et Lila, leur mari et leurs enfants.*

*A mes cousines Bahia, Hafida, Amel et Karima.*

*A mes tantes et oncles paternels et maternels.*

*A toutes mes amies : Meriem, Ikram, Nabila, Khadija, Amina, Nassima, Hind, ...*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame BELARBI Meriem, Professeur à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail ; je la remercie pour sa disponibilité, ses qualités humaines et ses précieux conseils.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur REBIAHI Sid Ahmed, chargé de cours à la faculté de Tlemcen pour avoir dirigé la partie microbiologique, pour son aide et ses prodigieux conseils.

Je tiens à exprimer mes respects à Monsieur CHABANE SARI, Professeur à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie vivement Monsieur LAZOUNI, Maître de conférences à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie également Monsieur ABDELOUAHED, Professeur à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, d'avoir l'amabilité de juger ce travail.

J'exprime aussi mes sincères gratitude à Melle ABI AYAD Meriem et à Melle ABI AYAD Fatima Zohra, pour leurs qualités et leur gentillesse.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, je cite : Nassima, Zoubida, Abdelhafid, Souad, et Naila.

## Liste des abréviations

**ATCC** : American type of culture collection

**BHIB** : Brain Heart infusion Broth (bouillon cœur cerveau)

**CAM** : Crassulacean acid metabolism

**CAT** : Catalase

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**DO** : densité optique

**EBC** : epidermal bladder cells

**g** : gramme

**% MS** : pourcentage de matière sèche

**ml** : millilitre

**MH** : Muller Hinton

**µg** : microgramme

**mn** : minute

**nm** : nanomètre

**M** : molaire

**N** : normalité

**mg GAE/g DW** : milligramme d'acide gallique par gramme de poids sec.

**mg CE /g DW** : milligramme de catéchine par gramme de poids sec.

# Résumés

## Résumé

Les plantes constituent une source inépuisable de molécules chimiques dotées d'activités antimicrobiennes. L'étude de l'espèce *Mesembryanthemum crystallinum* appartenant à la famille des *Aizoaceae*, a porté sur un screening phytochimique visant à doser les différents métabolites primaires, et secondaires et sur une évaluation du pouvoir antimicrobien des phénols totaux, des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes.

L'extraction des métabolites primaires et secondaires a été réalisée par les différentes techniques phytochimiques et le dosage des composés phénoliques (Phénols totaux, Flavonoïdes, Tanins et Alcaloïdes), a été effectué par colorimétrie. Le pouvoir antimicrobien a été évalué par la technique de dilution sur microplaque.

Cette étude a révélé une forte teneur en eau estimée à 93.32% due à la succulence de la plante, et une forte quantité appréciable de matière grasse estimée à 11.5%, et de cendres évalués à 41%, contrairement aux sucres et aux protéines qui ont respectivement une faible teneur de 4.95% et de 2.12 %. Le dosage des métabolites secondaires a révélé une teneur en polyphénols de 1.02 mg GAE/ g DW, les flavonoïdes avec 0.19 mg CE/g DW, les tanins avec 0.04 mg CE/g DW, et les alcaloïdes avec 4.2%. L'analyse du pouvoir antimicrobien sur sept espèces bactériennes et une levure (*C. albicans*), a montré une activité remarquable des flavonoïdes, suivi des tanins et des alcaloïdes, les phénols ont exprimé une activité modérée.

**Mots clés :** *Mesembryanthemum crystallinum*, métabolites primaires, métabolites secondaires, activité antimicrobienne.

## Abstract

Plants are an inexhaustible source of chemical molecules featuring antimicrobial activities. The study of the species *Mesembryanthemum crystallinum* belonging to the family of Aizoaceae, focused on a phytochemical screening to assay the various primary and secondary metabolites, and an assessment of the antimicrobial potency of total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids.

The extraction of primary and secondary metabolites was carried out by different phytochemical technics and determination of phenolic compounds (total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids) was performed by colorimetry. The antimicrobial potency was evaluated by the microplate dilution technique.

This study revealed a high water content estimated at 93.32% due to the succulence of the plant, and a significant amount of high fat estimated at 11.5%, and ash valued at 41%, in contrast to sugars and proteins that have respectively a low of 4.95% and 2.12%. The determination of secondary metabolites showed a polyphenol content of 1.02 mg GAE / g DW, flavonoids with 0.19 mg CE / g DW, tannins with 0.04 mg CE / g DW, and alkaloids with 4.2%. Analysis of the antimicrobial potency of seven species of bacteria and yeast (*C. albicans*), showed a remarkable activity of flavonoids, tannins and monitoring of alkaloids, phenols expressed moderate activity.

**Keywords:** *Mesembryanthemum crystallinum*, primary metabolites, secondary metabolites, antimicrobial activity.

## الخلاصة

النباتات هي مصدر لا ينضب من الجزيئات الكيميائية التي يضم الأنشطة المضادة للميكروبات. دراسة النوع (*Mesembryanthemum crystallinum*) الذي ينتمي الى أسرة الأيزوآسي تركزت على الفحص الكيميائي النباتي لمختلف الأيضات الابتدائية، والثانوية، وإجراء تقييم لفاعلية المضادات للميكروبات من مجموع الفينول، مركبات الفلافونويد والعفص وقلويدات.

وجرى استخراج الأيضات الابتدائية والثانوية بواسطة التقنيات الفيتوكيميائية المختلفة وتصميم المركبات الفينولية (الفينولات الكلية، الفلافونويد والعفص وقلويدات) كان يؤديها قياس الألوان. تم تقييم فاعلية مضادات الميكروبات بفضل تقنية microplate.

وكشفت هذه الدراسة على نسبة ارتفاع المياه تقدر بـ 32, 93% وذلك بسبب انتسابها للنباتات العصارية، وكمية كبيرة من الدهون عالية تقدر بنحو 11.5%، والرماد تبلغ قيمتها 41%، وعلى النقيض من السكريات والبروتينات التي على التوالي على انخفاض 4,95% و12, 2%. وأظهر تقرير من المركبات الثانوية على نسبة 1,02 ملغ من مادة البوليفينول / غرام وزن جاف، فلافونويدس مع 0,19 ملغ / غرام وزن جاف والعفص مع 0,04 ملغ / غرام وزن جاف، وقلويدات مع 4,2%.

وأظهر تحليل لفاعلية مضادات الميكروبات من سبعة أنواع من البكتيريا والخميرة نشاطا ملحوظا من العفص و الفلافونويد و القلويدات وأعربت الفينولات على النشاط المعتدل

**الكلمات المفتاحية:** الأيضات الابتدائية، الأيضات الثانوية، *Mesembryanthemum crystallinum*

فاعلية مضادات الميكروبات



# Table des matières

**Remerciements**

**Abréviations utilisées**

**Résumés**

**Table des matières**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**

**Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>I. Généralités.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Caractères botaniques : .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Position systématique : .....</b>	<b>2</b>
<b>I.2.1 Les différentes appellations de l'espèce.....</b>	<b>2</b>
<b>I.3 Habitat et répartition géographique :.....</b>	<b>2</b>
<b>I.3.1 Habitat :.....</b>	<b>2</b>
<b>I.3.2 Répartition géographique : .....</b>	<b>3</b>
<b>I.4 Croissance et développement :.....</b>	<b>4</b>
<b>I.4.1 Les cellules de la vessie épidermique :.....</b>	<b>5</b>
<b>I.5 Importance économique : .....</b>	<b>5</b>
<b>I.6 Physiologie .....</b>	<b>6</b>
<b>I.7 Composition chimique de la plante étudiée : .....</b>	<b>7</b>
<b>I.8 Usages médicaux :.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Biochimie du monde végétal :.....</b>	<b>10</b>
<b>II.1 Les métabolites primaires :.....</b>	<b>10</b>
<b>II.1.1 Définition :.....</b>	<b>10</b>
<b>II.1.2 Rôle.....</b>	<b>10</b>
<b>II.2 Les métabolites secondaires :.....</b>	<b>11</b>
<b>II.2.1 Définition : .....</b>	<b>11</b>
<b>II.2.2 Les composés phénoliques : .....</b>	<b>11</b>

II.2.3	Classification des composés phénolique :.....	13
II.2.3.1	Les flavonoïdes : .....	13
II.2.3.2	Les non flavonoïdes : .....	15
II.2.3.2.1	les acides phénoliques :.....	15
II.2.3.2.2	les hydroxycinnammates.....	17
II.2.3.3	Les Stilbènes:.....	18
II.2.3.4	Les bétalaïnes :.....	18
II.2.4	Les composés azotés :.....	19
II.2.4.1	Les alcaloïdes :.....	19
III.	Activité biologique des métabolites secondaires :.....	23
III.1	Le pouvoir antioxydant :.....	23
III.1.1	L'oxydation :.....	23
III.1.2	Les radicaux libres :.....	23
III.1.3	Les antioxydants :.....	23
III.2	Le pouvoir antimicrobien : .....	25

## Chapitre II Matériel et méthodes :

I.	Matériel biologique :.....	28
II.	Détermination du taux d'humidité :.....	28
III.	Détermination quantitative des métabolites primaires :.....	29
III.1	Dosage des lipides totaux :.....	29
III.2	Dosage des protéines :.....	30
III.3	Dosage des sucres totaux :.....	33
III.4	Dosage des cendres :.....	35
IV.	Détermination quantitative des métabolites secondaires :.....	36
IV.1	Préparation de l'extrait de plante :.....	36
IV.2	Dosage des polyphénols totaux :.....	36
IV.3	Dosage des flavonoïdes totaux :.....	37
IV.4	Dosage des tannins condensés:.....	38
IV.5	Extraction sélective des alcaloïdes :.....	39
V.	Etude de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>M. crystallinum</i> :.....	40
V.1	Provenance des souches microbiennes :.....	40
V.2	Purification et /ou identification des germes étudiés:.....	41
V.3	Le système API :.....	45
V.4.	Détermination de la CMI sur microplaque :.....	48

## Chapitre III : Interprétations et Discussion

I. Etude phytochimique :.....	50
I.1 Taux d'humidité :.....	50
I.2 Détermination quantitative des métabolites primaires :.....	51
I.2.1 Teneur en matière grasse :.....	51
I.2.2 Teneur en protéines brutes :.....	52
I.2.3 Teneur en sucres totaux :.....	53
I.3 Teneur en cendres (matière minérale):.....	55
I.4 Détermination de la quantité de métabolites secondaires :.....	57
I.4.1 Dosage des phénols totaux :.....	57
I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux :.....	58
I.4.3 Dosage des tanins condensés :.....	59
I.4.4 Dosage des alcaloïdes :.....	59
I.5 Extractions sélectives :.....	59
II. Activité antimicrobienne :.....	61
II.1 Identification des bactéries :.....	61
II.2 Identification de <i>Candida albicans</i> :.....	66
II.3 Concentrations minimales inhibitrices sur microplaque :.....	67
III. Interprétation et Discussion :.....	68
III.1 Les phénols totaux :.....	68
III.2 Les flavonoïdes :.....	69
III.3 Les tanins :.....	70
III.4 Les alcaloïdes :.....	71
Conclusion.....	77

### Références bibliographiques

### Annexes

## Liste des figures

Figure 1: <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (fontesarda.it).....	1
Figure 2 : Fleur de <i>M. crystallinum</i> (fontesarda.it).....	1
Figure 3 : Répartition géographique de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> .....	3
Figure 4 : Les cellules épidermiques de la vessie le long des tiges de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> .....	5
Figure 5 : Pointe de la feuille de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> . Les cellules de la vessie épidermiques son modifiées.....	5
Figure 6 : Les cellules de la vessie épidermique dans les capsules de graines peuvent avoir un à deux mm de diamètre.....	5
Figure 7 : Structure de base des Flavonoïdes.....	13
Figure 8: Structure générale des principaux flavonoïdes.....	14
Figure 9 : structure générale des tannins hydrolysables.....	16
Figure 10: structure chimique des différents dérivés de l'acide caféique.....	17
Figure 11 : Structure générale des Stilbènes.....	18
Figure 12 : structure chimique de la scopolamine.....	20
Figure 13 : Structure chimique de la cocaïne.....	20
Figure 14 : structure chimique de la nicotine.....	21
Figure 15: Structure chimique de la vinblastine.....	21
Figure 16 : structure chimique de la caféine.....	22
Figure 17 : Unité de digestion BUCHI-K-435.....	31
Figure 18 : Unité de distillation BUCHI-K- 314.....	32
Figure 19 : détermination de la CMI sur microplaque.....	49
Figure 20 : Teneurs en matières grasses (%) des espèces de <i>Mesembryanthemum</i> .....	51
Figure 21 : Teneurs en protéines (en %) des espèces de <i>Mesembryanthemum</i> .....	53
Figure 22 : Teneurs en sucres totaux pour les espèces de <i>Mesembryanthemum</i> .....	54
Figure 23 : Teneurs en phénols totaux de différentes espèces halophytes.....	57
Figure 24: Teneurs en flavonoïdes totaux de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> .....	58
Figure 25 : Pourcentage de rendements des différents extraits de <i>M. crystallinum</i> .....	60

<b>Figure 26 : Résultats de la CMI des phénols totaux.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 27 : Résultats de la CMI des Flavonoïdes.....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 28 : Résultats de la CMI des tanins.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 29 : Résultats de la CMI des alcaloïdes.....</b>	<b>76</b>

## Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les étapes de croissance de <i>M. crystallinum</i> .....	4
Tableau 2 : Composition en acides gras de <i>M. crystallinum</i> .....	7
Tableau 3 : Structure des composés polyphénoliques.....	12
Tableau 4 : Souches de référence et leur code ATCC .....	40
Tableau 5 : Différents systèmes API utilisés dans l'identification.....	46
Tableau 6 : Taux d'humidité de <i>M. crystallinum</i> .....	50
Tableau 7: Concentration en sucres et en sucres alcool dans la plante de <i>M. crystallinum</i> en présence et en absence de 400 mM de NaCl .....	55
Tableau 8 : teneurs en minéraux dans les pousses de <i>M. crystallinum</i> .....	55
Tableau 9 : contenu en ions dans les cellules de la vessie épidermique chez <i>M.</i> <i>crystallinum</i> stressée par le sel.....	56
Tableau 10 : Résultats de tests classiques réalisés pour l'identification d' <i>E. coli</i> .....	61
Tableau 11: Résultats de l'identification d' <i>E.coli</i> par la plaque API 20 E.....	62
Tableau 12 : Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification de <i>P. aeruginosa</i> .....	62
Tableau 13 : Résultats de l'identification de <i>P. aeruginosa</i> par la plaque API NE.....	63
Tableau 14: Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification de <i>S. aureus</i> ....	63
Tableau 15: Résultats de l'identification de <i>S. aureus</i> par la plaque API Staph .....	64
Tableau 16 : Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification des <i>Bacillus</i> .....	64
Tableau 17 : Résultats de l'identification des <i>Bacillus</i> par la plaque API 20 E.....	65
Tableau 18 : Résultats des tests réalisés pour l'identification d' <i>Enterococcus faecalis</i> ..	65
Tableau 19 : Résultats de l'identification d' <i>Enterococcus faecalis</i> par la plaque API Strep.....	66
Tableau 20 : Résultats de l'identification de <i>C. albicans</i> par la plaque API candida.....	67
Tableau 21 : Résultats des CMI des phénols totaux.....	73

<b>Tableau 22 : Résultats des CMI des flavonoïdes.....</b>	<b>74</b>
<b>Tableau 23 : Résultats des CMI des tanins.....</b>	<b>75</b>
<b>Tableau 24 : Résultats des CMI des alcaloïdes.....</b>	<b>76</b>

# **Introduction**



## INTRODUCTION :

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules une source immense de molécules chimiques complexes utilisées dans les fragrances, l'agroalimentaire, et l'industrie pharmaceutique.

Dans beaucoup de cas, la production par voie de synthèse chimique de ces molécules n'est pas possible ou économiquement non rentable. Les biotechnologies connaissent un essor formidable depuis une vingtaine d'années, et leur développement semble prometteur pour la production de molécules complexes ou pour la découverte de nouveaux principes actifs. Ces techniques utilisent la machinerie cellulaire performante de microorganismes pour synthétiser des produits chimiques. Si la culture en bioréacteurs de levures et de bactéries a prouvé son efficacité pour de nombreux procédés industriels, l'utilisation de cellules de plantes à l'échelle industrielle reste très marginale.

Les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et leur gravité. La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition de souches de microorganismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements par des médicaments existants.

Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle.

En effet, l'OMS (2002) estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales dotées d'une grande importance pour la santé de ces populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour une meilleure utilisation.

A travers les siècles, l'homme se livra au redoutable apprentissage des propriétés médicinales des végétaux, pareille entreprise lui coûta parfois la vie ou plus heureusement, la lui sauva. Il a donc eu recours à des remèdes d'origine végétale et toutes les grandes civilisations en ont fait usage. Selon les pays, sorciers, guérisseurs, curandiers, tradipraticiens, herboristes et, plus récemment, biochimistes végétaux savent tirer parti des " principes " actifs synthétisés par les plantes.

Nombre de médicaments " modernes " doivent leurs vertus à des extraits végétaux. Sans minimiser le moins du monde le rôle considérable joué par les médicaments sortis des creusets des chimistes, il faut donc considérer avec attention les multiples espèces de la flore qui permettent encore de se soigner (**Bernard., 2001**).

Afin de mieux connaître les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques endémiques de notre pays, nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante « *Mesembryanthemum crystallinum* » (Frach'nda) ou ficoïde glaciale, et ce, pour diverses raisons :

- L'utilisation par la population locale (celle du littoral en particulier) de cette espèce comme remède ;
- Sa large abondance surtout à Béni-saf.
- Sur le plan biochimique, cette plante n'est pas très étudiée, donc nous avons essayé de faire le premier pas en recherchant les métabolites primaires et secondaires de cette plante.

Notre objectif est d'analyser les différents extraits de *Mesembryanthemum crystallinum* et d'évaluer leurs propriétés antimicrobiennes afin de contribuer à trouver des solutions aux problèmes actuels de résistance.

Ainsi ce travail a été divisé en trois parties :

- ✓ La première consiste en une synthèse bibliographique, description botanique de la plante en question et une vue générale sur les métabolites primaires et secondaires.
- ✓ La seconde partie comprend une étude phytochimique visant un dosage des métabolites primaires et une estimation du rendement ainsi qu'une extraction des métabolites secondaires
- ✓ Dans la dernière partie de ce travail, nous avons essayé d'étudier le pouvoir antimicrobien des différents extraits : les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tannins et les alcaloïdes contre sept espèces bactériennes et une levure.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

## I. Généralités :

### I.1. Caractères botaniques :

Plante annuelle, prostrée, assez discrète, ne dépassant pas 20 à 40 cm, glabre, couverte dans toutes ses parties de tubercules cristallins, lui conférant un aspect brillant d'où son nom « ice-plant » ou « ficoïde glaciale » (Laboratoires Bonhert, 2003); ses tiges sont couchées, ascendantes, rameuses et dichotomes.

Ses feuilles sont épaisses, planes, atténuées en large pétiole ou sessiles, et mesurant 2 à 12 cm de longueur (figure 1).

La plante fleurit du printemps jusqu'au début de l'été (Cunningham et al., 1981).

Les fleurs subsessiles de 1,5 cm de diamètre, blanches par leurs nombreux pétales linéaires, sont à l'origine d'un fruit à 5 angles, ombiliqué à son sommet (figure2) (Bernard., 2001). Elles s'ouvrent le matin et ferment à la nuit (Smith., 1998), et sont pollinisées par les insectes (Western Australian Herbarium., 1998).



Figure 1: *Mesembryanthemum crystallinum* (fontesarda.it)



Figure 2 : Fleur de *M. crystallinum* (fontesarda.it)

## 1.2 Position systématique : (Quezel, 1986)

<b>Règne :</b>	<b>Plantae</b>
<b>Embranchement :</b>	<b>Spermaphytes</b>
<b>Sous embranchement :</b>	<b>Angiospermes</b>
<b>Classe :</b>	<b>Dicotylédones</b>
<b>Ordre :</b>	<b>Centrospermae</b>
<b>Famille :</b>	<b>Aizoaceae</b>
<b>Genre :</b>	<b>Mesembryanthemum</b>
<b>Genre Espèce :</b>	<b><i>Mesembryanthemum crystallinum</i></b>

### I.2.1 Les différentes appellations de l'espèce :

- Ficoïde glaciale ou ficoïde cristalline, usine à glace ou mésembryanthème à cristaux (Français).
- Crystalline ice plant (Anglais)
- Eiskraut (Allemand)
- Frach n'da (nom vernaculaire arabe)
- *Mesembryanthemum crystallinum* (Latin), (Weber., 2003).

## 1.3 Habitat et répartition géographique :

### 1.3.1 Habitat :

*Mesembryanthemum crystallinum* se trouve sur une large gamme de types de sols, des sols bien drainés, sableux (y compris les dunes de sable), de limons et d'argiles. Elle préfère les sols acides, neutres ou alcalins, mais peut tolérer les sols pauvres en éléments nutritifs ou une solution saline (plant for a futur, 1997-2003). elle se produit dans une gamme de communautés végétales, y compris les marais salants, les forêts d'eucalyptus, et les zones arbustives (Cunningham et al., 1981; Venning., 1984).

## I. 3.2 Répartition géographique : (Figure 3)

- **Afrique :**

Afrique de nord : **Algérie, Maroc, Libye, Tunisie.**

Afrique australe : **Namibie, Afrique du sud** (Province du cap).

- **Asie :**

Asie occidentale : **Egypte** (Sinaï), **Israël.**

- **Europe :**

Europe du sud : **Ex-Yougoslavie, Italie.**

Sud ouest de l'Europe : **France** (corse), **Espagne** (îles Baléares).

- **Océanie :**

Australie: l'**Australie**

- **Amérique du Nord** : États-Unis

- **Amérique du Sud** : Amérique du Sud



**Figure 3 : Répartition géographique de *Mesembryanthemum crystallinum* (Vivrette et Muller., 1977).**

## 1.4 Croissance et développement :

La plante présente cinq phases de développement typiques à toutes les plantes, mais avec quelques particularités (Adams et al, 1998) :

**Tableau 1 : Les étapes de croissance de *M. crystallinum* (Adams et al, 1998)**

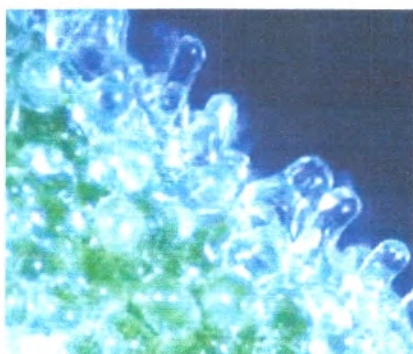
Phases	Caractéristiques
<b>Germination</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Présence de cotylédons seulement</li><li>- Le mode CAM n'est pas inductible</li><li>- La biosynthèse de solutés compatibles est induite par la sécheresse et non par la salinité.</li></ul>
<b>Plante jeune</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sept paires de feuilles se développent le long de l'axe primaire.</li><li>- Pas de pousses latérales, pas de fleurs.</li><li>- La photosynthèse en C3, le mode CAM n'est pas induit par le stress.</li><li>- Induction de la biosynthèse des solutés compatibles</li></ul>
<b>Plante adulte</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Pousses latérales avec des feuilles secondaires.</li><li>- Pas de fleurs.</li><li>- Sénescence des feuilles Primaires.</li><li>- CAM devient progressivement inductible.</li></ul>
<b>Floraison</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fleurs à l'extrémité de l'axe primaire, et dans les essieux des feuilles secondaires.</li><li>- Les cellules de la vessie épidermique deviennent évidentes.</li><li>- CAM est toujours induite.</li></ul>
<b>Formation de graines</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Les capsules de semences sont la seule partie viable de la plante. Aucune absorption d'eau.</li><li>- Les cellules de la vessie épidermiques sont de premier plan.</li></ul>

CAM : Crassulacean Acid Metabolism.

## I. 4.1 Les cellules de la vessie épidermique :

Les surfaces aériennes de *Mesembryanthemum crystallinum*, ou plante à glace, sont couvertes de cellules géantes (500  $\mu\text{m}$  de diamètre) appelées : les cellules de la vessie épidermique ou epidermal bladder cells (EBC). Ces cellules sont caractérisées par une grande vacuole centrale remplie de liquide (Adams et al., 1992, 1998) (figures 4, 5, et 6).

Les EBC participent à la régulation de la séquestration du sel et de l'eau et les relations pour servir de réservoir de stockage d'eau et des composés inorganiques et organiques tels que le sodium, le chlorure, les flavonoïdes, et les bétacyanines (Adams et al, 1992; Vogt et al, 1999).



**Figure 4 :**  
Les cellules épidermiques de la vessie le long des tiges de *Mesembryanthemum crystallinum* (Photo: Laboratoires Bohnert, 2002)



**Figure 5 :**  
pointe de la feuille de *Mesembryanthemum crystallinum*. Les cellules de la vessie épidermiques sont modifiées. (Photo: Laboratoires Bohnert, 2002)



**Figure 6 :** les cellules de la vessie épidermique dans les capsules de graines peuvent avoir un à deux mm de diamètre. (Photo: Laboratoires Bohnert, 2002)

## I.5 Importance économique :

*Mesembryanthemum crystallinum* est surtout utilisée en phytothérapie traditionnelle.

Cette espèce a été utilisée comme un légume dans certains pays européens, mais n'a jamais été utilisée au Japon. Un système de culture stable a été récemment mis en place pour cette plante à glace afin de répondre à la demande en tant que produit commercial, et pour la vendre comme un légume sous la marque déposée : «feuille de cristal» ou "Barafu" (Agarie et al., 2009).



Dans le domaine de cosmétologie, elle entre dans une composition cosmétique administrée sous forme topique, en particulier pour lutter contre le vieillissement cutané et pour protéger la peau contre les radiations ; les feuilles sont aussi utilisées dans la préparation des savons (Bouftira et al, 2008).

*Mesembryanthemum crystallinum* est également utilisée comme un modèle dans la recherche physiologique des plantes (Bohnert et Cushman., 2000), et est cultivé comme plante ornementale de jardin (Jessop., 1986). En raison de son accumulation de sel, *M. crystallinum* peut être utile pour la remédiation biologique des sols salins (Laboratoires Bohnert., 2003).

### 1.6 Physiologie :

*Mesembryanthemum crystallinum* dispose d'un commutateur stade de développement programmé de photosynthèse  $C_3$  : c'est le métabolisme acide des Crassulacées ou **Crassulacean Acid Metabolism (CAM)**, qui est accéléré par la salinité et la sécheresse (Adams et al., 1998).

Le semis à froid de plantes jeunes et modérément tolérantes au sel affichent des taux relativement élevés de la croissance végétative en se livrant à la photosynthèse  $C_3$  aussi longtemps que l'humidité du sol reste suffisante (Bohnert et Cushman., 2000).

Avec l'arrivée progressive de la sécheresse, l'usine passe à CAM, ce qui minimise la perte d'eau et assure le succès de reproduction en l'absence de pluie et dans des sols salins. CAM prolonge la période de gain net de carbone, résultant de la production de semences améliorées (Bohnert et Cushman., 2000). La plante meurt à partir de la racine, transférant progressivement les ressources vers la capsule de graines (Adams et al., 1998).

L'espèce *Mesembryanthemum crystallinum* accumule le sel tout au long de sa vie, dans un dégradé à partir des racines vers les pousses, avec la plus forte concentration stockées dans les cellules de la vessie épidermique (Adams et al. 1998).

Le sel est libéré par lessivage une fois la plante meurt. Il en résulte un environnement néfaste osmotique empêchant la croissance des autres espèces non tolérantes (Vivrette et Muller, 1977) tout en permettant aux graines de *M. crystallinum* de germer (Bohnert et Cushman., 2000).

La croissance des racines est retardée en vertu de la salinité qui indique que l'absorption d'eau par le système racinaire n'est pas essentielle pour la survie des plantes à des stades avancés de développement en vertu de la forte salinité (Kholodova et al., 2002).

## 1.7 Composition chimique :

Non cyanogène, cette espèce présente souvent des alcaloïdes, des cyanidines, des Flavonols dont le kaempférol, et/ou kaempférol et quercétine. L'acide ellagique est absent, avec tout de même présence de bétalaïnes. (Watson et Dallwitz., 1992).

L'analyse du liquide contenu dans les cellules épidermiques de *M. crystallinum* a révélé un composé flavonoïde majeur appelé Mésembryanthine (Vogt et al, 1999).

La plante renferme une quantité importante de lipides totaux estimée à 4.3 % de poids sec (Nouairi et, 2006) et la composition en acides gras a été déterminée dans les feuilles (Tableau 2), l'acide gras le plus abondant est l'acide linoléique  $\omega 6$  (C18:3) avec un pourcentage de 58.4 %.

**Tableau 2 : Composition en acides gras de *M. crystallinum*** (Nouairi et, 2006)

Acide gras	C16 : 0	C16 :1 cis	C16 :1 trans	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
Pourcentage (%)	18.1	1.3	1.0	1.9	10.6	12.3	58.4

La plante produit généralement en réponse à un stress osmotique provoqué par la sécheresse ou par la salinité, des solutés compatibles tels que les sucres, les acides aminés, les polyols (myo-inositol, pinitol et ononitol), les bétaines, la proline, et des ectoïnes dans les compartiments cytoplasmiques (Bohnert et shen, 1999).

En plus de l'accumulation de polyols, l'usine à glace a des traits intéressants comme un aliment fonctionnel ; Premièrement, sous des conditions induisant une accumulation de pinitol / ononitol, cette espèce change de mode de photosynthèse C3 vers le mode CAM. Dans les feuilles de la plante à mode CAM, le malate et le citrate s'accumulent (Herppich et al, 1995.), ces deux composés sont des métabolites clé dans le cycle de Krebs et sont impliqués dans la production d'énergie dans les mitochondries.

De plus, Le Citrate a une fonction pour réduire la formation de calculs rénaux (Pak, 1987; Levine et al, 1994), et le malate est un moyen efficace chélateur de l'aluminium, ce qui réduit l'accumulation de l'aluminium dans divers tissus.

Deuxièmement, l'usine à glace a une forte activité antioxydante, dans les feuilles traitées avec 400 mM NaCl, l'activité a été deux fois plus élevée que celle du groupe témoin (c'est à dire le volume de l'extrait nécessaire pour donner une réduction de 50% de DPPH a été près de la moitié par rapport au contrôle) (Agarie et al., 2009).

Troisièmement, la plante accumule la proline comme soluté compatible en réponse à un stress osmotique (Demmig et Winter, 1986; Sanada et al, 1995). La Proline est un acide aminé non essentiel impliqué dans la production de collagène (Watanabe et al., 1999) et la guérison des plaies, et est également un précurseur de l'hydroxyproline qui sert à maintenir et à guérir le cartilage, et à renforcer les articulations, les tendons et les muscles (Balch et Balch, 2000).

Dans une étude réalisée par Bouftira et al (2007), le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles pourpres de la plante ont démontré la présence d'un composé phénolique reconnu comme un butylhydroxytoluène (BHT), un antioxydant puissant utilisé dans la conservation des aliments. Ce composé phénolique a présenté une activité antioxydant très élevée ( $98 \pm$  inhibitions DPPH 0,5%) par rapport aux BHT synthétiques qui ont montré une activité relativement moins importante ( $90 \pm 0,4\%$  d'inhibition de DPPH).

*M. crystallinum* accumule plus de BHT à l'étape de floraison en comparaison avec le stade plantules. En fait, elle accumule, au stade des semis, d'autres composés antioxydants qui fonctionnent en liaison avec le BHT (Bouftira et al, 2010).

### **I.8 Usages médicaux :**

*Mesembryanthemum crystallinum* a des propriétés diurétiques ; elle est utilisée dans le traitement des inflammations pulmonaires et de l'appareil génito-urinaire. Les feuilles sont utilisées dans le traitement de l'ascite, de dysenterie et de maladies du foie et du rein (Chopra et al .,1986).

De plus, elle est utilisée dans le traitement traditionnel tunisien des infections oculaires, elle a des propriétés antiseptiques (Chaieb et Boukhris., 1998).

La plante est adoucissante et diurétique. Historiquement, les médecins utilisaient le jus des feuilles pour apaiser l'inflammation des muqueuses dans les systèmes respiratoire ou urinaire. En Europe, les jus de fruits frais ont été utilisés pour traiter la rétention d'eau et une miction douloureuse et pour calmer l'inflammation du poumon (Foster et al., 2002).

## II. Biochimie du monde végétal :

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

### II.1 Les métabolites primaires :

#### II.1.1 Définition :

Les métabolites primaires sont des molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaires à la vie de la plante, ce sont les sucres, les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Raven et al., 2003).

Ils jouent aussi un rôle essentiel dans : la photosynthèse, la respiration, la croissance et le développement de la plante (Croteau et al., 2000 ; Dewick., 2002).

#### II.1.2 Rôle :

- ❖ Les métabolites primaires sont souvent employés comme excipients dans la fabrication des formes médicamenteuses : oses édulcorants, polysaccharides (natifs ou modifiés) utilisés pour la préparation de comprimés, huiles nécessaires à l'obtention d'émulsions et autres formes. Ces mêmes métabolites primaires confèrent aussi d'intéressantes propriétés thérapeutiques à certaines plantes :  
amélioration du transit intestinal par la gomme de *Sterculia*, les galactanes sulfatés du thalle de la mousse d'Irlande (*Chondrus*), le mucilage de la graine d'ispaghul ou celui de la graine du lin ;
- ❖ Effet adoucissant des affections dermatologiques de plantes à mucilages telles que la mauve ou la guimauve.
  
- ❖ Amélioration de l'eczéma atopique par l'huile d'onagre (Small et Catling., 2000).

## II. 2 Les métabolites secondaires :

### II.2.1 Définition :

Le métabolisme secondaire est une exclusivité du monde végétal ; ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante, on les appelle alors : « métabolites secondaires ». Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces (Bruneton., 1999).

Ignorés pendant longtemps, il s'est avéré que leur fonction avait un rôle clé dans plusieurs processus que sont :

- la protection de la plante contre les herbivores et les attaques microbiennes ;
- la pollinisation et la dispersion des graines par les animaux, comme des agents allélopathiques.
- La protection contre les UV ;
- Ce sont des molécules signales dans la formation des nodules qui fixent le nitrogène dans les racines des légumes.

Ces métabolites sont aussi utilisés comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, arômes, médicament et parfums, et ils apparaissent comme des sources potentielles de nouveaux médicaments, d'antibiotiques, d'insecticides, et d'herbicides (Croteau et al., 2000 ; Dewick., 2002).


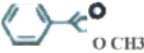
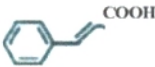
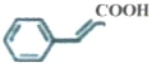
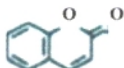
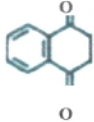
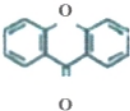
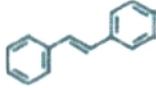
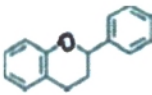
### II.2.2 Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances qui constituent une vaste famille difficile à définir, et sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique lié directement par un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une fonction éther, ester ou hétéroside (Hamslane, 1995).

Plus de 8000 structures phénoliques ont été recensées et sont largement dispersées dans le règne végétal (Strack, 1997).

La classification des polyphénols est basée sur le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbone (Tableau 3), qui sont souvent associés à des sucres et à des acides organiques ; les composés phénoliques peuvent être classés en deux groupes : **les flavonoïdes et les non flavonoïdes** (Crozier et al., 2006).

**Tableau 3 : Structure des composés polyphénoliques (Crozier et al., 2006).**

Nombre de C	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénoliques	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénones	Gallacétophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl Acétique	
9	C6-C3	Acide Hydrxycinnamique	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculétine	
10	C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthone	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

## II.2.3 Classification des composés phénoliques :

Les polyphénols, y compris l'acide cinnamique et les flavonols sont produits à partir du métabolisme général du phénylpropanoïde, dans lequel l'étape initiale est l'élimination de l'ammoniaque de l'acide aminé aromatique phénylalanine pour former l'acide cinnamique. Cet acide peut être hydroxylé en présence de l'O<sub>2</sub> par une mono-oxygénase en acide 4-hydroxycinnamique (acide p-coumarique) qui a une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ; l'acide coumarique peut aussi être formé directement par l'élimination de l'ammoniaque à partir de la tyrosine (Hahlbrock et Scheel., 1989 ; Rosler et al., 1997).

Il existe plusieurs flavonoïdes mais la première étape engagée dans leur synthèse, est catalysée par la chalcone synthase, et la condensation du 4-coumaroyl-CoA avec trois molécules de malonyl-CoA formant trois molécules de CO<sub>2</sub> et un simple flavonoïde, la chalcone avec un squelette en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Forkmann et Heller., 1999).

### II.2.3.1 Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes (du latin flavus : jaune) sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux, on les trouve dissous dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guignard., 2000).

Ils ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques (figure7), de cycle en C<sub>6</sub>, relié par une chaîne en C<sub>3</sub> (Bruneton., 1999).

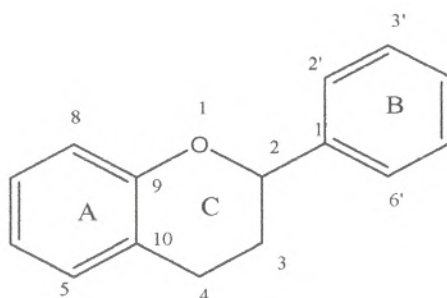
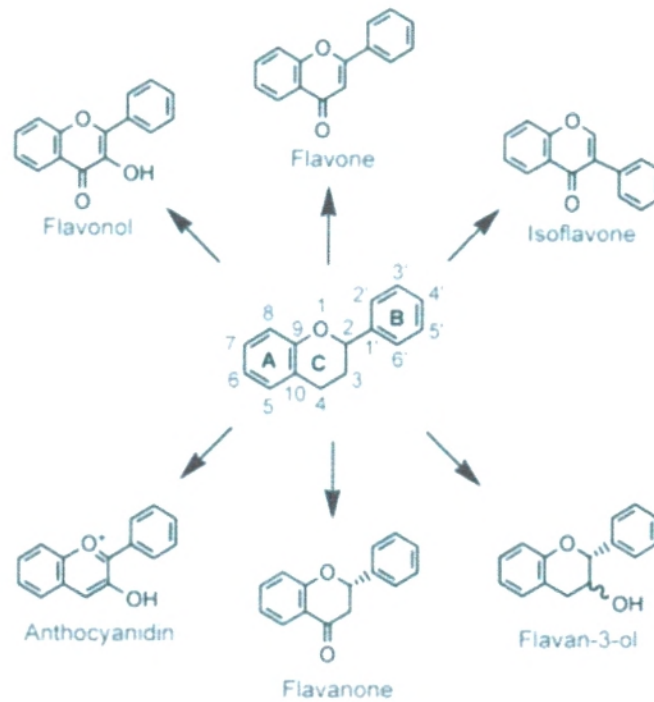


Figure 7 : Structure de base des Flavonoïdes (Bruneton., 1999).



Ils sont présents en grande concentration dans l'épiderme des feuilles et la peau de fruits et ont un rôle important et très varié en tant que métabolite secondaire ; dans la plante, ils sont impliqués dans divers processus comme la protection contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules qui fixent le nitrogène, et la résistance contre les maladies (Koes et al., 1994 ; Pierpoint., 2000).

Les principales sous classes des flavonoïdes sont : les flavones, flavonols, flavan-3-ols, isoflavones, flavanones et anthocyanidines (figure 8).



**Figure 8 : Structure générale des principaux flavonoïdes (Crozier et al, 2006).**

La coloration vive des feuilles d'automne est due aux carotènes ainsi qu'à la transformation de grandes quantités de flavonols incolores en **anthocyanes** lors de la dégradation de la chlorophylle. Ces pigments non azotés, ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes (Marfak., 2003).

En outre, ils se comportent comme des inhibiteurs enzymatiques et ils sont proposés en ophtalmologie en cas de troubles circulatoires au niveau de la rétine ou de la choroïde et pour l'amélioration de la vision crépusculaire (Bruneton., 1999).

### **II.2.3.2 Les non flavonoïdes :**

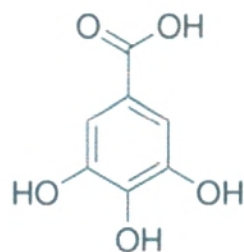
Le principal non flavonoïde de ce groupe est représenté par les acides phénols à C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, le plus connu étant l'acide gallique qui est le précurseur des tanins hydrolysables, les hydroxycinnammates (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) et dérivés, et les stilbènes (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) (Tableau 3) (Crozier et al., 2006).

#### **II.2.3.2.1 les acides phénoliques :**

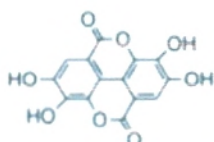
Les acides phénols sont aussi connus sous le nom de « *hydroxy benzoates* », le principal composé étant l'*acide gallique*, dont le nom dérive du nom français : galle qui signifie « *enflure* » au niveau du tissu de la plante suite à une attaque par des insectes parasites.

L'acide gallique est l'unité de base des Gallotannins, tandis que l'acide gallique et le hexahydroxydiphénol sont tous deux des sous unités des ellagitannins (figure 9) ;

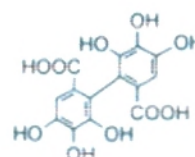
Gallotannins et ellagitannins sont appelés aussi « *tannins hydrolysables* » ; et comme leur nom l'indique, ils peuvent être hydrolysés pour donner de l'acide gallique et/ou de l'acide ellagique après traitement avec de l'acide dilué tandis que les *tannins condensés* ne s'hydrolysent pas (Crozier et al., 2006).



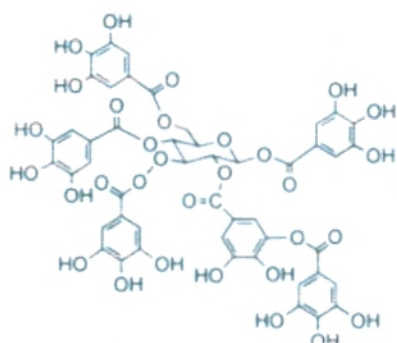
Acide gallique



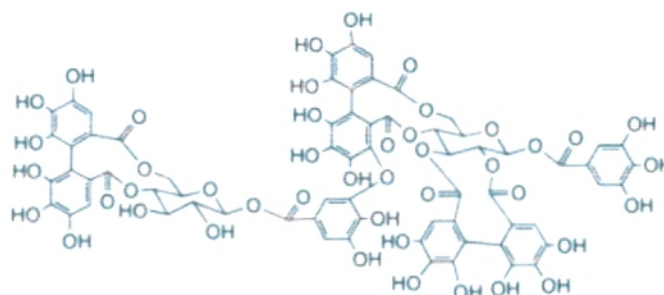
Acide ellagique



Acide hexahydroxydiphénique



Gallotannins



Ellagitannins

**Figure 9 : structure générale des tannins hydrolysables (Crozier et al., 2006).**

Les tannins condensés et les tannins hydrolysables sont capables de se lier et de précipiter le collagène de la peau des animaux. Les tannins extraits des plantes ont, en plus été la base des industries pendant plusieurs années. Les tannins se lient aux protéines de la salive, produisant ainsi un goût astringent au niveau de la bouche.

Beaucoup de tannins sont extrêmement astringents et rendent les tissus des plantes immangeables, certains mammifères comme le bétail : biche et cerf, préfèrent caractéristiquement manger des plants à concentration élevée en tannins (Crozier et al., 2006)..

Les fruits non mures contiennent des concentrations très élevées en tannins, qui sont typiquement concentrées dans la couche externe des cellules ; le taux en tannins et /ou l'astringence associée diminuent quand le fruit devient mure et quand les graines germent (Crozier et al., 2006).

Les tannins sont aussi utilisés dans le domaine médical, on les utilise dans les secours immédiats des maux de gorge, contre les diarrhées, la dysenterie, l'hémorragie, la fatigue, les ulcères cutanés, et comme cicatrisants sur les blessures (Bejaj., 1999).

Certains tanins auraient des propriétés antioxydantes ; au cours de ces dernières années, ces molécules ont également été étudiés pour leur potentiel anticancéreux par le biais de différents mécanismes (Galvi et al., 1995).

### II.2.3.2.2 les hydroxycinnammates :

L'acide cinnamique est un composé en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> qui a été assigné au groupe des hydroxycinnammates car c'est un produit du phénylpropanoïde. Les hydroxycinnammates les plus connus sont : l'acide p-coumarique, l'acide caféique, et l'acide ferulique ; l'acide quinique qui est un dérivé de l'acide caféique (figure 10), comme l'acide 3-, 4-, et 5-O-caffeoylquinique sont des composés communs des fruits et des légumes ; le 5-O-caffeoylquinique est souvent rapporté à l'acide chlorogénique qui constitue environ 10% des fèves vertes de café robusta (les graines traitées de *Coffea canephora*), les consommateurs réguliers de café peuvent avoir une prise journalière supérieure à 1g (Crozier et al., 2006).

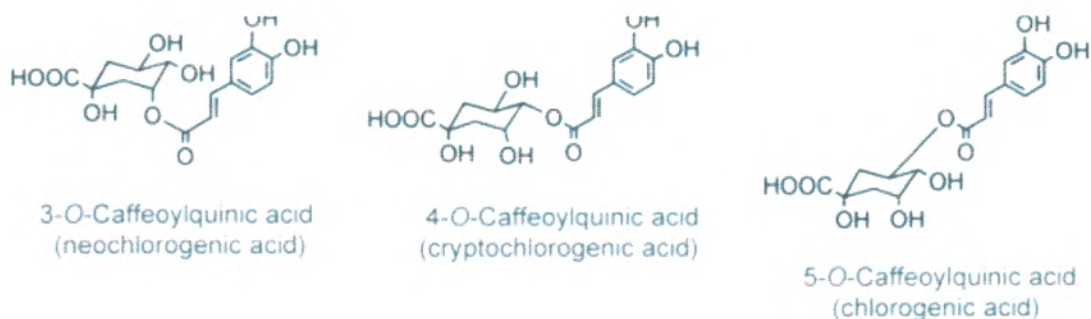


Figure 10: structure chimique des différents dérivés de l'acide caféique

## II .2.3.3 Les stilbènes:

Ce sont des composés polyphénoliques à une structure en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> comme les flavonoïdes ;

Les stilbènes sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse aux attaques des champignons, des virus, et des bactéries pathogènes.

Le resvératrol est le stilbène le plus connu, dont les principales sources sont : les raisins, le vin, le soja, et les cacahuètes, on le retrouve sous ses deux formes isomériques Cis et trans mais dans les tissus des plantes, il est principalement sous forme de trans-resvératrol-3-O-glucoside connu sous le nom de picéide et polydatine (figure11) (Crozier et al., 2006).

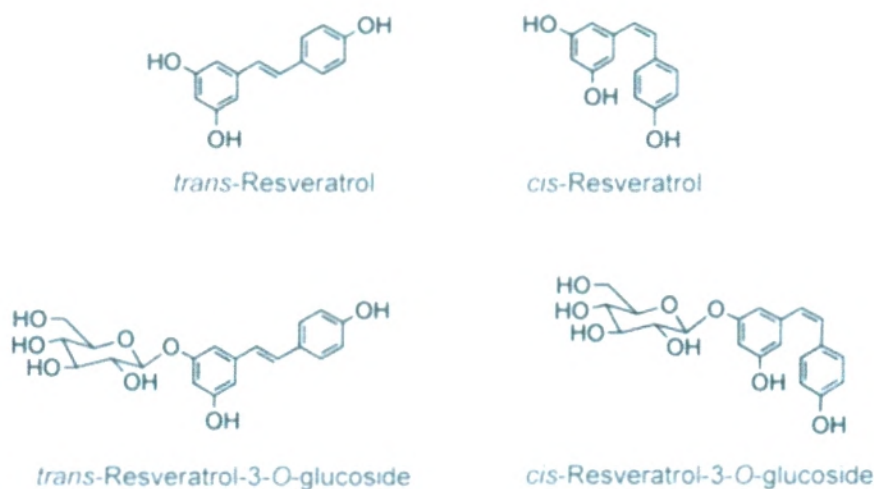


Figure 11 : Structure générale des Stilbènes (Crozier et al, 2006).

## II.2.3.4 Les bétalaïnes :

Ce sont des dérivés de l'acide bétalamique et qui contiennent des bétaxanthines jaunes, avec des acides aminés comme des bétacyanines rouge-violette, et sont divisés en plusieurs dérivés substitués cyclo-dopa (cyclo-dihydroxy-phénylalanine) (Strack et al, 2003).

Les bétalaïnes existent seulement chez quelques familles de l'ordre des *Caryophyllales* qui regroupe d'autres familles qui synthétisent les anthocyanines ; car les voies de synthèse des bétalaïnes et des anthocyanines semblent être mutuellement exclusives (Kimler et al, 1970; Stafford., 1994 ; Mabry, 2001), suggérant aussi qu'elles assurent les même fonctions (Steyn et al., 2002 ; Stinzinger et Carie., 2004).

Chez *M. crystallinum*, les bétalaïnes sont localisées dans les vacuoles, et elles s'accumulent dans la face supérieure des feuilles en réponse aux intensités élevées des radiations (Vogt et al., 1999 ; Ibdah et al., 2002).

### II.2.4 Les composés azotés :

#### II.2.4.1 Les alcaloïdes :

Initialement définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle, et de distribution restreinte. Ils ont une structure complexe, et leur atome d'azote est inclu dans un système hétérocyclique (Bruneton., 1999). La recherche biochimique sur les alcaloïdes des plantes a commencé avec la découverte de la morphine en 1806, sa structure n'a été élucidée qu'en 1952, à cause de sa complexité stéréochimique ; depuis, des recherches approfondies chimiques, biochimiques, et moléculaires ont permis de comprendre la biosynthèse de ces alcaloïdes dans la plante (Facchini., 2001).

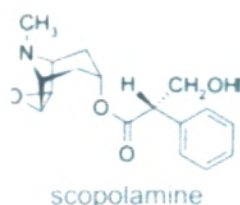
Appartenant au groupe des métabolites secondaires, les alcaloïdes ont un rôle défensif pour la plante contre les herbivores et les pathogènes. Grâce à leur activité biologique potentielle, la plupart des 12000 alcaloïdes connus sont exploités dans le domaine pharmaceutique, comme stimulants, narcotiques, ou comme des poisons (Wink., 1998).

Les plantes produisent différents groupes d'alcaloïdes dont :

- a. Alcaloïdes benzyloquinoliniques : très utilisés dans le domaine pharmaceutique, à cause de leur activité pharmacologique, par exemple la morphine comme analgésique, la colchicine comme perturbatrice de microtubules, et la (+)-tubocurarine pour le blocage neuromusculaire.

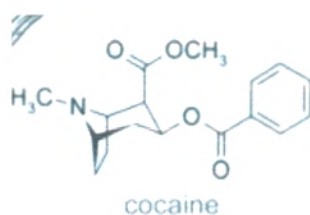
Les Alcaloïdes benzyloquinoliniques se retrouvent surtout chez les angiospermes : *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, *Merispermaceae* et *Magnoliaceae* (Zulak et al., 2006).

- b. Alcaloïdes tropaniques : ils possèdent un noyau 8-azabicyclo [3.2.1] octane et sont retrouvés chez trois familles de plantes : les *Solanaceae*, les *Erythroxylaceae*, et les *convolvulaceae* ; mais la plupart d'entre eux sont très toxiques ; D'ailleurs les plantes produisant les alcaloïdes tropaniques ont été utilisées en médecine et comme poisons à travers l'histoire : Cléopâtre l'avait testé sur ses esclaves, et les épouses des empereurs romains Augustus et Claudius l'utilisaient pour tuer. La *scopolamine* et la *hyoscyamine* extraites de *Datura stramonium* sont aussi utilisées comme sédatifs. L'atropine, qui est une forme racémique du hyoscyamine, est un récepteur antagoniste de l'acétylcholine muscarinique utilisé pour dilater la pupille durant les examens ophtalmologiques et pour traiter certains cas d'empoisonnement. La scopolamine est toujours utilisée pour prévenir les vomissements et, en combinaison avec la morphine comme sédatif contre les douleurs (Zulak et al., 2006) (figure12).



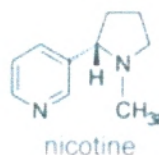
**Figure 12 : structure chimique de la scopolamine**

L'espèce *Erythroxylum coca* qui appartient à la famille des *Erythroxylaceae* est une source de cocaïne, elle produit entre **0.2% et 1% (w/w)** au niveau des feuilles (Griffin et Lin., 2000) (figure13).



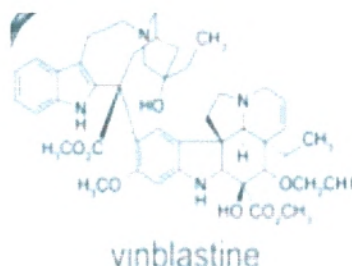
**Figure 13 : Structure chimique de la cocaïne**

- La nicotine : le tabac *Nicotiana tabacum* est une plante native de l'Amérique, qui a été utilisée des siècles avant le christ, le principe actif chez toutes les espèces de *Nicotiana* est la nicotine qui est un alcaloïde simple composé d'un noyau pyridine associé à un autre noyau N-méthylpyrrolidine (Figure 14).



**Figure 14 : structure chimique de la nicotine**

- c. Les alcaloïdes indole terpénoïdes : retrouvés surtout chez les *Apocynaceae*, les *Loganiaceae*, et les *rubiaceae*. La strychnine et la yohimbine sont des alcaloïdes indole, ainsi que la Vincristine et la Vinblastine qui sont des agents anti-néoplasiques, extraits de *Catharanthus roseus* (figure 15).



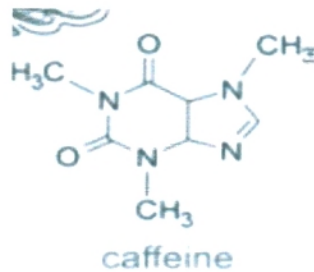
**Figure 15: Structure chimique de la vinblastine**

*La quinine* est utilisée comme anti pyrétique pour combattre la malaria, pour provoquer les contractions utérines lors des accouchements, et pour traiter les maladies infectieuses (Schmeller et Wink., 1998).

*La réserpine* influence la concentration en glycogène, en acétylcholine, en acides nucléiques et en hormones anti diurétiques, elle est surtout utilisée pour traiter les personnes âgées souffrant d'hypertension moyenne (Crozier et al., 2006).



- d. Les alcaloïdes puriques : la caféine (1,3,7-triméthylxanthine) a été découverte dans le café (*Coffea arabica*), et dans le thé (*Camellia sinensis*) en 1820 (Ashihara et Crozier., 2001) (figure16).



**Figure 16 : structure chimique de la caféine**

*La théobromine* est aussi un alcaloïde commercialement important, retrouvé dans les graines de cacao (*Theobroma cacao*) (Crozier et al., 2006).

- e. Les alcaloïdes pyrrolizidine : ce sont principalement les toxines produites par les plantes, qui ont un effet très nocif sur la santé humaine et animale, elles sont surtout produites par les *Boraginaceae*, les *Asteraceae* (*Senecionae* et *Eupatoriae*), les *Fabaceae* (*Crotalaria*) et les *Orchidaceae* (Ober et al., 2003).

## **III. Activité biologique des métabolites secondaires :**

### **III.1 Le pouvoir antioxydant :**

#### **III.1.1 L'oxydation :**

C'est la combinaison entre l'oxygène et un autre élément, au cours de cette réaction chimique, un atome ou un ion perd un ou plusieurs électrons ; des électrons libres viennent alors se placer ailleurs et abiment ainsi l'élément sur lequel ils se sont installés. Dans toutes les cellules de l'organisme, il en va de même : l'oxygène est impliqué dans toutes les réactions chimiques qui, entre autre produisent chaleur et énergie (Henry., 1961).

#### **III.1.2 Les radicaux libres :**

Au cours de ces multitudes de réactions, il y a une production non contrôlée de déchets appelés « radicaux libres », ceux-ci agressent les acides nucléiques, les protéines des cellules, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et les enzymes. Cette oxydation détruit ainsi les cellules de l'organisme qui à son tour possède un énorme système de défense, ce sont des enzymes appelées : les glutathion peroxydases qui constituent la première ligne de défense contre les agressions produites par les radicaux de l'oxygène (Kehrer et Smith., 1994).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbite électronique la plus externe, ce sont des molécules naturellement produites par notre organisme ; elles sont synthétisées par les globules blancs pour lutter contre l'invasion de virus et des bactéries, elles entrent donc dans le système immunitaire (Kehrer et Smith., 1994).

#### **III.1.3 Les antioxydants :**

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées ; chaque molécules antioxydantes ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes (Benarous., 2007).

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés aujourd'hui sont : le BHA (butylated hydroxyanisole), le BHT (butylated hydroxytoluène), le PG (propylgallate), et le TBHQ (tert-butylhydroquinone) (Sherwin., 1990).

Cependant, ces antioxydants sont suspectés d'être responsables de sérieux dégâts au niveau du foie et de carcinogénèses sur des animaux du laboratoire. En conséquent, le développement et l'utilisation d'antioxydants d'origine naturelle devient très important (Gulçin et al., 2002).

La catalase (**CAT**) libérée après dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène est un composé important dans les mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif. Faisant parti du système de réponse antioxydante, la CAT joue un rôle dans le maintien du redox homéostasique des cellules ; elle est aussi impliquée dans le processus de transduction du signal entre les cellules et l'acclimation systémique qui s'acquière grâce à l'action du signal du peroxyde d'hydrogène (Niewiadomska et Miszalski., 2008).

Cette enzyme est présente chez tous les organismes aérobies et la plupart des organismes anaérobiques. Chez les plantes, des formes multiples de cette enzyme sont habituellement présentes, et sont exprimées dans des tissus et à des stades de développement différents (Niewiadomska et Miszalski., 2008).

Sur les feuilles vertes, la CAT peut agir comme un support pour le peroxyde d'hydrogène généré pendant la photosynthèse ; cependant, l'intensité de cette dernière peut influencer l'activité de la CAT. Le métabolisme de l'acide crassulacéanique (CAM) retrouvé chez les plantes, semble être un bon modèle pour l'étude des mécanismes de régulation de l'activité de la CAT. Le CAM est un mode spécialisé de l'acquisition du carbone photosynthétique dans lequel le CO<sub>2</sub> est dégagé pendant la nuit par l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxylase (**PEPC**), et les produits de carboxylation de la nuit (les acides organiques) sont ultérieurement décarboxylés pendant la journée élevant ainsi le taux de CO<sub>2</sub> autour des stomates fermés (Cushman et al., 2002).

En effet, des fluctuations diurnes importantes de l'activité du CAT ont été détectées après la transition du **CAM-C3** sur les feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum*, qui pourrait indiquer des régulations du flux de la photosynthèse (Niewiadomska et Miszalski., 1999).

Chez la plante halophyte *M. crystallinum*, le changement métabolique du CAM-C3 dépend surtout des conditions environnementales et peut être induit par une multitude de facteurs stressants, dont la salinité (Adams et al., 1998 ; Miszalski et al., 1998 ; Cushman et al., 2002).

De plus, une blessure mécaniquement induite au niveau des feuilles de *M. crystallinum* provoque une activité NADP-ME (NADP malic enzym) très rapide due à la diminution de la conductance stomatale et aux changements de l'activité de la superoxyde dismutase et de la CAT ; des observations similaires ont été détectées durant plusieurs jours lors de la transition du C3 en CAM induite par la salinité chez *M. crystallinum* (Slesak et al., 2008).

### **III.2 Le pouvoir antimicrobien :**

A cause des résistances que les microorganismes acquièrent contre les antibiotiques, un intérêt croissant est tourné vers les antibactériens naturels, surtout pour la conservation des aliments comme les extraits d'herbes et les épices (Smid et Gorris., 1999).

En effet, des extraits naturels bruts, et les composés biologiquement actifs des différentes espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent représenter des sources intéressantes pour de nouveaux agents de conservation (Al-Fatimi et al., 2007).

Ces composés naturels sont aussi activement étudiés pour envisager des pesticides synthétiques qui auraient un niveau de sécurité élevé et constant, et un impact minime sur l'environnement (Rai et Mares., 2003).

- Parmi les extraits végétaux, les huiles essentielles sont les plus utilisées, pour leurs propriétés antiseptiques (Recio et al., 1989 ; Bouanoun et al., 2007), antiparasitaires, antispasmodiques, et antioxydantes (Deba et al., 2008).

Les travaux de Bekhechi et al, (2002), ont confirmé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*.

La plupart des huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes plus ou moins prononcées. En effet, en raison de leur caractère lipophile, leurs constituants se lient à la membrane cellulaire des microorganismes, ils inhibent notamment les échanges d'électrons membranaires lors de la phosphorylation oxydative et freinent ainsi le métabolisme énergétique. À forte concentration, les huiles essentielles conduisent à la lyse membranaire et à la dénaturation des protéines cytoplasmiques (Tuescher et al., 2005).

L'ajout de plantes aromatiques tarde la détérioration des aliments par les microorganismes ; comme dans le cas des viandes, un ralentissement significatif de la dégradation des protéines carnées a lieu par l'addition des huiles essentielles de clou de girofle, du gingembre, de l'ail, et de la coriandre. Cet effet antibactérien contribue dans certains cas à ralentir la croissance de champignons pathogènes, empêchant aussi la production de mycotoxines (Tuescher et al., 2005).

- **Les polyphénols :** le coefficient phénolique exprime l'activité antimicrobienne comparativement au phénol de référence (=1), il s'élève pour l'huile essentielle de lavande à **1.6**, le fenouil à **13**, et pour le thym à **1302** (Tuescher et al., 2005).  
D'autre part, Gaceb et Rahmania en 2002, ont démontré que les acides phénoliques jouent un rôle important dans la résistance du palmier dattier à la fusariose.
- **Les flavonoïdes** montrent aussi une activité antimicrobienne, exemple de travaux de Harikrisha et al, (2004) qui ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside prunine-6-*O-p*-coumarate contre deux souches de bactéries à Gram (+) : *Bacillus subtilis*, et *Staphylococcus albus* ; et deux bactéries à Gram(-) : *Escherichia coli*, et *Proteus vulgaris*.
- **Les saponosides :** un bon nombre de saponosides assurent la défense des végétaux contre l'attaque microbienne ou fongique, ce sont des substances bioactives ayant des propriétés diverses : anti-inflammatoires, antifongiques, anti tumorales....etc. (Bruneton., 1993).

- **Les tanins :** La privation du métal par les tanins peut affecter l'activité des métallo-enzymes, en effet, on a démontré que les tanins étaient particulièrement de bons inhibiteurs des métallo-enzymes fongiques telles que les peroxydases et la catalase par rapport aux autres enzymes comme la cellulase, la pectinase, la xylanase ou la protéase.

Par contre, de nombreux microorganismes peuvent vaincre les défenses des plantes à base de tannins, ils peuvent détoxifier les tanins grâce à la synthèse de polymères de tanin complexant, l'oxydation, la biodégradation des tanins ou la synthèse de sidérophores (Scalbert, 1991).

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes :

### 1. Matériel biologique :

Les parties aériennes (feuilles) de l'espèce *Mesembryanthemum crystallinum* ont été récoltées de la région de Béni Saf entre le mois de Janvier et le mois de Mars 2009.

Le séchage a été effectué à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant deux semaines. Les feuilles séchées ont été ensuite broyées ou émiettées avec les doigts pour éviter la chaleur du robot, et conservées dans un endroit sec et à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

### II. Détermination du taux d'humidité :

Le taux d'humidité est déterminé sur l'échantillon fraîchement récolté, pour notre cas des feuilles fraîches ont été utilisées.

#### ✓ *Principe :*

- Procéder à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à une température de 100°C à 105°C et sous la pression atmosphérique jusqu'à obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placés dans un dessiccateur (**Audigie et al, 1980**).

#### ✓ *Mode opératoire :*

- sécher à l'étuve les vases de tare pendant 30 mn à 100°C.
- Laisser refroidir dans un dessiccateur durant 20 à 30 mn, puis peser les vases de tare, **P1**.
- Mettre dans chaque vase 2g d'échantillon moulu, puis peser, **P2**.
- Placer les vases contenant l'échantillon pendant 3h à 105°C.
- laisser refroidir au dessiccateur pendant 15 mn, puis peser, **P3**.
- Remettre les vases dans l'étuve pendant 1 heure et peser comme précédemment.

La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2 mg, sinon l'opération est renouvelée jusqu'à poids constant.



## ✓ Expression des résultats :

Le taux d'humidité (%) d'un échantillon de matériel végétal est donné par la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = [(P2-P3) / (P2 -P1)] \times 100$$

Avec :

- P1 : masse en gramme de la vase de tare vide.
- P2 : masse en gramme de la prise d'essai avant séchage.
- P3 : masse en gramme de la prise d'essai après séchage.

## III. Détermination quantitative des métabolites primaires :

### III.1 Dosage des lipides totaux :

#### ✓ principe :

Cette opération est réalisée dans un extracteur de type soxhlet à l'aide d'un solvant organique (le n hexane) (Lecoq, 1965).

Après évaporation du solvant, le taux de matière grasse brute est déterminé gravimétriquement selon la méthode indirecte.

#### ✓ mode opératoire :

Mettre 1 ou 2g de l'échantillon à analyser (sec) dans une enveloppe séchée, préparée spécialement et pesée. Placer cette dernière dans l'appareil de soxhlet, la durée de l'extraction dépend de la quantité d'huile présente dans l'échantillon à analyser : elle est de 3 à 10 heures (pauvres en huile) et de 10 à 12 heures (riches en huile).

- m : masse en gramme d'échantillon séché.
- Peser l'enveloppe vide séchée + échantillon : poids A (PA).
- Peser l'ensemble (enveloppe +échantillon) après extraction : poids B (PB).

## ✓ Expression des résultats :

Le taux en matière grasse brute est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de lipides \% de matière sèche} = (\text{PA} - \text{PB} / \text{m} ) \times 100.$$

## III.2 Dosage des protéines :

Ce dosage est réalisé par la méthode de **Kjeldahl (1883)**, elle comprend trois étapes : *la minéralisation, la distillation et la titration.*

### ✓ Principe :

La méthode consiste à détruire la matière organique par l'acide sulfurique concentré et chaud, qui fait passer quantitativement l'azote à l'état de sulfate d'ammonium.

L'ammoniac est ensuite déplacé par la soude et recueilli dans un excès d'acide sulfurique de concentration connue. Un titrage en retour par de la soude de concentration connue permet de déduire la quantité d'ammoniac formée, donc la teneur en azote de l'échantillon.

### ✓ Mode opératoire : [méthode d'analyse N°079606/CACQE/Ministère du commerce]

#### - La minéralisation :

- Elle se fait dans une unité de digestion **BUCHI-K-435**.

Peser **1g** de l'échantillon à analyser broyé, tamisé à travers des mailles de 2mm, et séché à 105°C jusqu'à poids constant ; et

- Introduire soigneusement dans un matras de **Kjeldahl** (le tube de digestion).



**Figure 17 : Unité de digestion BUCHI-K-435.**

- pour la digestion de chaque échantillon, ajouter dans le matras :
  - 1g de catalyseur à partir d'un mélange de 15g de sulfate de potassium anhydre  $K_2SO_4$ , et 1,2g de sulfate de cuivre  $CuSO_4$ .
  - Ajouter 12 ml d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  concentré à 98%.

Après un certain temps de minéralisation, ajouter 1 à 2 ml de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  concentré à 35 % (30 vol).

- Mélanger soigneusement pour assurer un mouillage complet de la prise d'essai.
- Procéder à un préchauffage de l'appareil de digestion pendant **10mn**.
- Placer les matras sur le dispositif de chauffage.
- Les gaz d'échappement sont aspirés à l'aide d'une trompe à vide.
- chauffer le tube de digestion tout d'abord doucement pour éviter que la mousse monte ou s'échappe du matras.
- Chauffer avec modération.

Le minéralisât (le contenu du matras) est transvasé dans une fiole en complétant le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

Mélanger soigneusement afin de solubiliser au maximum les sulfates d'ammonium.

Laisser refroidir.

### - la distillation :

Elle se fait dans une unité de distillation **BUCHI-K- 314**.

\_ 10 ml du contenu de la fiole sont introduites dans le matras de l'unité de distillation auxquels sont ajoutés 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude caustique (NaOH) à 35%.

- Chauffer pendant 4 minutes de façon à recueillir 150 ml de distillat.
- Vérifier après la neutralité du distillat qui coule de l'extrémité du réfrigérant au moyen de papier pH, si la réaction est alcaline poursuivre la distillation.

Le distillat est ensuite recueilli dans un erlenmeyer gradué qui contient 25ml de solution d'acide sulfurique à 0,1 N additionné de 10 gouttes d'indicateur de *Tashiro* (de couleur rose violette en présence d'un milieu acide et verte dans le cas d'un milieu alcalin).



**Figure 18 : Unité de distillation BUCHI-K- 314**

- **la titration :**

Puisqu'on utilise l'acide sulfurique comme liquide de récupération, on va alors titrer l'excès d'acide sulfurique avec la solution de NaOH à 0,1 N jusqu'à changement de la coloration du violet au vert.

• **Expression des résultats :**

Le pourcentage d'azote total est calculé par la formule suivante :

$$\text{Azote total (\%)} = \text{N\%} = (\text{Vb} - \text{Ve}) \times \text{N} \times f \times 0,014 \times 10 \times 100 / \text{m.}$$

Dont :

- **V<sub>b</sub>** : volume en ml de la solution de NaOH à 0,1 N nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide sulfurique présent dans l'essai à blanc (1g de saccharose).
- **V<sub>e</sub>** : volume en ml de la solution de NaOH à 0,1 N nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide sulfurique présent dans l'échantillon à analyser.
- **N** : normalité de NaOH utilisée pour la titration (0,1 N).
- **f** : facteur de correction de la solution de NaOH.
- **m** : masse en g de la prise d'essai.
- **10** : coefficient du volume total de la solution à doser.
- **100** : coefficient du pourcentage.

- conversion du taux d'azote en taux de protéines :

**100g** de protéines correspond à **16 g** d'azote dans la majorité des cas. On utilise un facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

$$F = 100 / 16 = 6,25$$

$$\text{Les protéines brutes (\%)} = \text{PB \%} = \text{N \%} \times 6,25$$

### III.3 Dosage des sucres totaux :

La détermination de la quantité en oses présents dans les polysaccharides repose sur le dosage des sucres totaux par la méthode de **Dubois et al (1956)** appelée aussi méthode phénol/acide sulfurique.

- **principe :**

Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide (l'acide sulfurique).

L'analyse repose sur des techniques colorimétriques ; le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (phénol, orcinol, anthrone), avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses, et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, **5-hydroxy-méthyl-furfural** et de l'acide **5-formylfuroïque**.

Les chromophores ainsi formés de couleur jaune orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents (**Ruiz, 2005**).

La teneur en sucres est exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$  D +Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

- **Mode opératoire : (Dubois et al, 1956)**

**\*Préparation des échantillons :**

- Peser 0,5g d'échantillon dans un bêcher, ajouter 20ml d'acide sulfurique à 0,5M puis placer l'ensemble dans une étuve à 105°C pendant 3 heures.
- Transvaser quantitativement le contenu du bêcher dans une fiole de 500 ml (ajuster le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500 ml), puis filtrer la solution et la conserver à 4°C ;
- Réaliser des dilutions de 1/3 à partir de ce filtrat ;
- Préparer 3 essais.
- Dans des tubes en pyrex (2 cm Ø), déposer avec précaution 1ml de chaque essai, ajouter 1ml de phénol à 5 % et 5ml d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentré.
- Après agitation (au vortex), les tubes sont maintenus dans l'étuve pendant 5 min à 100°C, puis laissés dans l'obscurité pendant 30min.
- Enfin, lire la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

**\*Préparation de l'étalon :**

Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire ; une solution mère (SM) de  $\alpha$  D+ glucose de concentration 100  $\mu\text{g/ml}$  est préparée comme suit :

- Préparer une solution de glucose de 0,01g/100ml (100 $\mu\text{g/ml}$ ).
- A partir de cette solution mère, préparer des dilutions de différentes concentrations 25 $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$ , 75  $\mu\text{g/ml}$ , et 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Prendre 1ml de chaque concentration (2 essais pour chaque concentration) et ajouter 1ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique à 98 % à l'aide d'une burette ;
- Après agitation (au vortex), les tubes sont maintenus pendant 5 min à 100°C, puis à l'obscurité pendant 30 min.
- Lire la densité optique de chaque concentration à 490 nm, après tracer la courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

$$DO = f(C) \iff DO = \varepsilon \times C$$

### \*Expression des résultats :

A partir des densités optiques de la courbe d'étalonnage, on peut obtenir la teneur en sucres de notre échantillon.

La courbe d'étalonnage :

$$DO = f(C) \iff DO = 0,01 \times C$$

Dont  $\varepsilon$  : la pente, et  $C$  : la concentration de D+Glucose en  $\mu\text{g/ml}$ .

La teneur en sucres est exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$  D +Glucose, elle est convertie par rapport à 100g de matière sèche.

### III.4 Dosage des cendres :

Il consiste en une calcination au bec bunsen de l'échantillon jusqu'à apparition d'une fumée noire, puis en son incinération dans un four à moufle, dans des creusets en porcelaine, à une température de  $750^\circ\text{C}$  jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs après refroidissement (Audigie et al, 1980).

- **Mode opératoire :**

- Effectuer une préincinération des creusets en porcelaine à  $300^\circ\text{C}$  pendant 15 min,
- Après refroidissement, les peser vides, c'est le poids P1 ;
- Peser 1g de l'échantillon dans les creusets, c'est le poids P2 ;
- Introduire les creusets avec l'échantillon dans le four à moufle à température de  $750^\circ\text{C}$  jusqu'à ce que le contenu en substances prenne une couleur blanche grisâtre qui blanchit après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Peser ensuite les creusets avec les cendres, c'est le poids P3.

- **Expression des résultats :**

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$X \% = [(P3 - P1) / (P2 - P1)] \times 100$$

Dont :

**P1** : poids du creuset vide ;

**P2** : poids du creuset + échantillon avant incinération ;

**P3** : poids du creuset + échantillon après incinération ;

**100** : pour exprimer le pourcentage ;

**X %** : pourcentage en cendres.

#### **IV. Détermination quantitative des métabolites secondaires :**

##### **IV.1 Préparation de l'extrait de plante :**

L'extrait de plante est obtenu, en mélangeant sous agitation magnétique **2,5 g** de matière sèche avec **25ml** de méthanol pur pendant 30 min ; puis laisser macérer ce mélange pendant 24h à **4°C**, filtrer après, à travers du papier Whatman N°4 et enfin évaporer à sec (**Ksouri et al. 2008**).

##### **IV.2. Dosage des polyphénols totaux :**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique, décrite par **Dewanto et al (2002)**.

##### **📌 Principe :**

- Mélanger 125 µl de l'extrait obtenu avec 500µl d'eau distillée et 125µl de réactif de folin-Ciocalteu.
- Ajouter 1250 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (70g/l) ;
- Ajuster le volume final avec de l'eau distillée jusqu'à 3 ml,
- Incuber les tubes à l'obscurité et à 23° pendant 90 min ;
- Lire l'absorbance à 760 nm ;



La quantité de polyphénols totaux est exprimée en mg d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g DW) suivant une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Annexe I**).

### **IV.3. Dosage des flavonoïdes totaux :**

Les flavonoïdes totaux ont été estimés selon la technique colorimétrique décrite par **Dewanto et al en (2002)**.

#### **🚩 Principe :**

- Mélanger 0.25 ml de l'échantillon dilué ou de la solution standard de (+)-catéchine avec 75  $\mu$ l de NaNO<sub>2</sub> en solution et mélanger pendant 6 min avant d'ajouter 0,15ml d'AlCl<sub>3</sub> (100 g/l).
- Ajouter après 5 min 0,5 ml de NaOH ;
- Ajuster le volume final à 2,5 ml avec de l'eau distillée, puis bien mélanger ;
- Lire l'absorbance à 510 nm contre l'échantillon blanc.

La quantité de flavonoïdes totaux est exprimée en mg de catéchine par gramme de poids sec (mg CE/g DW) suivant la courbe d'étalonnage de la catéchine (**Annexe I**).

#### **🚩 Rendement des flavonoïdes :**

- Mélanger **10 g** de matériel végétal broyé dans 100 ml d'éthanol bouillant en présence de 5g de CaCO<sub>3</sub>. L'ébullition est maintenue sous réfrigérant à reflux pendant 1h.
- Après filtration, le dépôt est traité de nouveau pendant 1h à l'ébullition dans la même quantité d'alcool.
- Les deux solutions alcooliques sont réunies, elles sont éliminées par distillation sous pression réduite, et le résidu sirupeux est repris par 50 ml d'eau distillée bouillante.

- La solution aqueuse est filtrée à chaud et le filtrat épuisé successivement par l'acétate d'éthyle (AcOEt), tous les composés flavoniques se retrouveront dans cet extrait (**Dauguet et Foucher, 1982**).

➤ **Expression des résultats :**

$$Rd = [(P2-P1)/M] \times 100$$

- **Rd** : Rendement (% MS).
- **P1** : Poids du ballon vide et sec avant l'extraction.
- **P2** : Poids du ballon après extraction.
- **M** : Masse en gramme de l'échantillon.

#### **IV.4 Dosage des tannins condensés :**

Les proanthocyanidines ont été mesurées suivant la méthode méthanol-vanilline décrite par **Price et al (1978)** ;

- Préparer la solution de vanilline avec 0,5 % de vanilline et 4% d'HCl dans du méthanol ;
- Mélanger 50µl d'échantillon dilué avec 3 ml de la solution de vanilline, laisser dans un bain-marie à 30°C, et pendant 20 min ;
- Lire l'absorbance à 500 nm contre le solvant d'extraction comme blanc.

La quantité de tannins condensés totaux est exprimée en mg de (+)-catéchine/g de poids sec (**Annexe I**).

✚ **Rendement des tannins :**

- Mélanger 5g de matériel végétal broyé avec 90ml d'eau distillée et 55ml d'acétone, l'ensemble est porté à une macération à froid pendant quatre jours ;
- Filtrer et extraire la solution deux fois avec 25 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides ;

- Décanter et extraire la phase aqueuse quatre fois avec 25 ml d'acétate d'éthyle ;
- Sécher la phase organique avec  $MgSO_4$  puis faire évaporer le solvant à sec (**Bruneton, 1999**).

➤ **Expression des résultats :**

$$Rd = [(P2-P1)/M] \times 100$$

- **Rd** : rendement (%MS).
- **P1** : Poids du ballon vide et sec avant l'extraction.
- **P2** : Poids du ballon après extraction.
- **M** : Masse en gramme de l'échantillon.

### IV.5 Extraction sélective des alcaloïdes :

L'extraction des alcaloïdes est fondée, en règle générale sur le fait qu'ils existent habituellement à l'état de sels dans la plante, et sur leur basicité ; c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part.

L'extraction consiste à un épuisement des alcaloïdes par une solution alcoolique acidifiée, et pour purifier, on procède à une alcalinisation par une base concentrée ( $NH_4OH$ ) et une filtration. Il reste à la fin un résidu qui représente les alcaloïdes totaux (**Bruneton, 1999**).

#### **Mode opératoire : (Gericke et al, 2001)**

- Mélanger 35mg de la poudre de plantes avec 15ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 0,05M, et laisser à température ambiante pendant 20min.
- Après filtration, ré-extraire cette même quantité dans 5ml d' $H_2SO_4$  à 0,05M.
- Alcaliniser la phase aqueuse avec 4ml d'ammoniaque et extraire avec 100ml de dichlorométhane ( $CH_2CL_2$ ).
- Sécher l'extrait de dichlorométhane avec 1g de  $Na_2SO_4$ , puis faire évaporer sous pression réduite ; l'alcaloïde apparait comme une huile de couleur brune pale.

**V. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits de *M. crystallinum* :**

**V.1. Provenance des souches microbiennes :**

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence de l'institut Pasteur d'Alger, et ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Une souche de référence *Candida albicans* nous a été fournie par le laboratoire de « Antibiotiques, Antifongiques, Activité antimicrobiennes » de l'Université de Tlemcen.

**Tableau 4 : Souches de référence et leur code.**

<i>Souche</i>	<i>Code</i>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i>	Vectobac
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
<i>Candida albicans</i>	ATCC 33210

ATCC: American type of culture collection.

## V.2 Purification et /ou identification des germes étudiés:

La purification des souches a été réalisée par des passages successifs sur milieux liquide et solide spécifiques pour chaque espèce.

Avant la détermination du pouvoir antimicrobien des extraits de notre plante, nous avons procédé à la purification et /ou l'identification des souches microbiennes en étudiant leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques :

- **Aspects macroscopiques** : couleur et forme des colonies.
- **Aspects microscopiques** : forme, coloration de Gram.
- **Tests biochimiques** :
  - Type respiratoire
  - Recherche des voies d'attaque du glucose
  - Mise en évidence des activités enzymatiques : oxydase, catalase, production d'indole
  - Production de pigmentation
  - L'étude du métabolisme glucidique
  - L'étude du métabolisme protidique

L'identification a été approfondie en utilisant le système API (API 20E, API NE, API Staph, API Strep, API Candida).

Pour la levure, nous avons étudié les caractères morphologiques suivants : aspect des colonies, pigmentation, et examen à l'état frais. La souche a été conservée dans de la gélose Sabouraud inclinée (additionnée de Chloramphénicol et d'Actidione) à 4°C.

### ✓ Détermination du type respiratoire des bactéries (Marchal et al., 1991):

Cette épreuve consiste à ensemencer par piqure centrale les souches dans une gélose viande-foie régénérée contenue dans des tubes de prévôt ; l'incubation se fait pendant 24h à 37°C.

### ✓ Mise en évidence des enzymes respiratoires :

#### *\*Recherche de la catalase :*

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau et oxygène, dont l'accumulation a un effet létal sur les bactéries.

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée puis mettre en contact une colonie isolée prélevée directement du milieu de culture solide, avec une pipette Pasteur boutonnée.

Si la bactérie possède une catalase, on observe une formation plus ou moins intense de bulles d'oxygène (Joffin et Leyral., 2001).

#### *\*Recherche de l'oxydase :*

Les disques imprégnés de diméthyl-para-phénylène-diamine sont destinés à mettre en évidence l'oxydase du système respiratoire de certaines bactéries (Marchal et al., 1991).

### **Technique :**

Une suspension bactérienne est préparée dans un tube à essai contenant 0,5ml d'eau physiologique stérile, ensuite on y introduit le disque d'oxydase.

Une coloration violette vive survenant immédiatement prouve l'existence d'une oxydase dans le système enzymatique du germe.

#### *\*Recherche de la production d'indole :*

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophnase ; la culture est effectuée sur milieu Schubert, à 44°C (Marchal et al., 1991).

Après incubation, ce test nous révélera quatre caractères :

- La croissance à 44°C pour l'espèce *E.coli* qui appartient au groupe des coliformes thermotolérants.
- L'utilisation de mannitol révélée par l'apparition d'un trouble.
- L'utilisation du tryptophane donc production d'indole révélée par le réactif de Kovacs ;
- La production de gaz, révélée par la cloche de Durham.

### *\*Recherche de la coagulase pour les souches de Staphylococcus aureus :*

Ce test consiste à mettre au contact du plasma oxalaté avec une culture sur bouillon cœur-cerveau.

La coagulase est une enzyme extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte et forme un complexe appelé staphylothrombine. La thrombine activée transforme le fibrinogène en fibrine ; si le fibrinogène soluble dans le plasma se transforme en fibrine solide, un caillot apparaîtra au fond du tube indiquant la présence de *Staphylococcus aureus* (Baggett., 2004 ; Singleton., 2005).

#### **Technique :**

- Ajouter 0.5ml du plasma dans un tube contenant 0.5 ml de culture BHIB de la souche à tester.
- Le tube est maintenu à 37°C et est examiné après 1, 2, 3, 4 et 24 heures pour voir si un caillot s'est formé.

#### ✓ **Auxanogramme (Marchal et al., 1991):**

Les milieux destinés à l'étude générale des glucides sont composés :

- D'eau peptonnée
- D'une solution d'indicateur de pH (rouge de phénol) ;
- De sucres en solution (stériles) ;

La lecture est effectuée après 24h d'incubation à 37°C ; le virage au jaune indique l'utilisation des sucres.

#### - *Le test TSI (triple sugar iron) : (Marchal et al., 1991):*

Ce milieu permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, lactose, saccharose, ainsi que la production d'H<sub>2</sub>S. L'ensemencement se fait par stries sur la pente puis par piqure centrale jusqu'au culot à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

- *Détermination de la voie d'attaque du glucose* (Marchal et al., 1991):

Le glucose peut être métabolisé soit par voie fermentaire, où la quantité d'acides est importante, soit par voie oxydative qui ne donne naissance qu'à de petites quantités d'acides. Pour ce test, deux tubes de milieu MEVAG sont ensemencés par piqure centrale, le premier sera incubé tel quel, le second sera recouvert d'une couche de 1 à 1,5 cm d'épaisseur d'huile de paraffine stérile et incubé aussi pendant 24h à 30°C.

- *Recherche de la bêta-galactosidase* (Marchal et al., 1991):

Les bactéries en culture sur milieu nutritif incliné sont mises en suspension avec une solution d'ONPG (ortho-nitro-phényl-galactopyranoside).

Préparer une suspension bactérienne dense et laiteuse dans un tube à hémolyse, puis introduire un disque d'ONPG et incubé à 37°C.

Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une couleur jaune due à la libération du nitrophénol 15 ou 30 min après l'incubation.

- *L'hydrolyse de l'urée* : (Marchal et al., 1991)

L'uréase hydrolyse l'urée en anhydride carbonique et ammoniacque.

1ml du milieu Stuart est inoculé avec une culture prélevée de préférence d'un milieu solide.

Incuber à l'étuve pendant 24h à 37°C.

Lecture : apparition d'une coloration rouge pourpre : uréase positive, pas de couleur : uréase négative.

- ✓ **Etude du métabolisme protidique (Marchal et al., 1991):**

- *Etude de la dégradation des acides aminés* :

Pour étudier la décarboxylation, utiliser généralement le milieu de Moeller.

- Prendre trois tubes contenant le milieu de Moeller avec arginine, ornithine, et lysine sans oublier un tube témoin ;
- Ensemencer chaque tube avec les microorganismes à étudier, puis
- Recouvrir avec une couche d'huile de paraffine stérile et incubé pendant 4 jours à 37°C.

Lecture : coloration violette à pourpre : réaction positive, coloration jaune : réaction négative.



- *Recherche de la gélatinase* : (Marchal et al., 1991)

Dans un tube à hémolyse contenant 0,5ml d'eau physiologique, préparer une suspension épaisse de bactéries, puis plonger une languette de film dont une partie seulement est immergée, boucher le tube pour éviter l'évaporation et incuber à 37°C pendant 4 jours.

- *Recherche de l'acétoïne ou réaction de Voges-Proskauer (VP)* :

Certaines bactéries sont capables de produire de l'acétylméthylcarbinol (AMC ou acétoïne) ; soit directement à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit au cours de la fermentation 2-3-butylène glycolique après passage par l'acétolactate et le diacétyl.

Pour mettre en évidence la production d'acétoïne, deux tubes à hémolyse contenant 0,5ml de bouillon Clarck et Lubs sont ensemencés avec la souche à étudier, l'un servira à rechercher la réaction du RM, l'autre pour la réaction du VP (Neji, 1983).

- *Test du mannitol mobilité* :

Ce milieu permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate en nitrites.

Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil bien droit chargé de la culture à tester puis incuber 18 à 24h à 37°C (Neji, 1983).

### **V.3. Le système API :**

C'est un système standardisé pour l'identification des microorganismes, présentant des spécificités pour chaque groupe microbien (voir tableau) :

## ***Préparation de l'inoculum***

- Réaliser une- pré culture sur milieu solide pendant 18-24 h à 37C° ;
- Vérifier la pureté de chaque souche avant de réaliser le test ;
- Ouvrir une ampoule API Medium (exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de flacon pour casser l'extrémité de l'ampoule)
- Racler une colonie bien distincte pour préparer une suspension bactérienne homogène

## ***Inoculation de la galerie***

- À l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Mediumensemencé.
- Ne remplir que les tubes et non les cupules sans dépasser le niveau du tube pour éviter la formation de bulles au fond des tubes poser la pipette sur le coté de cupule en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant ;
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte.
- incuber à 37C°pendant 18-24h.

## ***Lecture***

Après l'incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture, en ajoutant une goutte de chacun des réactifs suivants :

- ◆ Test VP : VP1 et VP2
- ◆ Test NIT : NIT 1 et NIT 2

## ***Interprétation :***

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

La teneur en eau a souvent été corrélée avec la salinité du sol, Selon une étude réalisée par Grouzis et al en (1977), sur deux plantes halophytes, la teneur en eau augmente avec la salinité du sol, entre 0,05 et 1g/l de NaCl dans le sol, la teneur en eau peut atteindre jusqu'à 16g d'eau par gramme de matière sèche, au-delà, dans les gammes de fortes salinités (3 -35g/l), elle diminue considérablement.

Il est bien établi que la teneur en eau des feuilles est soumise à des variations prononcées au cours du développement des plantes annuelles (Lüttge et al., 1978) et le long du gradient de l'âge des feuilles des plantes vivaces même dans les environnements quasi constants (Herppich, 1989).

Une réduction de la teneur en eau des feuilles peut être observée lors de la sénescence naturelle (Kholodova et al, 2010), ou bien à la suite d'un traitement au sel induisant le passage à la forme de photosynthèse CAM (Herppich et Herppich, 1997).

### I.2 Détermination quantitative des métabolites primaires :

#### I.2.1 Teneur en matière grasse :

L'huile extraite à partir des feuilles séchées de notre plante est de faible quantité, d'une couleur verte pale, et d'une faible odeur.

Nos résultats révèlent que le rendement en huile est de l'ordre de 11,5%, Les résultats retrouvés se rapprochent de ceux signalés par Pasternak et al., en 1985, qui est de 8%.

Notre taux reste deux fois plus important que celui enregistré pour *Mesembryanthemum forsskalei hochst*, par Nadjib et al, en (2004) qui est de 3.09 %, (Figure 20).

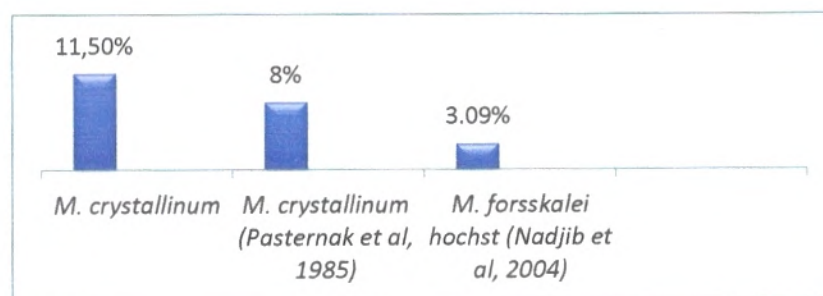
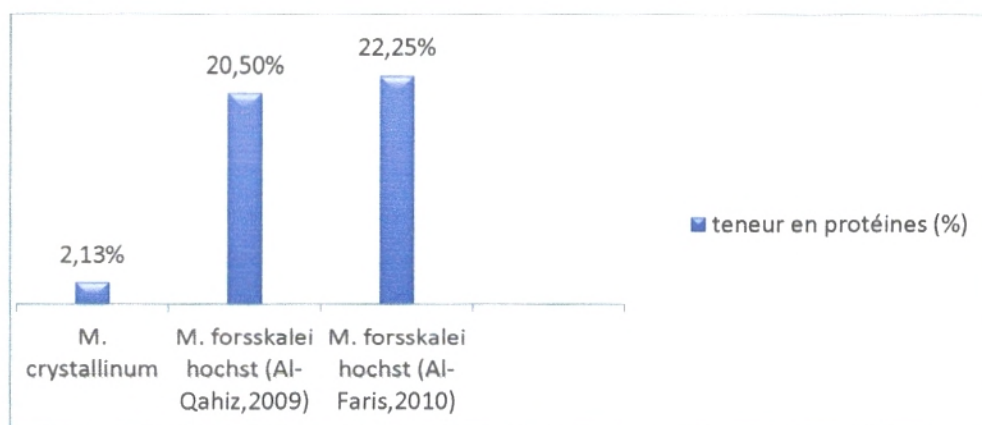


Figure 20 : Teneurs en matières grasses (%) des espèces de *Mesembryanthemum*.

De même, une étude réalisée par Al-Faris en (2010), situe le taux de protéines dans les graines de *M. forsskalei hochst* à 22,25%, cette plante qui a été administrée à des rats rendus diabétiques a montré un effet hypoglycémiant (Figure 21).

Selon Adams et al en (1998), on peut trouver seulement 1,5 mg de protéine soluble par gramme de tissu dans les feuilles de *M. crystallinum*.



**Figure 21 : Teneurs en protéines (en %) des espèces de *Mesembryanthemum*.**

### I.2.3 Teneur en sucres totaux :

Le dosage des sucres totaux de *M. crystallinum*, grâce à la courbe d'étalonnage, montre que cette dernière renferme un faible taux de **4,95 %**.

Notre taux (4,95 %) est relativement inférieur comparé à celui de *Mesembryanthemum forsskalei hochst*, qui a été estimé à 52,75% (Al-Faris et al., 2010). Cette teneur peut atteindre jusqu'à 63,05% (AL-Qahiz, 2009) (Figure 22).

**Tableau 7: Concentration en sucres et en sucres alcool dans la plante de *M. crystallinum* en présence et en absence de 400 mM de NaCl (Adams et al., 1992) en *g.tissu / gwt***

Tissu	Traite- ment	Durée de stress	Sucros e	Glucose	Fructose	Inositol	Pinitol	Polyol inconnus
Feuilles	-NaCl		1,2	5,7	3,9	0,2	<0,1	<0,1
	-NaCl	5jour	1,6	10	7,4	<0,1	<0,1	<0,1
	+NaCl	1jour	1,9	4,5	2,0	1,3	<0,1	<0,1
		3jour	3,5	1,3	1,1	3,8	1,2	Trace
		5jour	2,5	0,7	0,7	2,8	3,3	trace
Racines	-NaCl		1,2	0,3	0,4	0,1	0,1	<0,1
	+NaCl	5jour	1,9	0,5	0,9	0,1	0,6	trace
Cellules de la vessie	+NaCl	Long terme	<0,1	3,9	3,0	0,3	20,2	21,2

### L3 Teneur en cendres (matière minérale):

La détermination de la teneur en cendres peut nous apporter des informations sur la quantité de matières minérales présentes dans notre échantillon. Un résidu bleu clair est resté dans le creuset après séchage au four, révélant une quantité importante de cendres de l'ordre de **41%**.

En effet, les feuilles de *M. crystallinum* renferment une multitude de minéraux, avec des teneurs assez importantes (tableau 8) (Ghnaya et al., 2007).

**Tableau 8 : teneurs en minéraux dans les pousses de *M. crystallinum* (Ghnaya et al., 2007).**

Matière minérale	Teneurs en µg/g de poids sec
Na+	0,1
K+	0,07
Ca <sup>2+</sup>	0,013
N	0,043

### I.4 Détermination de la quantité de métabolites secondaires :

#### I.4.1 Dosage des phénols totaux :

Les teneurs en phénols totaux de notre plante ont été déterminées en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, en se basant sur le fait que les composés phénoliques forment un complexe redox avec les acides phosphotungstiques et phosphomolibdiques de ce réactif. (Singleton et al., 1999 ; Escarpa et Gonzalez., 2001).

La teneur en phénols totaux de *M. crystallinum* déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, est de **1.02 mg** d'acide gallique par gramme de poids sec.

Le taux de phénols totaux retrouvé pour notre plante semble être légèrement inférieur à celui retrouvé par Ksouri et al en (2008), qui a signalé un taux de 1,43 mg GAE/ g DW.

De même pour Falleh et al (2009), notre taux reste toujours inférieur par rapport à ce qu'elle a signalé (1,43 mg GAE/g DW).

Par contre, notre résultat semble très inférieur à celui enregistré par Meot-Duros en 2008, qui a mesuré le taux de polyphénols chez trois plantes halophytes, à savoir : *Eryngium maritimum* avec 16.44 mg GAE/g DW, *Crithmum maritimum* avec 31.93 mg GAE/g DW, et *Cakile maritima* avec 22.24 mg GAE/g DW (figure 23).

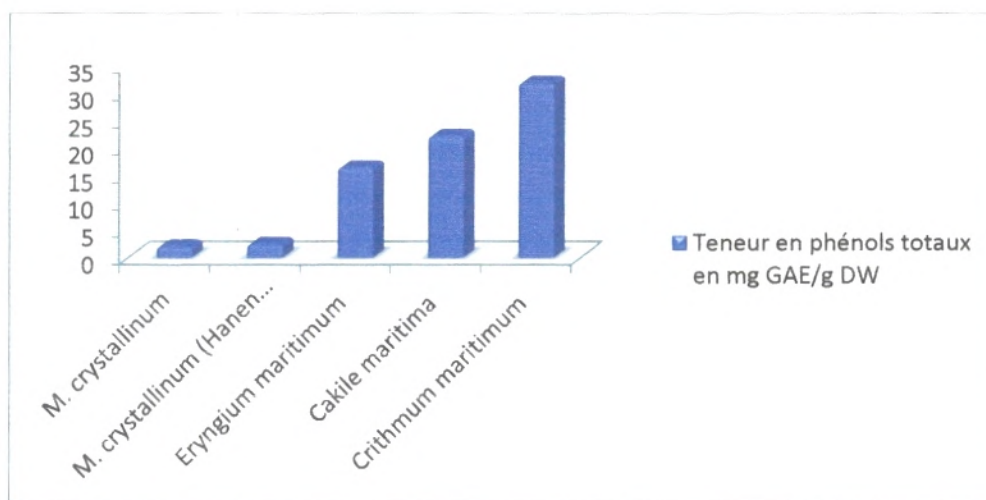


Figure 23 : Teneurs en phénols totaux de différentes espèces halophytes

### I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

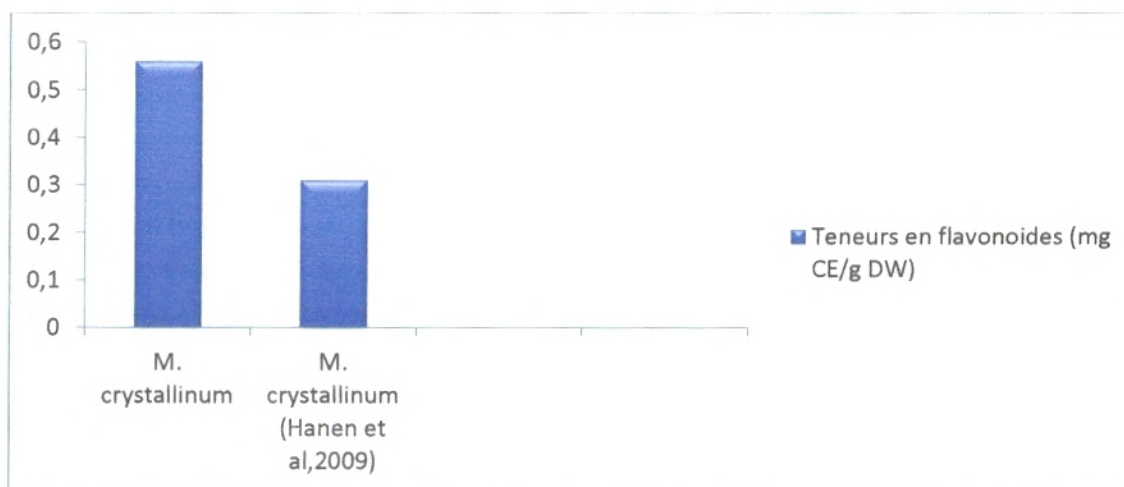
Des dosages spectrophotométriques ont été réalisés à partir des extraits bruts méthanoliques de notre plante, afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (Annexe) a été réalisée avec un extrait de catéchine à une longueur d'onde de 510 nm.

La teneur en flavonoïdes obtenue de la courbe est de **0,19mg** de catéchine/ gramme de poids sec.

La quantité de flavonoïdes totaux enregistrée reste légèrement inférieure par rapport aux taux signalés par Ksouri et al en (2008) et Falleh et al en (2009) qui est de 0,31 mg CE/g DW (figure 24).

On a récemment montré que seules les UVA pouvaient induire la production de bétacyanines et des flavonols glycosides dans les cellules de la vessie épidermique des feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum* (Vogt et al., 1999), cette induction est maximale à des longueurs d'ondes comprises entre 305 et 320 nm (Ibdah et al., 2002).

Ibdah et al, en 2002 ont établi que *M. crystallinum* est très tolérante aux irradiations élevées et aux rayonnements UV. Dans un tel environnement lumineux et rayonnant, elle accumule un ensemble complexe de bétacyanines et de flavonols conjugués dans les cellules supérieures de la vessie épidermique.



**Figure 24: Teneurs en flavonoïdes totaux de *Mesembryanthemum crystallinum***

### **I.4.3 Dosage des tanins condensés :**

La teneur des tanins condensés exprimée en mg de catéchine /gramme de poids sec à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine, a été estimée à **0.04 mg CE/g DW**.

Le contenu en tanins condensés de notre plante se rapproche de celui retrouvé par Ksouri et al en (2008) et Falleh et al en (2009) qui est de 0,06 mg CE/g DW.

### **I.4.4 Dosage des alcaloïdes :**

La teneur en alcaloïdes obtenues à partir des feuilles de *M. crystallinum* est de **4.2%**.

En raison du manque de données concernant la teneur en alcaloïdes de notre plante, nous avons jugé utile de comparer nos résultats avec ceux d'une autre plante appartenant à la même famille (Aizoacées), ainsi la teneur en alcaloïdes mesurée chez *Sceletium tortuosum* était estimée à 1-1.5%, dont la mésebrine à 0.7 % et la mésebrénone à 0.2%, ainsi que le 4'-O- diméthylmésebrénol à faible concentration (Popelak et Lettenbauer, 1967), ce qui veut dire que notre échantillon est plus riche en alcaloïdes.

Les niveaux d'alcaloïdes semblent fluctuer selon les saisons et peuvent être plus élevés en fin de printemps ou au début de l'été, c'est le moment où les plantes sont traditionnellement récoltées pour être utilisées (Smith et al, 1998).

Selon De Smet (1996), Les espèces de *Mesembryanthemum* contiennent les alcaloïdes : mésebrine, et mésebrénine, qui auraient des propriétés hallucinogènes.

### **I.5 Extractions sélectives :**

L'extraction sélective permet de calculer le rendement massique de la plante en composés phénoliques, les résultats illustrés dans la figure 23 nous permettent de constater que la teneur en flavonoïdes est très importantes (14,9 % de matière sèche) par rapport aux autres composés, arrivent après les alcaloïdes avec 4.2 %, et enfin les tanins avec un faible pourcentage de 0,7%.



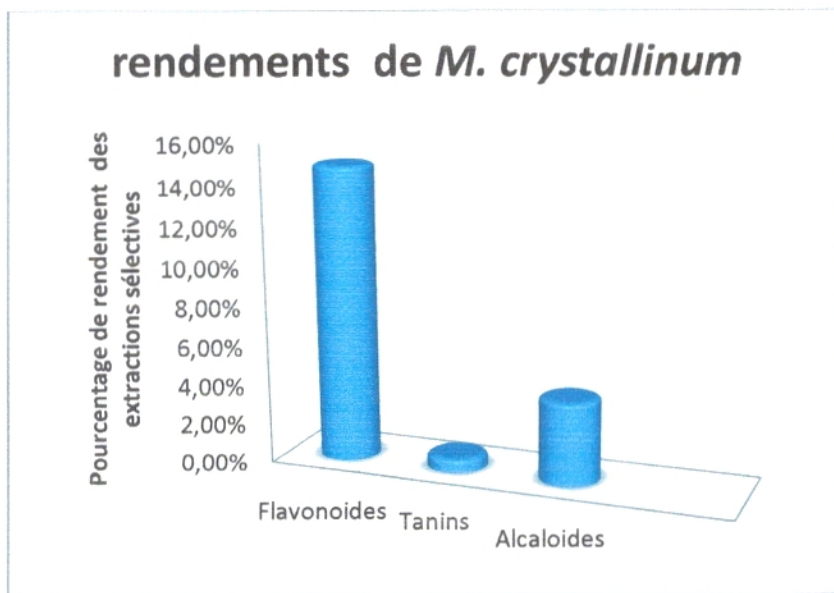


Figure 25 : Pourcentage de rendements des différents extraits de *M. crystallinum*

## II. Activité antimicrobienne :

### II.1 Identification des bactéries :

L'identification des différents genres bactériens a été réalisée en utilisant des tests morphologiques, culturels, physiologiques et biochimiques et les résultats sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 10 : Résultats de tests classiques réalisés pour l'identification d'*E. coli***

Forme	bacille
Gram	-
Mobilité	+
Type respiratoire	Aéro-anaérobie
Production d'indole	+
Production de gaz	+
$\beta$ -galactosidase	+
Acides mixtes	+
Citrate perméase	-
Test mannitol	+
Nitrate réductase	+
Milieu Mevag	Métabolisme fermentaire
Croissance à 44°C	+

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 11: Résultats de l'identification d'*E.coli* par la plaque API 20 E**

Caractère utilisé	<i>E. coli</i>
ONPG	+
ADH (arginine dihydrolase)	-
LDC (lysine décarboxylase)	+
ODC (ornithine décarboxylase)	+
CIT (citrate perméase)	-
H <sub>2</sub> S (production de sulfure d'hydrogène)	-
URE (Uréase)	-
TDA (tryptophane désaminase)	-
IND (Indole)	+
VP (voges-Proskauer)	-
GEL (gélatinase)	-
GLU (glucose)	+
MAN (mannose)	+
INO (inositol)	-
SOR (sorbitol)	+
RHA (rhamnose)	+
SAC (saccharose)	-
MEL (mélbiose)	+
AMY (amygdaline)	-
ARA (arabinose)	+
OX (oxydase)	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 12 : Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification de *P. aeruginosa***

Forme	Gram	Mobilité	Type respiratoire	Catalase	TSI	Milieu Mevag	Gélatinase	Uréase
<i>bacille</i>	-	+	<b>Aérobie strict</b>	+	-	<b>Métabolisme oxydatif</b>	+	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 13 : Résultats de l'identification de *P. aeruginosa* par la plaque API NE**

caractère	<i>P.aeruginosa</i>
NO <sub>3</sub> (réduction des nitrates)	+
TRP (production d'indole)	-
GLU (fermentation du glucose)	-
ADH (arginine dihydrolase)	+
URE (uréase)	-
ESC (esculine)	-
GEL (gélatinase)	+
PNPG (β-galactosidase)	-
GLU (assimilation du glucose)	+
ARA (arabinose)	-
MNE (mannose)	-
MAN (mannitol)	+
NAG (N-acétyl glucosamine)	+
MAL (maltose)	-
GNT (gluconate)	+
CAP (caprate)	+
ADI (adipate)	+
MLT (malate)	+
CIT (citrate)	+
PAC (phényl acétate)	-
OX (oxydase)	+

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 14 : Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification de *S. aureus***

Forme	Gram	Mobilité	Type respiratoire	Catalase	Coagulase	DNase	Phosphatase	hémolyse	Acétoïne	Nitrate réductase
cocci	+	-	<b>Aéro-anaérobie</b>	+	+	+	+	<b>β-hémolytique</b>	+	+

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 15: Résultats de l'identification de *S. aureus* par la plaque API Staph**

Tests	<i>S. aureus</i>
O (control)	-
GLU (glucose)	+
FRU (D-fructose)	+
MNE (mannose)	+
MAL (maltose)	+
LAC (lactose)	+
TRE (D-tréhalose)	+
MAN (D-mannitol)	+
XLT (xylitol)	-
MEL (D-mélibiose)	-
NIT (réduction des nitrates)	+
PAL (phosphatase alcaline)	+
VP (production d'acétoïne)	+
RAF (raffinose)	-
XYL (xylose)	-
SAC (saccharose)	+
MDG ( $\alpha$ -méthyl-D-glucoside)	-
NAG (N-acétyl glucosamine)	+
ADH (arginine dihydrolase)	+
URE (uréase)	+

+ : résultat positif    - : résultat négatif

**Tableau 16 : Résultats des tests classiques réalisés pour l'identification des *Bacillus***

Forme	Gram	Mobilité	Type respiratoire	Test de sporulation	Citrate perméase	Test Mannitol	Nitrate réductase	Gélatinase
<b>bacille</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Aéro- anaérobie facultative</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

+ : résultat positif    - : résultat négatif

**Tableau 17 : Résultats de l'identification des *Bacillus* par la plaque API 20 E :**

Caractère	<i>B.subtilis</i>	<i>B.thuringiensis</i>
ONPG	-	-
ADH	-	+
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	+	+
H2S	-	-
URE	-	-
TDA	-	-
IND	-	-
GEL	+	+
VP	+	+
GLU	+	+
MAN	+	-
INO	+	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	+	+
MEL	+	+
AMY	-	-
ARA	-	-
OX	-	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 18 : Résultats des tests réalisés pour l'identification d'*Enterococcus faecalis***

Forme	Gram	Mobilité	Type respiratoire	Pigmentation	Tellurite* (0,04%)
cocci	+	-	Anaérobie facultative	-	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

**Tableau 19 : Résultats de l'identification d'*Enterococcus faecalis* par la plaque API Strep**

Caractère	<i>E. faecalis</i>
VP (production d'acétoïne)	+
HIP (hippurate)	-
ESC (esculine)	+
PYRA (pyrrolidonyl arylamidase)	+
$\alpha$ GAL ( $\alpha$ -galactosidase)	-
$\beta$ GUR ( $\beta$ -glucuronidase)	-
$\beta$ GAL ( $\beta$ -galactosidase)	-
PAL (phosphatase alcaline)	-
LAP (leucine arylamidase)	+
ADH (Arginine dihydrolase)	+
RIB (ribose)	+
ARA (L-arabinose)	-
MAN (mannitol)	+
SOR (sorbitol)	+
LAC (lactose)	+
TRE (tréhalose)	+
INU (inulin)	-
RAF (raffinose)	-
AMD (amidon)	+
GLYG (glycogène)	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

## II.2 Identification de *Candida albicans* :

Cette identification s'est basée sur l'aspect morphologique et la croissance sur le milieu Sabouraud ; la confirmation de l'espèce a été réalisée sur la plaque API Candida.

**Tableau 20 : Résultats de l'identification de *C. albicans* par la plaque API candida**

Caractère	<i>C. albicans</i>
O (control)	-
GLU (glucose)	+
GLY (glycérol)	-
2KG (2-céto-D-gluconate)	+
ARA (L-arabinose)	-
XYL (D-xylose)	+
ADO (adonitol)	+
XLT (xylitol)	+
GAL (galactose)	+
INO (inositol)	-
SOR (sorbitol)	+
MDG ( $\alpha$ -méthyl-D-glucoside)	+
NAG (N-acétyl-D-glucosamine)	+
CEL (cellobiose)	-
LAC (lactose)	-
MAL (maltose)	+
SAC (saccharose)	+
TRE (tréhalose)	+
MLZ (mélézitose)	-
RAF (raffinose)	-

+ : résultat positif - : résultat négatif

### II.3 Concentrations minimales inhibitrices sur microplaque :

Les résultats des CMI de chaque extrait : phénols totaux, flavonoïdes, tanins et alcaloïdes, sont illustrés dans les tableaux 21, 22, 23 et 24; ainsi que sur les figures 26, 27, 28 et 29 respectivement.



### III. Interprétation et Discussion :

En 2008, Meot-Duros et al, ont rapporté les activités antioxydantes et antimicrobiennes des plantes halophytes, notamment sur les fractions apolaires (chlorophormiques) et les fractions polaires (méthanoliques). Les fractions apolaires se distinguent par un effet plus conséquent par rapport aux fractions polaires, atteignant généralement des CMI comprises entre 1 µg/ml et 100 µg/ml.

Ces métabolites secondaires synthétisés par les végétaux halophytes semblent être actifs sur des microorganismes. Une étude réalisée sur *Tamarix gallica* (plante halophyte), a montré une corrélation directe entre la concentration de l'extrait végétal et la zone d'inhibition dans les tests de diffusion sur milieux gélosés, ainsi la zone d'inhibition moyenne de toutes les bactéries traitées avec *T. gallica* augmente de 0 à 6.5 mm lorsque la concentration augmente de 2 à 100 mg/l (Ksouri et al,2009).

Au vue de nos résultats, l'activité des extraits méthanoliques semble être plus prononcée sur les bactéries que les champignons, ce résultat parait en accord avec celui de Ksouri et al en (2009), cette action sélective pourrait être expliquée par la nature et la structure des molécules actives de chaque extrait (Djeridane et al, 2006).

#### III.1 Les phénols totaux :

Nos résultats montrent que les extraits de polyphénols présentent des CMI relativement importantes avec tout de même un effet plus marqué contre les espèces de *B. subtilis* et *B. Thuringiensis*. A l'inverse des autres extraits testés, la CMI des phénols totaux a diminué pour atteindre 128 µg/ml contre l'espèce *E. feacalis*, ce qui traduit une diversité dans les réactions des différentes souches testées vis-à-vis des polyphénols.

Les composés phénoliques purifiés peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens naturels dans les systèmes alimentaires afin de prévenir la contamination et d'assurer la conservation des denrées alimentaires (Ksouri et al, 2009).

Plusieurs études ont attribué l'effet inhibiteur des extraits de plantes contre les bactéries pathogènes, à leur composition phénolique (Baydar et al, 2004; Rodriguez vaquero et al, 2007).

L'effet inhibiteur de ces composés phénoliques pourrait être expliqué par :

- ✓ l'adsorption aux membranes cellulaires,
- ✓ L'interaction avec les enzymes et les substrats, et
- ✓ La privation d'ions métalliques (Scalbert, 1991).

Toutefois, ces activités antimicrobiennes pourraient être la résultante de différentes interactions synergiques entre les polyphénols (Djeridane et al, 2006).

L'acide gallique et la catéchine ont été étroitement corrélés à l'activité de chélation des métaux et à l'inhibition de la peroxydation lipidique (Tsai et al, 2007) ; en outre, la catéchine, la quercétine et l'acide gallique ont été décrits pour leurs propriétés antibactériennes, ils ont une activité plus élevée contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus* (Rodriguez vaquero et al, 2007).

D'autres composés tels que l'acide vanillique possèdent en plus d'une activité antimicrobienne, un effet hépatoprotecteur (Singh et al, 2006).

### III.2 Les flavonoïdes :

Les résultats obtenus montrent que certains de nos extraits ont présenté une activité antibactérienne, cet effet a été accentué avec les flavonoïdes inscrivant une CMI très faible (0.5 µg/ml) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (S.a1). Cet extrait a été moins actif sur *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* enregistrant respectivement des CMI de l'ordre de 512 µg/ml, et de 256 µg/ml.

Ces résultats semblent être comparables à ceux rapportés par Kuete et al (2011), parmi les flavonoïdes testés, la Bartéricine a exprimé une activité remarquable générant une CMI de 64 µg/ml contre *E. coli* ATCC 8739, alors que la CMI des autres molécules (Quercétine, Kaempférol, Stipuline, Angusticornine, et 4-Hydrxylonchocarpine), fluctue entre 128 µg/ml et + 256 µg/ml vis-à-vis de deux souches de *P. aeruginosa* (PA01 et PA124).

La souche de *B. subtilis* testée dans ce travail, a présenté une CMI de 128 µg/ml. Ce résultat ne concorde pas avec celui enregistré par Van Der Watt, qui a signalé en 2001, une activité plus importante de l'acide ferulique, un flavonoïde extrait d'une plante *Carpobrotus edulis* appartenant à famille des *Aizoacea*, contre cette même espèce.

Les flavonoïdes semblent être relativement plus actifs contre les bactéries à Gram (+), ces résultats peuvent être expliqués par la différence structurelle de ces micro-organismes ; en effet, la quantité de lipides dans les membranes des bactéries à Gram (-), est plus importante que celle des bactéries à Gram (+), ainsi le dihydroxyflavone, l'un des composés les plus lipophile peut être piégé dans la paroi cellulaire des bactéries à G (-), tandis qu'il peut passer à travers celle de *S.aureus* ; ce qui semble expliquer pourquoi il est plus actif.

### III.3 Les tanins :

Nos résultats situent l'action des tanins dans un intervalle de CMI compris entre 4 et 256 µg/ml, *Staphylococcus aureus* (Sa.1) a été la souche la plus sensible à l'effet des tanins (4µg/ml) ; et la plus faible activité a été enregistrée contre *E. feacalis* (256 µg/ml), ces CMI se rapprochent de celles signalées par Scalbert et al, qui varient entre 12 et 1000 µg/ml.

L'activité des tanins est semblable à celle des flavonoïdes pour la souche (S.a1) (2µg/ml).

- 1- Les différents mécanismes proposés jusqu'à présent pour expliquer l'activité antimicrobienne des tannins consistent en l'inhibition extracellulaire des enzymes microbiennes, la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne ou l'action directe sur le métabolisme microbien par inhibition de la phosphorylation oxydative. Un autre mécanisme impliquant la privation du fer est proposé (Hamilton, 1971).
- 2- *Astringence, inhibition des enzymes et privation du substrat* : les mécanismes de toxicité des tanins sont liés à leurs caractéristiques physicochimiques dont leur astringence. En effet, ce caractère astringent peut induire la complexation avec les enzymes ou les substrats ; beaucoup d'enzymes microbiennes sont inhibées quand des filtrats de cultures brutes ou des enzymes purifiées sont mélangés avec des tanins.

Le même mécanisme basé sur l'astringence peut aussi expliquer la réduction de la virulence de certains virus comme celui du tabac ou l'herpès ou le virus simplex.

- 3- *Action sur les membranes : l'action des tanins sur les bactéries pourrait être similaire à celle des phénols synthétiques (exemple le diphényle et le diphényle-alcane comme l'hexachlorophène), ces composés qui sont utilisés comme désinfectants (Hamilton, 1971).*

Il est à noter que pour gagner la membrane, les tanins doivent traverser la paroi cellulaire des bactéries, cette paroi constituée de différents polysaccharides et protéines, fixe probablement une partie des tanins. Cette fixation pourrait contribuer à une augmentation de la CMI.

- 4- *Privation d'ions métalliques : un autre mécanisme de toxicité pourrait impliquer la complexation d'ions métalliques par les tanins. Les systèmes biologiques y compris les microorganismes sont fortement tributaires de l'état d'ions métalliques dans l'environnement ; l'activité antimicrobienne par carence en fer est particulièrement bien documentée, par exemple l'infection des humains par *E. coli* est inhibée par chélation de la lactoferrine par le fer présent dans le lait maternel, mais elle est rétablie par un excès en fer (Hamilton, 1971).*

### **III.4 Les alcaloïdes :**

À l'exception d'*E. faecalis*, les alcaloïdes ont exprimé une inhibition de toutes les souches testées à une CMI de 256 µg/ml.

L'extrait a montré une activité moyenne par rapport aux autres souches : *S. aureus* (S.a1, S.a2), et *E. coli* (E.c) ont une CMI de 32µg/ml, tandis-que les deux espèces de *Bacillus* (*B.subtilis* et *B.thuringiensis*) ont une CMI plus importante atteignant 128 µg/ml.

L'espèce de *C. albicans* a exprimé un niveau élevé de résistance qui a concerné non seulement les alcaloïdes (256 µg/ml), mais aussi les autres extraits. Ce résultat pourrait être expliqué par la différence entre les mécanismes de résistance propres aux procaryotes et les eucaryotes. Les mécanismes de résistance mis en place par certaines souches de champignons sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent soit sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires impliqués dans un rejet actif de l'antifongique (Accoceberry et Noël, 2006).

D'autres études ont signalé l'activité antimicrobienne puissante des alcaloïdes ; ainsi, Mitscher et al (1972), ont déterminé l'effet antimicrobien de 41 alcaloïdes sur *S.aureus*, *E.coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, et *C.albicans*, et parmi ces molécules testées, les Benzyl-isoquinoleine ont été les plus efficaces.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* montre une forte CMI de 256 µg/ml vis-à-vis des quatre extraits végétaux. Cette CMI est relativement supérieure à ce qui a été signalé par Kuete et al (2011), qui a testé deux alcaloïdes : la Norcassaïde et la Norerythroaveolide, enregistrant des CMI allant de 64 à 128 µg/ml.

Cette espèce connue pour sa résistance a développé plusieurs mécanismes de résistance : en plus de son imperméabilité, elle utilise le système d'efflux actifs, dans lequel, après avoir permis à la molécule de pénétrer, la bactérie procède à son extrusion moyennant une dépense énergétique.

Une étude réalisée par Kuete et al, en (2011), a démontré qu'à l'origine d'une résistance des bactéries à Gram négatif aux composés naturels, l'existence des pompes à efflux : Acrab-TolC ou Mex AB-OprM,. Ces chercheurs ont signalé le rôle clé des mécanismes d'efflux contre plusieurs composés phénoliques et alcaloïdes et, par conséquent, indiquent que l'inhibition de pompes à efflux par des produits chimiques appelés EPI (efflux pump inhibitor) comme le phénylalanine arginine β-naphthylamide (PAβN) et les dérivés du 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, quinoline, pourraient améliorer sensiblement leur puissance antimicrobienne.

L'activité combinée entre deux composés naturels est possible, c'est le cas des terpénoïdes (diterpénoïdes et triterpénoïdes) qui sont de pauvres composés antimicrobiens, mais associés à deux alcaloïdes (Norcassaïde et norerythroaveolide), ceux-ci amplifient leur activité antimicrobienne (Kuete et al, 2011).

Tableau 21 : Résultats des CMI des phénols totaux :

<b>B.s</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>B.t</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>S.a1</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>S.a2</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>E.c</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>P.s</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>E.f</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C.a</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Concentration (µg/ml)</b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>

+ : croissance

- : absence de croissance

- B.s : *Bacillus subtilis*
- B.t : *Bacillus thuringiensis*
- S.a1 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- S.a2 : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862
- E.c : *E. coli* ATCC 25922
- P.s : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- E.f: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- C.a: *Candida albicans* 33210
- 

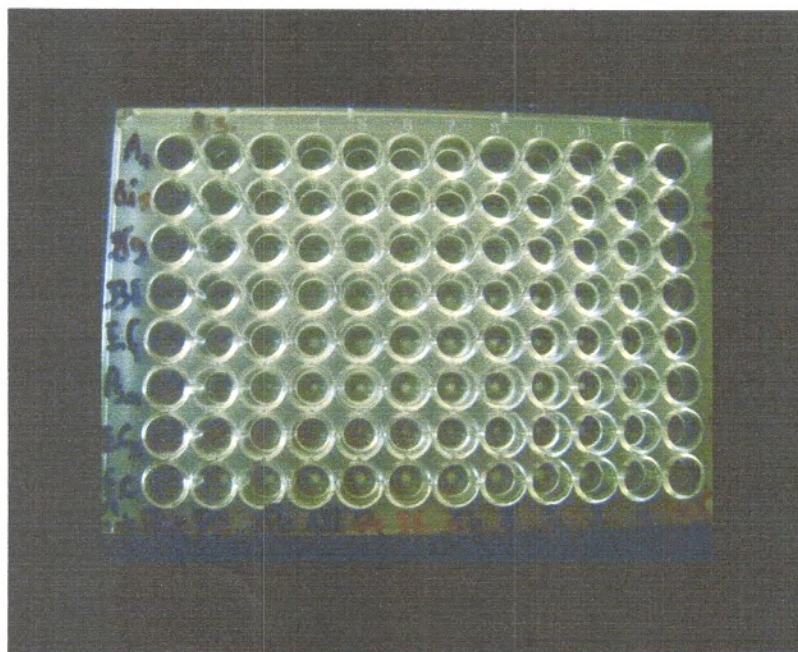


Figure 26 : Résultats de la CMI des phénols totaux

Tableau 22 : Résultats des CMI des flavonoïdes :

B.s	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B.t	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S.a1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.a2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E.c	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P.s	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.f	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.a	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Concentration (µg/ml)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5

+ : croissance

- : absence de croissance

- B.s : *Bacillus subtilis*
- B.t : *Bacillus thuringiensis*
- S.a1 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- S.a2 : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862
- E.c : *E. coli* ATCC 25922
- P.s : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- E.f : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- C.a : *Candida albicans* 33210

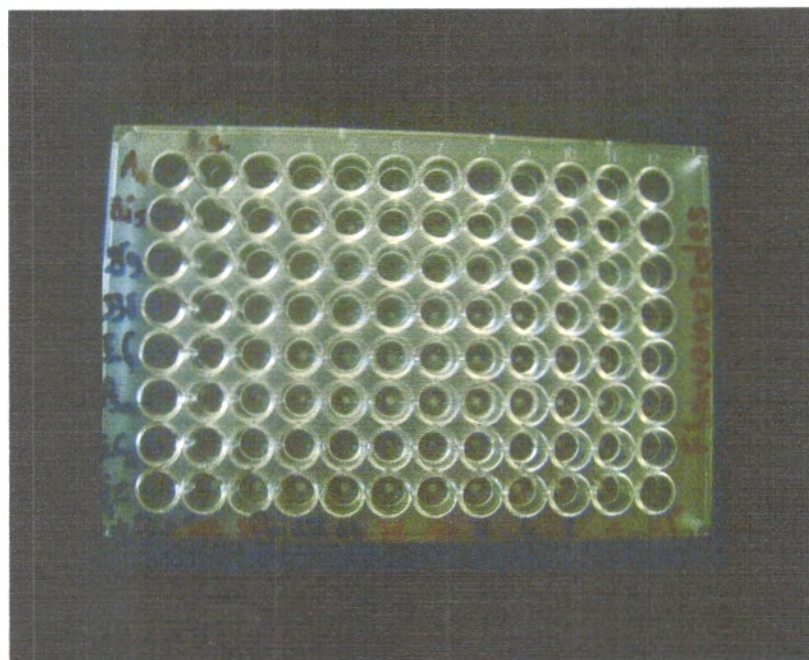


Figure 27 : Résultats de la CMI des Flavonoïdes

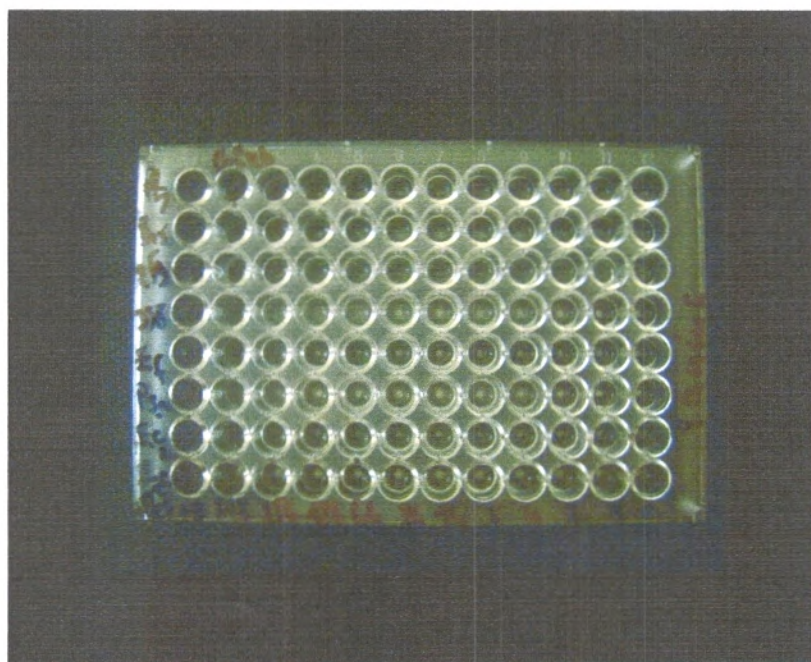
**Tableau 23 : Résultats des CMI des tanins**

<b>B.s</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>B.t</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>S.a1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>S.a2</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>E.c</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>P.s</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>E.f</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C.a</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Concentration (µg/ml)</b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>

**+** : croissance

**-** : absence de croissance

- **B.s** : *Bacillus subtilis*
- **B.t** : *Bacillus thuringiensis*
- **S.a1** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- **S.a2** : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862
- **E.c** : *E. coli* ATCC 25922
- **P.s** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- **E.f** : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- **C.a** : *Candida albicans* 33210



**Figure 28 : Résultats de la CMI des tanins**



Tableau 24 : Résultats des CMI des alcaloïdes

<b>B.s</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>B.t</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>S.a1</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>S.a2</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>E.c</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>P.s</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>E.f</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C.a</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Concentration (µg/ml)</b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>

+ : croissance

- : absence de croissance

- **B.s** : *Bacillus subtilis*
- **B.t** : *Bacillus thuringiensis*
- **S.a1** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- **S.a2** : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862
- **E.c** : *E. coli* ATCC 25922
- **P.s** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- **E.f** : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- **C.a** : *Candida albicans* 33210

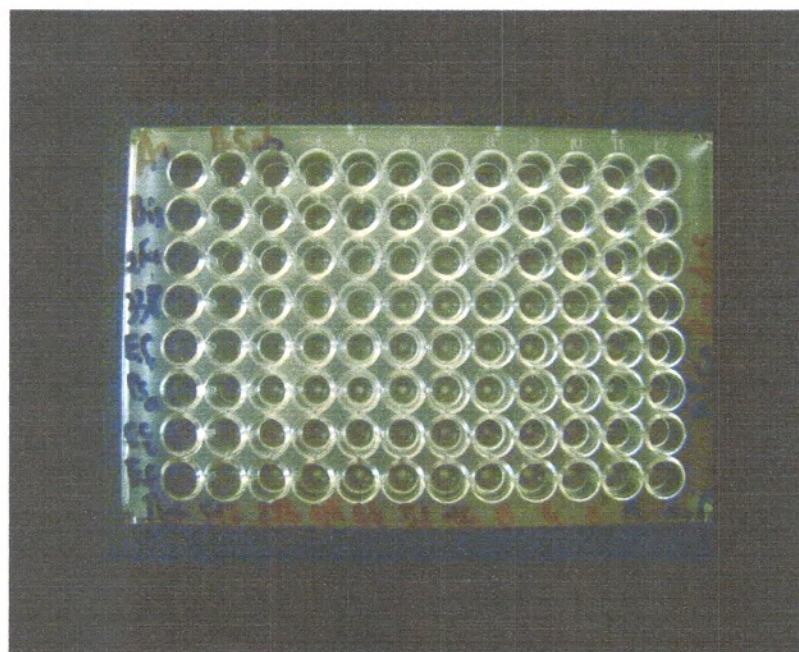


Figure 29 : Résultats de la CMI des alcaloïdes

# Conclusion

## Conclusion :

Le présent travail a mis en évidence la composition chimique de la plante halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* et nous a permis de conclure que celle-ci était très riche en eau avec un taux d'humidité assez élevé égal à **93,32%**, ce qui concorde avec son appartenance aux plantes succulentes, et qu'elle possède une quantité considérable de cendres atteignant un taux de **41%**.

La détermination de la composition de cette plante a révélé la présence de :

- ✓ Métabolites primaires avec un taux de matière grasse de **11,5%**, un faible taux de protéines de **2,125 %**, et une teneur en sucres totaux égale à **4,95%**.
- ✓ métabolites secondaires avec les phénols totaux à une concentration de **1.02 mg GAE/g DW**, les flavonoïdes à **0,19 mg CE/g DW**, et les tanins condensés à **0.04 mg CE/g DW**.

Par ailleurs, L'extraction sélective des métabolites secondaires nous a permis de constater que les rendements massiques des flavonoïdes (**14,9%**) et des alcaloïdes (**4.2%**) sont relativement élevés par rapport aux tanins (**0,7%**).

Le pouvoir antimicrobien des extraits phénoliques de *Mesembryanthemum crystallinum* a permis de montrer que les flavonoïdes possèdent une activité plus importante comparée à celle des autres extraits.

Cette activité a été relativement accentuée contre la souche de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) enregistrant respectivement des CMI de : **0,5 µg/ml**, **4µg/ml**, **32µg/ml**, et **256µg/ml** pour les flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et phénols totaux.

De même, Les alcaloïdes ont été actifs sur toutes les souches mais avec des CMI plus élevées (**256 µg/ml**), à l'exception d'*E. faecalis*.

Par contre, les phénols totaux ont exprimés une activité relativement faible caractérisée par des fluctuations de CMI allant de **64 µg/ml** à **512 µg/ml**, pour les deux souches de Bacillus (*B. subtilis* et *B. thuringiensis*).

Concernant les tanins, leur activité a été caractérisée par des CMI situées entre **4 µg/ml** (*S. aureus* ATCC 25923), et **256 µg/ml** (*E. feacalis* ATCC 29212).

La souche de *Candida albicans* a été la plus résistante vis-à-vis de l'ensemble des extraits testés, ce qui peut être expliqué par la différence entre les mécanismes de résistance des bactéries et des levures.

Ces résultats mériteraient d'être confirmés par d'autres tests en essayant d'explorer à la fois le ou les constituants flavoniques qui sont à l'origine de ce pouvoir par des techniques de chromatographie, et de rechercher d'autres activités biologiques comme l'activité antioxydante car les plantes halophytes sont une source très importante de composés antioxydants ; en raison de la présence de composés bioactifs dans leurs tissus, elles peuvent être utilisées intensivement à des fins médicales, cosmétiques et industriels.

# **Références bibliographiques**

### A

- **Accoceberry I & Noël T.(2006). Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* 61 (3): 195-199.**
- **Adams P., Nelson D.E., Yamada S., Chmara W., Jensen R.G., Bonhert H.J., Griffiths H. (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae), *new phytol.* 138, 171-190.**
- **Adams P., Thomas J., Vernon D., Bonhert H., Jensen R (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant cell physiol.* 33(8): 1215-1223.**
- **Agarie.S, Shimoda. T., Shimizu.Y., Baumann. K., Sunagawa. H., Kondo. A et al (2007). Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Experimental Botany* 58 (8): 1957-1967.**
- **Agarie S., Kawaguchi A., Kodera A., Sunagawa H, Kojima H., Nose A et Nakahara T (2009). Potential of the Common Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a New High-Functional Food as Evaluated by Polyol Accumulation. *Plant Prod. Sci.* 12(1): 37-46.**
- **Al-Faris N.A., Al-sawadi A.D., Alokail M.S (2010). Effect of samh seeds supplementation (*Mesembryanthemum forsskalei Hochst*) on liver enzymes and lipid profiles of streptozotocin (STZ)-induced diabetic Wistar rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 23–28.**
- **Al Fatimi M., Wurster M., Schroder G., Lindequist U., (2007). Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 657-666.**
- **Al-Qahiz N.M (2009). The impact of samh seeds on blood parameters of experimental animals. *Pakistan Journal Of Nutrition* 8(6):872-876.**
- **Ashihara, H. and Crozier, A. (2001) Caffeine: a well-known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.*, 6, 407–413.**
- **Audigie C.L., Figarelle J., ZonsZani F ; (1980). Manipulation d'analyses biochimiques. Ed Doin. Paris, pp 88-97.**

### B

- Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K. (2004). Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*, 189:1565-1573.
- Balch, P.A. and Balch, J.F. (2000). Prescription for nutritional healing. Penguin Putnam Inc., New York. 42-53.
- Baydar, N.G., Özkan, G., Sagdiç, O., (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grapes (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15, 335-339.
- Bejaj Y.S., (1999). La biotechnologie dans l'agriculture des forets 24. Les plantes médicinales et aromatiques V. Springer, 79-85.
- Bekhechi C. (2001-2002). Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (*nûnkha*) de la région de Tlemcen, et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de Magister. Université de Tlemcen ; Faculté des sciences.
- Benarous K. (2007). Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes:  $\alpha$ -amylase et lipase. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie. Université Amar Telidji, Laghouat.
- Bernard B., (2001). Plantes médicinales du monde, réalité et croyance. Ed Estem, 105-107, 349-350.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G. (1995) Adaptations to environmental stress. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Bohert, H.J. and Jensen, R.G. (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Tibtech*. 141, 89-97.
- Bohnert Laboratories. (2002). Stages of Development in *Mesembryanthemum crystallinum*.
- Bohnert Laboratories. (2003) *Mesembryanthemum*.
- Bohnert, H.J. et Cushman, J.C. (2000). The Ice Plant Cometh: Lessons in abiotic Stress Tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 334-346.
- Bohnert, H.J. et Shen, B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sci. Hort.* 78 : 237-260.

## Références bibliographiques

---

- Bouanoun D., Hilan C., Garbetg F., Sferi F., (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula boisa*. *Phytothérapie* 5 : 129-134.
- Bouftira I, Abdely C. and Sfar S. (2007). Identification of a naturally occurring 2, 6-bis (1.1- dimethylethyl)-4-methylphenol from purple leaves of the halophyte plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (9), pp. 1136-1139.
- Bouftira I, Abdely C., Sfar S., (2008). Characterization of cosmetic cream with *Mesembryanthemum crystallinum* plant extract: influence of formulation composition on physical stability and antioxidant activity. *Int.J.Cos. Sci.* 30, 443-452.
- Bouftira I, Mgaidi I, and Sfar S (2010). Dosage of 2,6-Bis (1.1-Dimethylethyl)-4-Methylphenol (BHT) in the Plant Extract *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2010, Article ID 142486, 5 pages.
- Brunneton J., (1993). *Pharmacognosie et phytochimie; plantes médicinales*. Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition. Paris. p 278-279.
- Brunet J., (1999). *Pharmacognosie-phytochimie-plantes médicinales : Techniques et documentation*. Lavoisier 3<sup>ème</sup> édition. Paris, p 369-388.

### C

- Chaieb M., Boukhris M., (1998). *Flore succincte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie*. Association pour la protection de la nature et de l'environnement, Sfax, Tu.
- Chiera J.M., Streeter J.G., Finer J.J (2006). Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the inositol methyl transferase gene from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Science* 171 : 647-654.
- Chopra R.N., Nayar S.L., Chopra I.C (1986). *Glossary of Indian medicinal plants (including the supplement)*. Council of scientific and industrial research, New Delhi, 54, 358-365.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1250-1318.



## Références bibliographiques

---

- Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., (2006). Secondary metabolites: occurrence, structure and role in human diet. Blackwell Publishing Ltd, p 13-33.
- Cunningham, G.M., Mulham, W.E., Milthorpe, P.E. and Leigh, J.H. (1981). Plants of Western New South Wales. Soil Conservation Service of New South Wales.
- Cushman J.C., Bonhert H.J. (2002). Induction of crssulacean acid metabolism by salinity-molecular aspects, in Lauchli A & Lutge U (Eds), salinity: environment-plants-molecules, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp, 361-393.

### D

- Dauguet J.C., Foucher J.P., (1982). Plantes médicinales et phytothérapies. L'actualité chimique 16 (3):185-191.
- Deba F., Xuan T.D., Yasuda M., Tawata S., (2008). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, antifungal activities of the essential oils from *bidens pilosa linn.* Var. *radiata*. Food control 19, 346-352.
- Demmig, B. et Winter, K. 1986. Sodium, potassium, chloride and proline concentrations of chloroplasts isolated from a halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta 168 : 421-426.
- De Smet P.A.G.M.(1996). Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens. Journal of Ethnopharmacology 50 :141-146.
- Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H., (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food Chem.50, 3010-3014.
- Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edn. JohnWiley and Sons, Chichester.
- Djeridane A., Yousfi M., Nedjmi D., Boutassouna D., Stocker P., Vdal N. (2006). Antioxidant activity of some medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry 97:654-660.
- Dubois M.K.A., Gilli Y.K., Hamilton P.A., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. And chem. Jour; vol.28 pp 350-356.

### E

- Elgasim, E.A., Al-Wesali, M.S., (2000). Water activity and Hunter colour values of beef patties extended with Samh (*Mesembryanthemum forsskalei* Hochst) flour. Food Chem. 69, 181-185.

- Escarpa A., Gonzalez M.C., (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta* 427: 119-127.

### F

- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 29–66.
- Falleh, H., Ksouri, R., Oueslati, S., Guyot, S., Magné, C., & Abdelly, C. (2009). Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2308–2313.
- Forkmann, G. and Heller, W. (1999). Biosynthesis of flavonoids , in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1 (eds D. Barton and K. Nakanishi) Elsevier, Amsterdam, pp. 713–748.
- Foster S., Hobbs C., et Peterson R. T., (2002). *A Field Guide to Western Medicinal Plants and Herbs*, Peterson Field Guides, Mifflin, Pa, USA.

### G

- Gacch- Terrak R. & Rahmania F., (2003). Etudes comparative des acides phénols chez deux cultivars de palmier dattier, un résistant (tkerboucht) et l'autre sensible (deglet noir) à la fusariose. Journée scientifiques du réseau biotechnologique (amélioration des plantes et sécurité alimentaire) de l'agence universitaire de la francophonie. Marrakech, Maroc, 255-256.
- Galvi L., Mwalogo G.J., WingiraB.A.M., Reedl B., Shilds J.A., (1995). Characterization of wattle-tannin-based adhesives for Tanzania. 49 (2).
- Gericke N.P., Van Wyk B.E., (2002). Pharmaceutical compositions containing Mesembrine and related compounds. *Frican natural health* US 6,288,104 B1.
- Ghnaya T, Slama I, Messedi D, Grignon C, Ghorbel M.H, Abdelly C (2007). Effects of Cd<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: Consequences on growth. *Chemosphere* 67: 72–79.
- Griffin, W.J. and Lin, G.D. (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, 53, 623–637.

## Références bibliographiques

---

- Grouzis M., Heim G et Berger A. (1977). Croissance et accumulation de sels chez deux salicornes annuelles du littoral méditerranéen. *Ecol. Plant.*, 12 : (4), 307-322.
- Guignard J.L., (2000). *Biochimie végétale*, 2<sup>ème</sup> édition ; Paris, 171-174.
- Gulçin I., Kufrevioglu I., Oktay M., Büyükkokuroglu M.E. (2004). Antioxydant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). *Journal of Ethnopharmacology* 90, 205-215.

### H

- Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347–369.
- Hamilton, W. A. (1971) in *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. Hugo. W. B., ed., p. 77. Academic Press, London.
- Hamslane J. (1995). Complexation and oxidative transformation of polyphénols. In *EDA Scalbert; polyphénols 94*. Palma de Mallorca. Les collègues de l'INRA, 45-55.
- Harikrishna D & Prabhaber M.C., (2004). Pharmacological investigation of prunio-6-o-p-coumarate: flavonoids, glycoside. *Indian Journ. Pharmacol* 36 (4), 244-250.
- Henry Guerlac., (1961). The back ground and origin of his first experiment on combustion. Ed Lavoisier.
- Herppich, M., von Willert, D.J. and Herppich, W.B. (1995). Diurnal rhythm in citric acid content preceded the onset of nighttime malic acid accumulation during metabolic changes from C3 to CAM in salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* 147: 38-42.
- Herppich W. B. and Herppich M. (1997). Influence of leaf water content on the C3-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol* 136: 425-432.

### I

- Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H. K., Heller, W., Strack, D. & Vogt, T. (2002). Spectral dependence of flavonols and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *Plant Cell Environ.*, 25, 1145–1154.

### J

- Jessop, J.P. (1986). Family – *Aizoaceae (Ficoidaceae, Mesembryanthemaceae, Molluginaceae, Tetragoniaceae)*. In Jessop, J.P. and Toelken, H.R. (Eds) *Flora of South Australia Part I, Lycopodiaceae –Rosaceae*. South Australian Government Publishing Division, Adelaide.

## Références bibliographiques

---

- Joffin J.N, Leyral G, 2001. **Microbiologie technique: 1- Dictionnaire des techniques. 3ème éd. Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 320p.**
- John K. (2000). **Biota Of North America Project (BONAP), University of North Carolina.**

### K

- Kehrer J.P., Smith C.V. (1994). **Free radicals in biology: sources, reactivates and roles in the etiology of human diseases in natural antioxydants in" human health and diseases". FREIB. Academic press. Boston (Massachusetts), 107-108.**
- Keiller D. R., Paul M. J., Cockburn W. (1987). **Regulation of reserve carbohydrate metabolism metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C3 and CAM photosynthesis. New Phytol. 107: 1-13.**
- Kholodova, V.P., Neto, D.S., Meshcheryakov, A.B., Borisova, N.N., Aleksandrova, S.N. and Kuznetsov, Vl.V. (2002). **Can stress-induced CAM provide for performing the developmental program in *Mesembryanthemum crystallinum* plants under long-term salinity. Russian Journal of Plant Physiology 49, 336-343.**
- Kholodova, V., Volkov, K., Abdeyeva, A., Kuznetsov, V (2010). **Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress, *Environmental and Experimental Botany*; doi:10.1016/j.envexpbot.2011.02.007.**
- Kimler, L., Mears, J., Mabry, T.J. and Rösler, H. (1970). **On the question of the mutual exclusiveness of betalains and anthocyanins, Taxon, 19, 875–878.**
- Kjeldahl. J; (1883). **Menu Methode Zur Bestimmung des stiktoffs in organischem Korpen. Z. Anal. Chem., Vol 22 pp 366-382.**
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., and Mol, J.N.M. (1994). **The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16, 123–132.**
- Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C., (2008). **Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C.R. biologies 331, 865-873.**
- Kuete V., Alibert-Franco S., Eyong K.O, Ngamenid B., Folefoc G.N, Nguemevinge J.R. et al; (2011). **Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. International Journal of Antimicrobial Agents 37 :156–161.**

## Références bibliographiques

---

### L

- Lecoq (1965). Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles.
- Levine, B.S., Rodman, J.S., Wienerman, S., Bockman, R.S., Lane, J.M. and Chapman, D.S. (1994). Effects of calcium citrate supplementation on urinary calcium oxalate saturation in female stone formers: Implications for prevention of osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 60 : 592-596.
- Lüttge, U., Fischer, E., and Steudle, E. (1978). Membrane potentials and salt distribution in epidermal bladders and photosynthetic tissue of *Mesembryanthemum crystallinum* L., *Plant Cell and Environ.* 1, 121-129.

### M

- Mabry, T. J. (2001). Selected topics from forty years of natural products research: betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. *J. Nat. Prod.*, 64, 1596–1604.
- Marchal N, Bourdon J.L, Richard C.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin.
- Marfak A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux libres des alcools. Thèse de doctorat, université de Limoges ; Faculté de pharmacie, p 220.
- Meot-Duros L, Le Floch G, Magné C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 258–262.
- Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-Kwinta R., Luttge U., Ratajczak R. (1998). Subcellular localization and stress response of superoxide dismutase isoform from leaves in the C3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *plant cell environ.* 21, 169-179.
- Mitscher, L.A., Leu, R. P., Bathala, M. S., Wu, W.N., Beal, J. L. and White, R. (1972) *Lloydia* 35, 159.

### N

- Nadjib H., Al Dosari M.N., Al-Wesali, (2004). Use of samh seeds in the laying hen diets. *Int J Poult Sci.* 3:287-294.
- Neji O; (1983). Manuel pratique de microbiologie générale. Tome 1.

## Références bibliographiques

---

- Niewiadomska E., & Miszalski Z. (2008). Partial characterization and expression of leaf catalase in the CAM-inducible halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *plant physiology and biochemistry* 46, 421-427.
- Niewiadomska E., & Miszalski Z., Slesak I., Ratajczak R. (1999). Catalase activity during C3-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. leaves. *Free Radic, Res*, 31, S251-S256.
- Nouairi I, Ghnaya T, Ben Youssef N, Zarrouka M, Ghorbel M.H. (2006). Changes in content and fatty acid profiles of total lipids of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum* under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 163 :1198—1202.

### O

- Ober, D., Harms, R., Witte, L. et al. (2003) Molecular evolution by change of function. Alkaloid specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 278, 12805–12812.

### P

- Pak, C.Y. (1987). Nephrolithiasis from calcium supplementation. *J. Urol.* 137: 1212-1213.
- Pasternack, D., Danon, A., Aronson, J.A. & Benjamin, R.W. 1985. Developing the seawater agriculture concept. *Plant and Soil* 89: 337-348.
- Pierpoint, W.S. (2000). Why do plants make medicines. *Biochemist*, 22, 37–40.
- Plants for a Future - Species Database. (1997-2003) *Mesembryanthemum crystallinum*. Australian National Herbarium.
- Price M.L., Van Scoyoc S. & Butler L.G., (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26:1214-1218.
- Poly MC. (2007). Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique. In Francois Denis., Marie Cécile poly. Christian Martin., Edouard Bingen., Roland Quentin. *Bactériologie Médicale : Techniques usuelles*, 38 : Ed Masson.
- Popelak A., Lettenbauer G. (1967). Alkaloids. Vol 9, p. 467-82, Academic Press.

### Q

- Quezel P. (1986). Les grandes structures de végétations en régions méditerranéenne; facteurs déterminants dans leur mise en place post-glaciaire. *Geobios*, 32, 1 : 19-32 Villeurbanne 990.

### R

- Rai M., Mares D., (2003). Antimycotic activity of essential oils in plants derived, *Antimycotics Current Trends and Future Prospects*. (eds) Food Products Press, London UK, pp 307-320.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichorn S., Bouharmont J., (2003). Edition De Boeck Université. ISBN 2-7445-0102-6.
- Rocio M.C., Rios J.L., Villar A, (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy research*. Vol3. N°4.117.
- Rodriguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C., (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18, 93–101.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity, *Plant Physiology*, 113, 175–179.
- Ruiz G ; (2005). Extraction, détermination structurale, et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges, discipline : Chimie appliquée, chimie de substances naturelles, pp 258.

### S

- Sanada, Y., Ueda, H., Kuribayashi, K., Andoh, T., Hayashi, F., Tamai, N. and Wada, K. 1995. Novel light-dark change of proline levels in halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. and glycophytes *Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L. leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol*. 36 : 965- 970.
- Schmeller, T. and Wink, M. (1998). Utilization of Alkaloids in Modern Medicine. In M.F. Roberts, and M.Wink (eds), *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York, pp. 435–459.
- Scalbert, A., (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 12, 3875-3883.

## Références bibliographiques

---

- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Singh, R.A.K., Mehrotra, S., (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 67–72.
- Singleton V.L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M, (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 29:152-172.
- S'lesak I, S'lesak H., Libik M., Miszalski Z. (2008). Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *Journal of plant physiology* 165, 127-137.
- S'lesak I, Libik M, Miszalski Z. (2008). The foliar concentration of hydrogen peroxide during salt-induced C3-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Science* 174: 221–226.
- Small E, & Catling P.M. (2000). *Les cultures médicinales canadiennes*. Presses scientifiques de CNRC. Ottawa (Ontario), Canada, 281 p.
- Smid E.J., Gorris L.G.M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In: shaurr Rahman, (Ed). *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker, New York, pp. 285-308.
- Smith, G.F. (1998). *Mesembs of the world*. Briza Publications, Pretoria.
- Smith M.T., Crouch N.R., Gericke N., Hirst M. (1996). Psychoactive constituents of the genus *Sceletium* N.E.Br. and other *Mesembryanthemaceae*: a review. *J. Ethnopharmacol*, 50, 119-130.
- Stafford, H.A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways, *Plant Science*, 101, 91–98.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M. and Jacobs, G. (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection, *New Phytologist*, 155, 349–361.
- Stintzing, F.C. and Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19–38.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. In P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 387–416.
- Strack, D., Vogt, T. and Schliemann, W (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247–269.



## Références bibliographiques

---

### T

- Treichel S. (1975), *Plant Sci. Lett.*, 4 , 141.
- Trout & friends, (2004). *Trout's Notes on Some Other Succulents (Chapter 5). Sacred Cacti 3rd Ed*, pp 24.
- Tsai, M.C., Song, T.Y., Shih, P.H., Yen, G.C., 2007. Antioxidant properties of water soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Food Chemistry* 104, 1115–1122.
- Tuesher E., Anton R., Labstein A., (2005). *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed Lavoisier, p 522.

### V

- Van der Watt E, Pretorius J.C (2001). Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76 : 87–91.
- Venning, J. (1984). *Mesembryanthemum*. In George, A.S. (Ed) *Flora of Australia Volume 4, Phytolaccaceae to Chenopodiaceae*. pp 21-24. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Vivrette N.J., & Muller C.H., (1977). Mechanism of invasion and dominance of coastal grassland by *Mesembryanthemum crystallinum*. *Ecol. Monogr* 47, 301-318.
- Vogt, T., Ibdah, M., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M. & Strack, D. (1999). Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry*, 52, 583–592.
- Von Willert D.J., Kirst G.O., Treichel S. and K. Von Willert., (1976). The effect of leaf age and salt stress on malate accumulation and phosphoenol pyruvate carboxylase activity in *Mesembryanthemum crystallinum*.

### W

- Watanabe, M., Sugimura, K. and Yamanoha, B.( 1999). Effect of acute deficiency of dietary proline on proline balance in the rat small intestine and liver. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 82 : 294-304.
- Watson L & Dallwitz M.J. (1992). *Grass genera of the world*.C.A.B. International, Wallingford. U.K.
- Watson L & Dalwitz M J., (1992). *Les familles de plantes à fleurs: les descriptions, les illustrations, l'identification et la recherche d'informations. Version 2.*

## Références bibliographiques

---

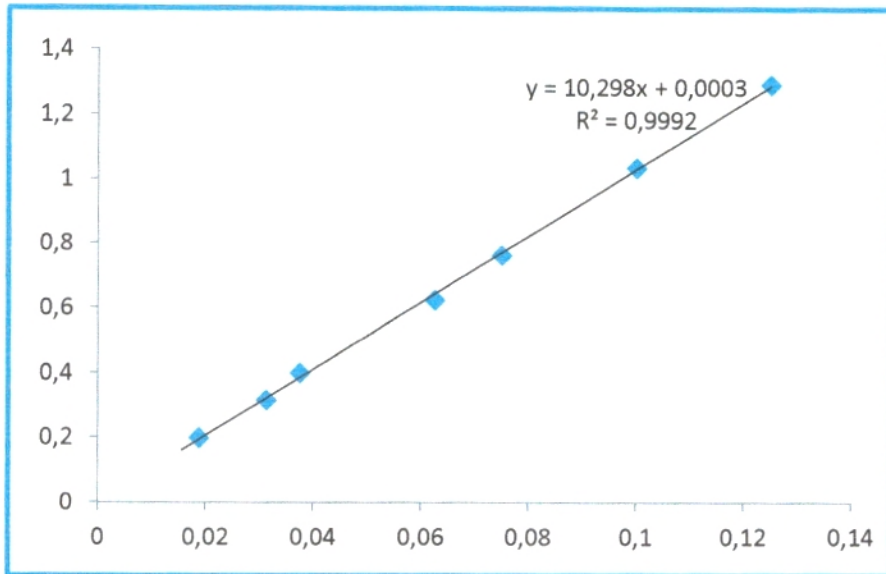
- Weber E. (2003). Invasive plant species of the world: a reference guide to environmental weeds. (Invasive Pl Spec).
- Western Australian Herbarium. (1998). FloraBase – The Western Australian Flora. Department of Conservation and Land Management.
- Wink, M. (1998). A Short History of Alkaloids. In M.F. Roberts and M. Wink (Eds), Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Plenum Press, New York, pp. 11–44.
- Winter, K., Lüttge, U. et Winter, E. (1978). Seasonal shift from C3 photosynthesis to crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*, growing in its natural environment. *Oecologia* 34: 225-237.

### Z

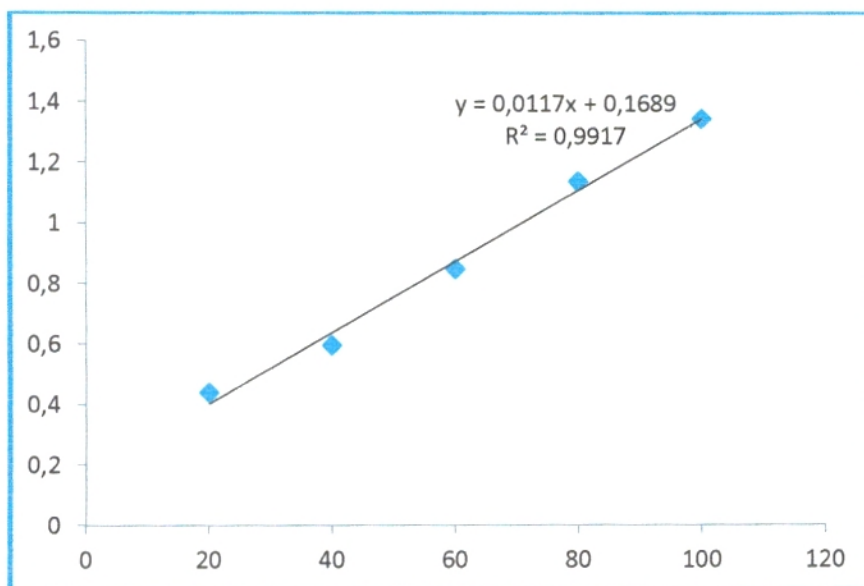
- Zulak K.G., Liscombe D.K., Ashihara H, and Facchini P.J. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet Edited by Alan Crozier, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara ;Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd.

# **Annexes**

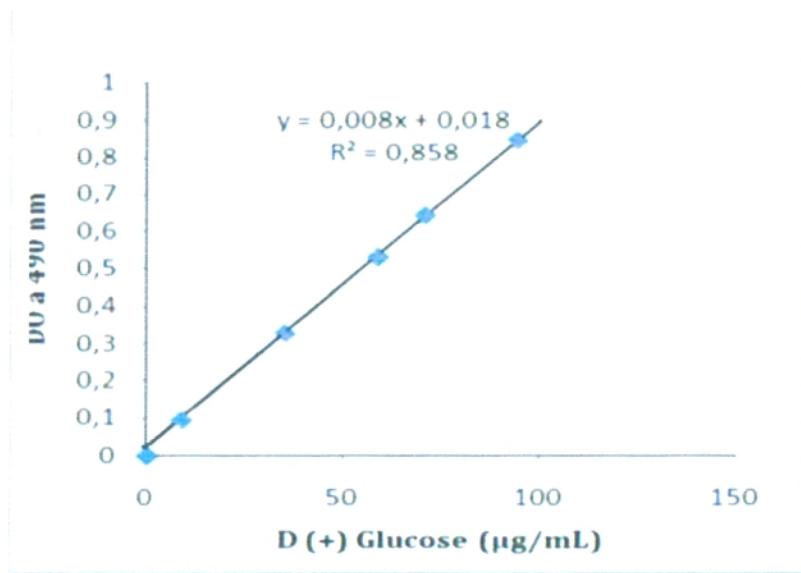
## Annexe I : courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique à 760 nm



Courbe d'étalonnage de la catéchine à 510 nm



**Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage des sucres totaux**

## **Produits chimiques utilisés :**

AcOEt : acétate d'éthyle

AlCl<sub>3</sub> : chlorure d'aluminium

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : dichlorométhane.

CuSO<sub>4</sub> : sulfate de cuivre

HCl : acide chlorhydrique

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : acide sulfurique

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : sulfate de potassium

MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium

NaNO<sub>2</sub> : nitrite de sodium

NaOH: soude caustique

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : sulfate de sodium

NH<sub>4</sub>OH: Ammoniaque

Méthanol

## **Composition des milieux de culture (g/l) :**

### **Milieu Mac Conkey Agar**

Peptone	20
Lactone	10
Bile salts	5
Sodium chloride	5
Neutral red	0.075
Agar	12
pH final	7.4

### **Gélose Chapman**

Tryptone	5
Extrait de levure	3
Extrait de viande	3
Chlorure de sodium	7
Peptone bactériologique	10
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.05
Agar	18
pH final	7.4

### **Milieu Muller Hinton**

Extrait de viande	3
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Amidon	1.5
Agar	16
pH final	7.4

**Milieu Sabouraud**

Peptone	100
Glucose	20
Agar	15
Chloramphénicol	0.5

**BHIB (Bouillon Cœur cervelle)**

Protéase peptone	10
Infusion de cervelle de veau	2.5
Infusion de cœur de bœuf	0.5
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de sodium	2.5
pH final	7.4

**Gélose nutritive**

Peptone	15
Extrait de viande	10
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar	20
pH	7.6



## Résumé

Les plantes constituent une source inépuisable de molécules chimiques dotées d'activités antimicrobiennes. L'étude de l'espèce *Mesembryanthemum crystallinum* appartenant à la famille des Aizoaceae, a porté sur un screening phytochimique visant à doser les différents métabolites primaires, et secondaires et sur une évaluation du pouvoir antimicrobien des phénols totaux, des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes.

L'extraction des métabolites primaires et secondaires a été réalisée par les différentes techniques phytochimiques et le dosage des composés phénoliques (Phénols totaux, Flavonoïdes, Tanins et Alcaloïdes), a été effectué par colorimétrie. Le pouvoir antimicrobien a été évalué par la technique de dilution sur microplaque.

Cette étude a révélé une forte teneur en eau estimée à 93.32% due à la succulence de la plante, et une forte quantité appréciable de matière grasse estimée à 11.5%, et de cendres évalués à 41%, contrairement aux sucres et aux protéines qui ont respectivement une faible teneur de 4.95% et de 2.12%. Le dosage des métabolites secondaires a révélé une teneur en polyphénols de 1.02 mg GAE/ g DW, les flavonoïdes avec 0.19 mg CE/g DW, les tanins avec 0.04 mg CE/g DW, et les alcaloïdes avec 4.2%. L'analyse du pouvoir antimicrobien sur sept espèces bactériennes et une levure (*C. albicans*), a montré une activité remarquable des flavonoïdes, suivi des tanins et des alcaloïdes, les phénols ont exprimé une activité modérée.

**Mots clés :** *Mesembryanthemum crystallinum*, métabolites primaires, métabolites secondaires, activité antimicrobienne.

## Abstract

Plants are an inexhaustible source of chemical molecules featuring antimicrobial activities. The study of the species *Mesembryanthemum crystallinum* belonging to the family of Aizoaceae, focused on a phytochemical screening to assay the various primary and secondary metabolites, and an assessment of the antimicrobial potency of total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids.

The extraction of primary and secondary metabolites was carried out by different phytochemical technics and determination of phenolic compounds (total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids) was performed by colorimetry. The antimicrobial potency was evaluated by the microplate dilution technique.

This study revealed a high water content estimated at 93.32% due to the succulence of the plant, and a significant amount of high fat estimated at 11.5%, and ash valued at 41%, in contrast to sugars and proteins that have respectively a low of 4.95% and 2.12%. The determination of secondary metabolites showed a polyphenol content of 1.02 mg GAE / g DW, flavonoids with 0.19 mg CE / g DW, tannins with 0.04 mg CE / g DW, and alkaloids with 4.2%. Analysis of the antimicrobial potency of seven species of bacteria and yeast (*C. albicans*), showed a remarkable activity of flavonoids, tannins and monitoring of alkaloids, phenols expressed moderate activity.

**Keywords:** *Mesembryanthemum crystallinum*, primary metabolites, secondary metabolites, antimicrobial activity.

## الخلاصة

النباتات هي مصدر لا ينضب من الجزينات الكيميائية التي يضم الأنشطة المضادة للميكروبات.

دراسة النوع (*Mesembryanthemum crystallinum*) الذي ينتمي إلى أسرة الأيزواسي

تركزت على الفحص الكيميائي النباتي لمختلف الأيضات الابتدائية، والثانوية، وإجراء تقييم لفعالية المضادات للميكروبات من مجموع الفينول، مركبات الفلافونويد والعفص وقلويدات.

و جرى استخراج الأيضات الابتدائية والثانوية بواسطة التقنيات الفيتوكيميائية المختلفة وتصميم المركبات الفينولية (الفينولات الكلية، الفلافونويد والعفص وقلويدات) تقنية microplate كان يؤديها قياس الألوان. تم تقييم فاعلية مضادات الميكروبات بفضل.

و كشفت هذه الدراسة على نسبة ارتفاع المياه تقدر بـ 93,32% وذلك بسبب انتسابها للنبات العصارية، وكمية كبيرة من الدهون عالية تقدر بنحو 11.5%، والرماد تبلغ قيمتها 41%، وعلى النقيض من السكريات والبروتينات التي على التوالي على انخفاض 4.95% و 2.12%. وأظهر تقرير من المركبات الثانوية على نسبة 1,02 ملغ من مادة البوليفينول / غرام وزن جاف، فلافونويدس مع 0,19 ملغ / غرام وزن جاف والعفص مع 0,04 ملغ / غرام وزن جاف، وقلويدات مع 4,2%. وأظهر تحليل لفاعلية مضادات الميكروبات من سبعة أنواع من البكتيريا

والخميرة نشاطا ملحوظا من الفلافونويد والعفص ورصد القلويدات

وأعربت الفينولات على النشاط المعتدل