

## **IV.1. Etude phytochimique**

### **IV.1.1. Origine géographique et période de récolte de plante**

*L'Opuntia ficus indica* (raquettes) a été récolté dans la région d'Ain el Ibel (wilaya de Djelfa). Alors que la fleur a été achetée du marché de Djelfa. Cette espèce est très utilisée par la population locale, d'après nos recherches bibliographiques, et en dispute, Leurs propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques n'ont pas occupées une place considérable sur le plan de la recherche scientifique. En ce qui nous concerne, Nous n'avons pris en considération que les parties aériennes de la plante. L'opération de séchage a été effectuée dans l'ombre au delà de l'humidité, la masse de la plante était de 500g.

## **IV.2. Travaux personnels**

### **IV.2.1. Préparation des échantillons**

La plante (raquette) récolée et triée a été séchée à l'air libre, à l'ombre, à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 2 mois, puis la partie aérienne (fleurs) ont été broyées au mortier. Les poudres obtenus été ont ensuite conservées dans des flacons, en verre hermétiquement fermés à basse température 4°C, en vue de procéder aux différentes manipulations.

#### **➤ Matériel et produits utilisés**

##### **• Matériel**

- Ballonsmonocls de250 ml.
- BallonsBicols de250ml.
- Béchers.100 ml, 250ml.
- Colonne de Soxhlet de 250 ml.
- Cristalliseur.
- Entonnoir.
- Eprovettes 10ml, 100ml.

- Erlenmeyers 100 ml, 300 ml.
- Fiole à vide.
- Fioles jaugées.
- Mortier.
- Papier aluminium, Papier filtre.
- Pipettes 1ml, 10 ml.
- Plaque chauffante.
- Pompe à vide.
- Réfrigérant.
- Tamis.
- Tubes à essai de diamètre 1,6 cm.

- **Appareillage**

- Etuve ventilée MEMMERT type : SLE 400.
- Balance électrique Heidolph MR. HEI-Standard.
- Rotavapeur Heidolph.Laborata4000 efficient.
- Spectrophotomètre (UV-Vis) BECKMAN.

- **Produits**

**Les Acides**

- Acide chlorhydrique HCl 33% Société de chimie cosmétique et de pharmacie.
- Le chlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> PANREAC.
- Le chlorure de fer FeCl<sub>3</sub> BIOCHEM.

**Les Bases**

- L'ammoniaque NH<sub>4</sub>OH d =1.2 kg/L.
- Hydroxyde de sodium NaOH 99% Société de chimie cosmétique et de pharmacie.
- Oxalate de Sodium Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>9% RIEDEL-DEHAENAG /SEELZE-HANNOVER

**Les Métaux**

- Mg Magnésium Riedel-de Haen Mr = 24.31g /mol.

**Les Sels**

- Chlorure de sodium NaCl ANALARNORMAPUR.
- Le chlorure de calcium CaCl<sub>2</sub> FLUKA Mr = 147.02g/mol.

**Les Solvants**

- L'acétate d'éthyle HIPERSOLV CHROMANORM d = 0.9kg/l .
- L'eau distillée.
- Ethanol C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O SIGMA-ALORICH Mr = 46.07 g/mol d = 0.8 kg/mol.
- L'éther de pétrole BIOCHEM Chemopharma d = 0.65kg/mol T<sub>éb</sub> = 40-65C°.
- Dichlorométhane ANALARNORMAPUR d= 1.33 kg/L.
- n-butanol C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O SIGMA-ALORICH T<sub>éb</sub> = 116-118C°.

**Les réactifs**

- Réactif de Dragendorff

**IV.2.2. L'extraction des flavonoïdes de la plante**

Dans notre laboratoire, la première étape dans la préparation d'extraits végétaux est le broyage de matière végétale, sous cette forme broyée, la poudre ( chaque partie de plante séchée et broyée au mortier présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions. La méthode d'extraction que nous employons est la macération successive par cinq solvants à polarité croissante (Ether de pétrole → dichlorométhane → de l'acétate d'éthyle → n-butanol → aqueuse)[01].

L'extraction par l'éther de pétrole a pour but d'entraîner les graisses ainsi que les substances lipophiles. La deuxième extraction par le dichlorométhane a été faite pour obtenir un extrait riche en composés moyennement polaires. La troisième extraction grâce à l'acétate d'éthyle a été faite pour obtenir un extrait riche en composés polaires. La quatrième extraction par n-butanol a été faite pour obtenir un extrait riche en composés très polaire. La dernière extraction a été faite avec l'eau qui extrait les composés franchement polaires.

On pèse 16g de la matière végétale broyée pour la raquette et 12g pour la fleur, on lave par l'éther de pétrole puis on pose dans un filtre de l'extracteur de soxhlet de 250 ml tant que le ballon contient 200 ml de l'éther de pétrole, chauffée pendant 24h. Après filtration sur papier de l'extrait étherique et évaporé le solvant par évaporateur rotatif. On solubilise le résidu dans 10 ml d'éthanol. Le résidu de la matière végétale de l'extraction précédente a été entraîné dans les mêmes conditions mentionnées ci-dessus, dans les solvants adéquats dans l'ordre de polarité croissants (Ep., DCM, AcOEt, n-but, Aq) suivant la **fig.IV.1**. On pèse les masses de la matière végétale séchée, le résidu sec, l'extrait sec et le résidu solubilisé dans l'éthanol qui est collecté par la suite pour calculer les concentrations. Les extraits organiques (Ep., DCM, AcOEt, n-but) ont été concentrés sous vide au rota vapeur respectivement aux températures 37°C, 40°C, 77°C et 117°C. Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme de la figure.IV.1.

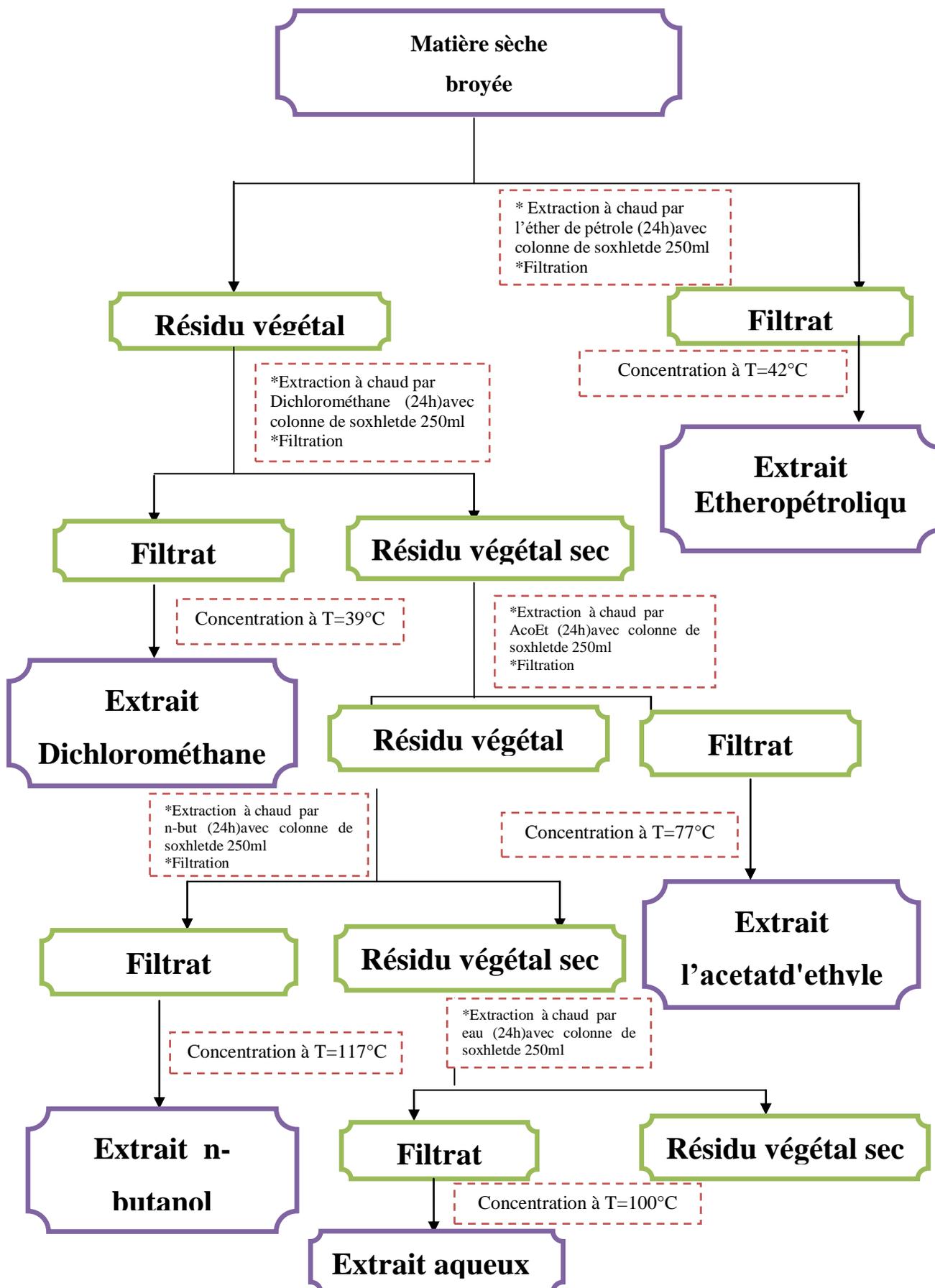


Fig.IV.1 : Extraction par polarité croissante de la plante

### IV.2.3. Calcul le rendement

Le pourcentage en extrait brut sec a été calculé par la formule suivante [2]:

$$R(\%) = (M / M_0) \times 100$$

**R (%)** : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

### IV.2.4. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la matière sèche a été réalisée juste à l'arrivée des échantillons au laboratoire. La dessiccation été réalisée par évaporation de 5g de matière végétale à  $105 \pm 2 \text{ C}^\circ$  dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique, jusqu' à ce que le poids devient pratiquement constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subi lors de la dessiccation [3,4].

La détermination de teneur en eau se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante.

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

H% : Teneur en eau (taux d'humidité).

M<sub>1</sub> = P : masse en g de l'échantillon avant étuvage (plante fraîche).

M<sub>2</sub> : masse en g avant de l'échantillon après étuvage (plante séché).

$$\text{La matière sèche (MS)\%} = 100 - H\%$$

## IV.2.5 Analyse des extraits de la plante

### IV.2.5.1. Analyse qualitative des extraits

Les espèces sélectionnées font l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques (métabolites II) existant dans la plante. Cinq solvants de polarités différentes (eau distillé, n-but, AcOEt, DCM, EP) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

#### IV.2.5.1.1. Réaction de Caractérisation des Flavonoïdes

La détection de la présence des flavonoïdes dans les extraits de la plante (raquettes et fleurs) a été faite par plusieurs réactions de caractérisation des flavonoïdes Pour les différents extraits[3,5].

##### ✓ Réaction à la cyanidine

5ml de l'extrait sont introduits dans un tube à essai. À cette solution sont ajoutés 5ml de HCL, 5ml d'eau distillée et quelque copeaux de Mg. L'apparition d'une couleur rose orange (flavones), rose violacée (flavonones), ou rouge (flavonols) rassemblée dans la couche surnageant de l'alcool indique la présence de flavonoïdes libres (génines). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les catéchines et les isoflavone[3,6].

##### ✓ Réaction de NaOH/HCL

A 2ml de l'extrait éthanolique on ajoute 0.5ml NaOH dilué (0.5g /5ml d'eau) avec 0.5ml HCL dilue (1ml HCL/2ml d'eau). L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes [7,8].

##### ✓ Réaction de chlorure d'aluminium

A 1ml de l'extrait, on ajoute quelques gouttes d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> 1%. L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes [9].

### ✓ Réaction de l'ammoniaque $\text{NH}_4\text{OH}$

Macérer quelque grammes de matière végétale avec 10 ml d'acétate d'éthyle pendant 3min , Puis filtrer, et mélanger 4ml de l'extrait d'acétate d'éthyle avec 1ml de la solution d'ammoniaque diluée. L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonols.

Généralement, 4ml de l'extrait avec 1ml d'une solution  $\text{NH}_4\text{OH}$ . L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes de type flavonols[9].

#### IV.2.5.1.2. Réaction de Caractérisation des Tanins (test de Braemer's)

Pour détecter la présence des tanins, on prélève 2 à 3ml de l'extrait éthanolique que l'on met dans un tube à essai, on lui ajoute 1 ml d'une solution diluée dans éthanol de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1% ou 10%. L'apparition d'une couleur vert noir, en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques[2, 10,11].

#### IV.2.5.1.3. Réaction de Caractérisation des Saponines

- Délipidation « préparation de poudre *d'opuntia*»

On dégraisse 4g du matériel végétal (fleur , raquette) séché et broyé avec l'éther de pétrole pendant 15 min, on répète l'opération trois fois jusqu'à la décoloration du filtrat (élimination des lipides), cette phase organique ne sera pas gardée. Sécher la poudre obtenue naturellement jusqu'à ce qu'elle soit pulvérulente[12].

- Préparation de l'extrait (décocté à 1%) de poudre délipidé

On introduit 1 g de la poudre délipidé avec 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer à 95°C pendant 30 min. On filtre à chaud sur papier filtre plissé, on obtient donc le décocté.

- Dosage des saponines: mesure de « l'indice de mousse »

Pour calculer l'indice de mousse il faut prendre les dilutions suivantes:

**Tableau IV.01:** les dilutions utilisées pour calculer l'indice de mousse.

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Décocté (ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Eau distillée (ml)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6.5	6	5.5	5

Avec le doigt; boucher et agiter chaque tube pendant 15 sec et mesurer les hauteurs de mousse après 5 min d'agitation, 10 min et enfin après 15 min.

La mousse persistante pour 15 min indique la présence des saponines.

#### **IV.2.5.1.4. Réaction de Caractérisation des alcaloïdes**

Pour détecter la présence des alcaloïdes, on prélève 2 à 3ml de l'extrait éthanolique que l'on met dans un tube à essai, on lui ajoute quelques gouttes de réactif Dragendorff.

L'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes[12].

### **IV.2.6. Effets des extraits de la plante**

#### **IV.2.6.1. L'activité anti-lithiasique**

Dans notre travail, nous avons étudié la cinétique de la cristallisation oxalo-calcique expérimentalement, par le modèle turbidimétrique. Dans ce modèle, on a une seule partie, qui comporte l'étude de la cristallisation en solutions éthanolique des extraits Ep, DCM, AcOEt, n-but de la plante sans et avec inhibiteur, et dans le but d'apprécier et valider quantitativement l'effet du pouvoir d'inhibition des extraits de la plante étudiée (*Opuntia ficus indica*)[13].

Nous avons préparé des solutions inhibitrices filles à partir de la solution mère, cette préparation se fait grâce à un solvant approprié, c'est la solution de chlorure de sodium à concentration 0.15mol/l[13].

#### **✓ Etude par Spectrophotomètre UV-visible**

**a-Appareillage utilisé**

- Fiole jaugée de 500ml.
- Fiole jaugée de 50ml.
- Balance électrique.
- Verre à montre.
- Spectrophotomètre UV-visible.
- Cuve en plastique de mesure d'un centimètre de trajet optique.

**b .Produits chimiques**

- Chlorure de calcium dihydraté :  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ .
- L'oxalate de sodium :  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .
- Chlorure de sodium :  $\text{NaCl}$ .

**c- Préparation des solutions cristallisables**

Nous avons préparé la solution de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) à concentration  $0.15\text{mol/l}$  (pour maintenir la force ionique constante), qui est considéré comme un solvant pour préparer toutes les solutions mères de chlorure de calcium de concentration  $60\text{mmol/l}$  et de l'oxalate de sodium de concentration  $10\text{mmol/l}$ .

Les solutions filles nécessaires de chlorure de calcium et l'oxalate de sodium sont en suite préparées à partir des solutions mères (tableau n° IV.2)[13].

Ces dilutions sont effectuées avec la solution de chlorure de sodium.

Tableau IV.2: les solutions cristallisables.

	Concentration en $\text{Ca}^{2+}$ (mmol/l)	Concentration en $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ (mmol/l)
solutions mères	60	10
solutions filles	10	01

#### d- Préparation des solutions inhibitrices

La solution inhibitrice mère étudiée s'agit de l'extrait de parties de la plante qui obtenue par l'extraction à l'aide de l'appareil de SOXHLET. A partir de la quelle nous avons préparé des solutions inhibitrices filles à différentes concentrations 10%,50% [13].

#### e- Mode opératoire

Avant d'entamer l'expérience il faut tenir en compte de la régulation des options du Spectrophotomètre [13] :

- Fixer la longueur d'onde du Spectrophotomètre à 620nm.
- Fixer le total temps (la durée globale de la cristallisation à 7 minutes).
- Fixer le temps sélectionné (le point de mesure) à chaque 30 secondes.
- Laver bien la cuve par l'acide acétique puis par l'eau distillée.
- L'ensemble des manipulations est exécuté avec un certain nombre de critères bien précis [13] :
- Chaque essai est répété en moyenne 3 fois.
- La plage linéaire de la courbe doit avoir un coefficient de corrélation (ou de régression) supérieur ou égale à 0.96.

✓ **Essais sans inhibiteur**

• **Disposition expérimental**

Un volume de 1.5ml de solution de chlorure de calcium à concentration 10mmol/l est versés dans la cuve, et placée dans le compartiment de mesure de Spectrophotomètre, pour prendre la mesure de référence ( $t=0$ ), nous versons ensuite un volume de 1.5ml de la solution d'oxalate de sodium à 1mmol/l dans la cuve, et déclenchons immédiatement la mesure. Toutes nos cinétiques de cristallisation sont faites à 620nm[13].

✓ **Essais avec inhibiteur**

La méthode expérimentale utilisée pour l'étude de cristallisation de l'oxalate de calcium avec inhibiteur, est la même que celle utilisée sans inhibiteur .Il suffit d'ajouter 1ml de la solution inhibitrice déterminée (10%, 50%), à 1ml de la solution de chlorure de calcium à concentration 10mmol/l dans la cuve pour prendre la mesure de référence ( $t=0$ ) , puis verser au temps ( $t=0$ ) 1ml de la solution d'oxalate de sodium à concentration 1mmol/l et la cinétique est déclenchée immédiatement , la longueur d'onde est toujours fixée à 620nm[13].