



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire N série:

وزارة التعليم العالي والبحث العلمية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire ET Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Contribution à l'étude phytochimique et biologique
des alcaloïdes de la partie aérienne de *Pergularia
tomentosa L.***

Présentés Par :

M^{elle}. Belila Saida

M^{elle}. Ounis Zakia

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me}. Boutelis S. M.A.A, Université d'El Oued.

Examineur : Mr. Medjour A. M.A.A, Université d'El Oued.

Promoteur : Mr. Tlili M.L. M.A.B, Université d'El Oued



Dédicace

*Nous dédions ce modeste travail à notre
Très chères pères
qui nous a toujours soutenu, et qu'étaient
toujours présents pour
nous*

*A les plus chères au monde,
nos mères qu'étaient
toujours nous encouragé durant notre
études*

A nos sœurs

A nos frères

A toutes nos familles

A toutes nos amies

A toute personne qui nous connaissent

Saida & Zakia



REMERCIEMENTS

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promoteur Monsieur **Tlili Mohammed Laid** Maître assistant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, qui nous ont fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Mes vifs remerciements vont à Madame **Boutelis Safia**, Maitre assistant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous remercions également Monsieur **Medjour Abdelhak**, Maitre assistant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury.*

Nous aimons également citer ici les personnes dont la collaboration a été précieuse pour quelques aspects de ce travail, ainsi que tout le personnel du laboratoire de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos reconnaissances et nos profondes gratitude.

Nous ne saurais omettre d'adresser nos remerciements et nos reconnaissance à tous les enseignants de l'Université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, pour le soutien et la formation qu'ils nous ont prodigué tout au long de notre études, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profond respect et grande considération.

Enfin, nous remercions nos proches et amis (es). Merci à nos parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de nous avoir soutenu et supporté tout au long de notre formation.

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Structure des alcaloïdes.	6
Tableau II	Classification des alcaloïdes.	7
Tableau III	Composition en métabolites primaires des différentes parties de <i>Pergularia tomentosa</i> .	18
Tableau IV	composition en métabolites secondaires des différents organes de <i>Pergularia tomentosa</i> .	19
Tableau V	Description des différentes souches microbiennes testées.	39
Tableau VI	Résultat des test phytochimique de feuille de <i>Pergularia tomentosa</i> L.	41
Tableau VII	Résultats de CCM des extraits bruts des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> (chloroforme / méthanol / amoniaque).	43
Tableau VIII	Résultats de CCM d'extrait alcaloïde des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> (eau / acide acétique / butanol).	43

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Origine biosynthétique des alcaloïdes	11
Figure 2	<i>Pergularia tomentosa L.</i>	16
Figure 3	fleurs, feuilles et fruits de <i>Pergularia tomentosa L.</i>	17
Figure 4	Les différents types d'ampoule à décanter	25
Figure 5	Les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa	26
Figure 6	Un appareil de Soxhlet	27
Figure 7	protocole d'extraction des alcaloïdes totaux à partir des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>	35
Figure 8	chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> de système de chloroforme/ méthanol/ ammoniaque (5/1 /4) (v/v).	44
Figure 9	chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> de système eau / acide acétique / butanol (8/0.5 /1.5) (v/v).	44
Figure 10	Histogramme des résultats d'activité antioxydante.	46
Figure 11	les diamètres des zones d'inhibition de <i>Listeria innocua</i> .	47
Figure 12	Activité d'extrait d'alcaloïdes des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Listeria innocua</i> .	48
Figure 13	diamètres des zones d'inhibition de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	48
Figure 14	Activité d'extrait d'alcaloïdes des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	49
Figure 15	Les diamètres des zones d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> .	50
Figure 16	Activité d'extrait d'alcaloïdes des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i> .	50

Résumé

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique d'une des plantes d'intérêt médicinal dans la région d'El-Oued, en l'occurrence *Pergularia tomentosa*. L'échantillon choisi est étudié à travers leur contenant qualitatif et quantitatif en composés alcaloïdes, suivi d'une analyse par chromatographie sur couche mince et évaluation *in vitro* des activités antioxydant et antibactérienne de ces composés.

L'examen phytochimique réalisé sur les feuilles de *Pergularia tomentosa* a montré la présence des alcaloïdes en quantité importante. L'extraction des alcaloïdes a permis d'obtenir un rendement de l'ordre de 0.5 %.

L'analyse qualitative par CCM, après révélation et visualisation sous UV à 365 nm, a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) des R_f et des couleurs différents, ce qui indique que la plante *Pergularia tomentosa* est riche en plusieurs classes des alcaloïdes.

L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode de DPPH, a montré que l'extrait d'alcaloïde est un pouvoir antioxydant relativement modéré par rapport à celui de l'acide ascorbique.

L'étude de l'activité antibactérienne a été effectuée sur trois souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait d'alcaloïdes des feuilles de *Pergularia tomentosa* se sont révélés activement inhibitrices vis à vis les souches testées, et sont beaucoup plus actives sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

Mots clés: *Pergularia tomentosa* L, alcaloïde, CCM, activité antioxydant, activité antibactérienne.

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Généralités sur les alcaloïdes

I.1.1. Définition des alcaloïdes	5
I.1.2. Structure des alcaloïdes	5
I.1.3. Classification des alcaloïdes	6
I.1.4. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes.....	9
I.1.5. Biosynthèse des alcaloïdes.....	9
I.1.6. Rôle des alcaloïdes dans la plante.....	12
I.1.7. Pharmacologie des alcaloïdes	12
I.1.8. Les alcaloïdes comme agents antimicrobiens.....	12

Chapitre 2. Généralités sur l'espèce *Pergularia tomentosa*

I.2.1. Présentation de famille des Asclépiadacées.....	15
I.2.2. Généralité sur <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	15
I.2.2.1. Noms vernaculaires.....	15
I.2.2.2. Position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	16
I.2.3. Description botanique de <i>Pergularia tomentosa</i>	17
I.2.4. Distribution géographique.....	18
I.2.5. Compositions biochimiques de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	18
I.2.5.1. Métabolites primaires.....	18
I.2.5.2. Métabolites secondaires.....	18
I.2.6. Usages traditionnels.....	19
I.2.7. Activités biologiques et thérapeutiques de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	20
I.2.7.1. Activité anti microbiennes.....	20
I.2.7.2. Activité anti oxydante.....	20
I.2.7.3. Activité molluscicide.....	20
I.2.7.4. Activité cytotoxique.....	21
I.2.7.5. Larvicide.....	21
I.2.7.6. Antidermatophytique.....	21
I.2.7.7. Anti tumorale.....	21

Chapitre 3. Méthodes d'analyses des alcaloïdes

I.3.1. Détection et caractérisations des alcaloïdes.....	23
I.3.2. Extraction des alcaloïdes.....	24
I.3.3. Types d'extraction des alcaloïdes.....	24
I.3.3.1. Extraction liquide-liquide	24
I.3.3.2. Extraction solide-liquide.....	25
I.3.3.3. Extraction par ultrasons (sonication).....	28
I.3.3.4. Méthode de (Stas-Otto).....	28
I.3.4. Les techniques d'études physico-chimiques.....	28
I.3.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
I.3.4.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	29
I.3.4.3. La Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	29
I.3.4.4. La Chromatographie Flash.....	30

PARTIE II. PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1. Matériels et méthodes

II.1.1. Matériels.....	32
II.1.1.1. Matériel végétal.....	32
II.1.1.2. Matériels de laboratoire.....	32
II.1.1.3. Produits chimiques.....	32
II.1.2. Méthodes analytiques.....	33
II.1.2.1. Test phytochimique.....	33
II.1.2.2. Extraction des alcaloïdes totaux.....	33
II.1.2.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	37
II.1.3. Évaluations des activités biologiques.....	37
II.1.3.1. Activité antioxydante : Test de piégeage du radical DPPH.....	37
II.1.3.2. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	39

Chapitre 2. Résultats et Discussion

II.2.1. Test phytochimique.....	41
II.2.2. Extractions des alcaloïdes.....	41
II.2.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	42
II.2.4. Evaluation des activités biologiques.....	45
a- Test de l'activité antioxydante.....	45
b- Evaluation de l'activité antibactérienne.....	47

Conclusion	52
-------------------------	----

Références bibliographiques	54
--	----

Liste des abréviations

ALP	Alkaline phosphatase
ANOVA	Analyse de la variance
ATCC	American Type Culture Collection
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMI	Concentrations minimales inhibitrices
CMB	Concentrations minimales Bactéricides
CMF	Concentrations minimales Fongicide
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DPPH	Diphényl picryl hydrazyl
GEN	Gentamicine
GGT	Gamma-glutamyl transferase
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
LDH	Lactate deshydrogénase
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MS	Spectrométrie de masse
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV	Ultraviolette
V/V	Volume sur Volume

Introduction

Le Sahara algérien est constitué de 500 espèces végétales, dont on dénombre 162 espèces endémiques dans le Sahara seul et à la quelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Plusieurs de ces espèces sont connues par leurs propriétés thérapeutiques remarquables (**Fellous, 2003**).

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des maladies vient habituellement de la croyance qu'elles présentent une très faible toxicité du fait de leur origine naturelle. Selon l'organisation mondiale de la santé, autour de 80 % de la population du monde emploie la médecine traditionnelle pour le soin de santé. Ces études ont pour but d'une part, de confirmer les propriétés thérapeutiques et d'autre part l'identification des principes actifs à l'origine de vertus attribuées aux plantes (**Gomes et al., 2012**).

Le règne végétal représentant une source importante d'une grande variété de molécules bioactives, elles ont été mises à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés d'origine naturelle, le plus souvent végétale, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et dotés à faible dose de propriétés pharmacologiques et antibactériennes marquées; ils agissent comme des bases, comme des alcalis, ceci étant dû à la présence d'azote. Les alcaloïdes se présentent le plus souvent sous l'aspect de cristaux, insolubles dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (**Dih et Belguendouz, 2017**).

Notre travail qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine locale qui englobe l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle et suite à des travaux antérieurs, nous avons décidé d'étudier la plante *Pergularia tomentosa* issue de la région Méguibra (El-Oued). Cette plante appartient à la famille des Asclepiadaceae. Bien qu'elle soit toxique aux fortes doses, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle contre les dermatoses et les angines (**Ould El Hadj et al., 2003**), les spasmes et les diarrhées ainsi que le diabète (**Kemassi et al., 2014**).

Notre travail s'articule autour de l'étude phytochimique des alcaloïdes de cette plante ainsi que sur l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne d'extrait préparé.

On a s'envisagé cette étude en deux parties; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier est consacré aux alcaloïdes, leur classification et leurs propriétés pharmacologiques. Le deuxième chapitre

Introduction

concerne une description détaillée de la plante étudiée. et enfin, des quelques méthodes d'analyse d'alcaloïdes sera donnée dans le dernier chapitre.

La deuxième partie quant à lui, il est partie en deux chapitres.

Le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Le test phytochimique de la plante.
- L'extraction des alcaloïdes.
- L'analyse de l'extrait par CCM.
- Une étude de l'activité antioxydante des par le piégeage du radical libre DPPH.
- Evaluation de l'activité antibactérienne.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons les résultats obtenus et leur discussion.

Partie I.

Synthèse

bibliographique

Chapitre 1.

Généralités sur les alcaloïdes

I.1.1. Définition des alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du 19^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, ce terme est dérivé de l'arabe al kaly qui signifie la soude et de grec eidos qui signifie l'aspect (**Ghedjati, 2014**).

Substance organique, basique (goût amer), azotée, généralement hétérocyclique, d'origine végétale (rarement animale), douée de propriétés physiologiques remarquables (toxiques ou thérapeutiques), telle que la morphine, la nicotine, la cocaïne et la quinine (**Benslama, 2016**).

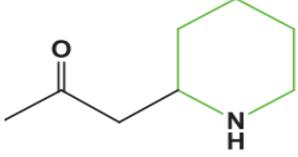
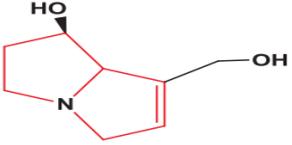
Il en existe environ 12000 répertoriés à ce jour; les principaux précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), l'arginine (Arg) ou la lysine (Lys). Ils sont stockés dans les cellules végétales au niveau des vacuoles. Ils possèdent de nombreuses propriétés pour la plante jouant un rôle de défense et sont également utilisés en médecine et pharmacie (**Benslama, 2016**).

Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole (**Mohammedi, 2013**).

I.1.2. Structure des alcaloïdes

Vouloir proposer une classification pour les alcaloïdes demeure une tâche ardue, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. Une des classifications possibles concerne le nombre de cycles contenant l'atome d'azote à mentionné dans **le tableau I (Mamadou, 2011)**.

Tableau I. Structure des alcaloïdes (Mamadou, 2011).

Structure	Exemple
1 seul cycle contenant l'atome d'azote.	 <p>Isopelletierine</p>
2 cycles contenant l'atome d'azote	 <p>Rétronécine</p>

I.1.3. Classification des alcaloïdes

a- Selon l'origine biosynthétique

On distingue trois types d'alcaloïdes

➤ Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (Berkal et Bouchama, 2016).

➤ Les pseudo-alcaloïdes

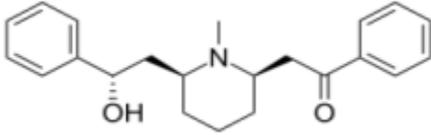
Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Berkal et Bouchama, 2016).

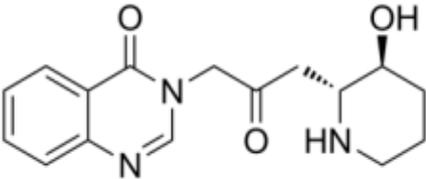
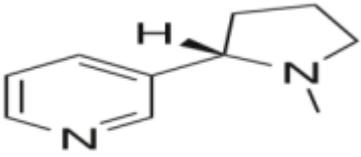
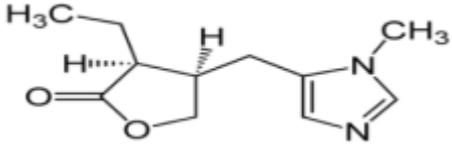
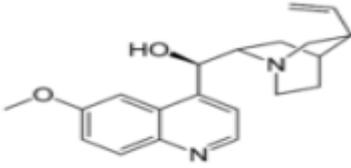
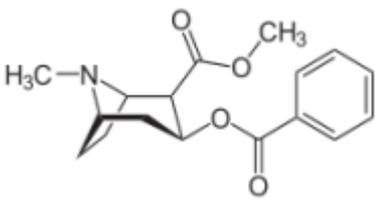
➤ Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (Berkal et Bouchama, 2016).

b- Selon leur composition chimique et structure moléculaire

Tableau II: Classification des alcaloïdes (Berkal et Bouchama, 2016).

Les derives des Alcaloïdes	Exemple	Les propriétés
Alcaloïdes dérivés de la lysine	Composés piperidinique ex:la lobéline 	<ul style="list-style-type: none"> - L'extrait brut de la plante estlargement employé dans le traitement de l'asthme et de la bronchite. -Trèstoxique mais le sel de sulfate correspondantestutilisé en médecinecommeagent stimulant de rythme cardiaque. - utilisée pour provoquer lacontraction de l'utérus aucours de l'accouchement.
Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phényl-alanine	Composés monocyclique ex: l'éphédrin 	<ul style="list-style-type: none"> -Médicament analgésique et anti- allergique. -Une activité vasodilatatricePropriétés hypnotiques etanalgésique. -A un effet calmantsur deszones du système nerveuxcentral. -Inhibe la sensation de douleur. -Effet analgésique associé a un effet euphorisant.

<p>Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique</p>	<p>La fébrifugine</p> 	<p>-Propriétés antipyrétiques et antiparasitaires. -Une activité anti tumorale sur différents modèles de tumeurs humaines du poumon du colon et des ovaires.</p>
<p>Alcaloïdes dérivés De l'acide nicotinique.</p>	<p>La nicotine</p> 	<p>-Effet contre les attaques des herbivores et des insectes Stimulant respiratoire. -Agent aidant le processus de sevrage tabagique.</p>
<p>Alcaloïdes dérivés de l'histidine</p>	<p>La pilocarpine</p> 	<p>-Utilisée en ophtalmologie dans le traitement du glaucome.</p>
<p>Alcaloïdes dérivés de tryptophane</p>	<p>La quinine</p> 	<p>-Utilisée dans les traitements de la crampe nocturne de la jambe. -Tue les mérozoïtes de l'agent vecteur de la malaria.</p>
<p>Alcaloïdes dérivés de l'ornithine</p>	<p>La cocaïne</p> 	<p>-Utilisée dans le domaine de l'odontologie. - Elle étouffe les symptômes de fatigue et d'épuisement.</p>

I.1.4. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

- Les alcaloïdes sont des corps de masses moléculaires faibles et de fonction basique (**Facchini et Pierre, 2005**). Cette dernière est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène (**Ghedjati, 2014**).
- Les alcaloïdes non oxygénés (nicotine), sont des liquides huileux volatils, fréquemment odorants, par contre les alcaloïdes oxygénés sont en général solides, cristallisés, inodores et de saveur amère.
- Ils peuvent être fixés sur certains agents adsorbants tels que les charbons actifs ou les argiles du type bentonite.
- Ils se combinent avec les acides et forment des sels, généralement solubles dans l'eau.
- La solubilité des alcaloïdes dans les solvants organiques tels que: l'alcool, l'éther, le benzène et le chloroforme est en général élevée par rapport à la solubilité dans l'eau, puisque la plupart de ces substances sont insolubles ou peu solubles dans l'eau.
- Les procédés d'extraction des alcaloïdes sont basés sur la solubilité différentielle dans divers solvants (**Afoun et Ammou, 2017**).
- Les alcaloïdes précipitent avec certains réactifs spécifiques appelés « réactifs des alcaloïdes ». Les plus importants sont les réactifs iodés tels que:
 - Solution neutre de mercure iodure de potassium ou réactif de MAYER (précipité blanc jaunâtre).
 - Solution acide d'iodobismuthite de potassium ou réactif de DRAGENDORFF (précipité rouge orangé).
 - Solution d'iodure de potassium iodé ou réactif de BOUCHARDAT.
- La majorité des alcaloïdes sont dérivés à partir des acides aminés tels que: ornithine, lysine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane (**Ghedjati, 2014**).

I.1.5. Biosynthèse des alcaloïdes

L'origine des alcaloïdes vrais remonte aux acides aminés entre autres: l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, la tryptophane, l'histidine et l'acide anthranilique.

La formation du système hétérocyclique passe généralement par un processus inter ou intramoléculaire simple: La formation de l'alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule

molécule d'acide aminé, c'est le cas de l'hygrine ou de la cathine, de deux molécules du même acide aminé comme pour les quinolizidines et les benzyloquinoléines, plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé comme dans le cas de la spartéine.

Quand la molécule comporte des carbones supplémentaires, ils sont apportés par des éléments largement impliqués dans d'autres métabolismes : acétate (tropanes), diméthylallylpyrophosphate (ergolines, furoquinoléines) ou plus spécifiques à un groupe particulier de végétaux comme le sécolanoside (alcaloïde indolo-monoterpéniques). Les oxydations allyliques, les couplages oxydatifs, l'oxydation des noyaux aromatiques, les estérifications, les étherifications, etc. justifient l'existence des nombreuses variations structurales. Pour les alcaloïdes terpéniques, ils sont un peu particuliers et leurs précurseurs ont une origine strictement terpénique et l'amination de la molécule est tardive (**Mamadou, 2011**).

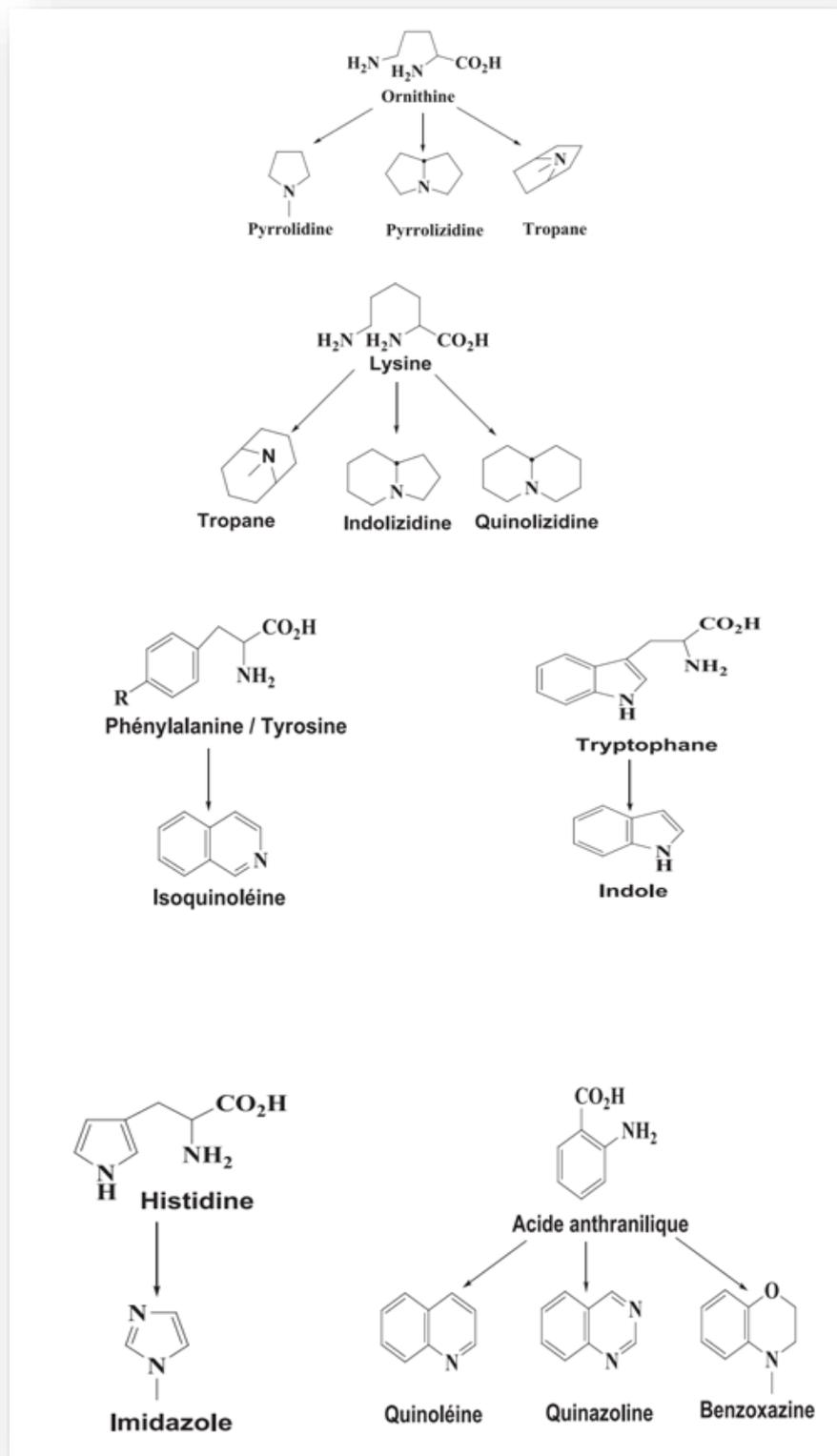


Figure 1: Origine biosynthétique des alcaloïdes (Mamadou, 2011).

I.1.6. Rôle des alcaloïdes dans la plante

Au niveau de la plante, les alcaloïdes jouent un rôle essentiel dans la protection du végétale contre les animaux comme agents phytophages; ils ont également la plus importante des rôles produit d'excrétion du métabolisme azoté, Substance de réserve, Régulateurs de croissance. La nicotine ne permet pas la croissance des larves du tabac. Les alcaloïdes tout d'abord, ont des effets bénéfiques sur la plante synthétisante dont ils régulent la croissance et le métabolisme interne végétaux, ils désintoxiquent et transforment les substances nocives au végétal, ils protègent la plante contre les rayons UV, comme ils ont des effets contre les herbivores (**Dih et Belguendouz, 2017**).

I.1.7. Pharmacologie des alcaloïdes

Les alcaloïdes présentent fréquemment des propriétés pharmacologiques marquées, beaucoup sont responsables de la toxicité des drogues qui les renferment. Les alcaloïdes ont de nombreuses utilisations en milieu thérapeutique, notamment au niveau du :

- Système nerveux central, qu'ils soient dépresseurs (morphine) ou stimulants (caféine);
- Système nerveux autonome: sympathomimétiques (éphédrine), parasympholytiques (pilocaprine), anticholinergiques (atropine);
- Système cardiovasculaire (quinine).

On notera aussi l'existence d'antitumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, d'anesthésiques locaux,....

Selon certains auteurs, les alcaloïdes peuvent intervenir avec des effets répugnant, inhibiteur ou toxique contre les microorganismes et les animaux. L'effet toxique peut être grave, que ce soit chez l'homme ou bien l'animal, selon la structure des alcaloïdes impliqués. Les symptômes d'intoxication restent les mêmes qu'en cas de surdose médicamenteuses: rougeur de la face, soif intense, tachycardie, mydriase et état nausée eux avec fatigue. Il peut même y avoir coma et arrêt respiratoire (**Chebili, 2012**).

I.1.8. Les alcaloïdes comme agents antimicrobiens

Les activités antibiotiques sont communes aux alcaloïdes et sont même utilisés comme antiseptiques en médecine (**Allaoua et Lamriben, 2017**).

La plupart des organismes sont menacés par des infections de microorganismes que ce soit bactéries ou champignons. Les plantes supérieures font face aussi à cette attaque à cause de leur contact directe avec le sol qui contient presque tous les germes.

Les alcaloïdes sont des substances actives, ils peuvent agir contre des bactéries, des champignons et même des virus. Divers essais *in vitro* et sur des animaux, menés au cours des années 1970 et 1980, ont démontré que l'alcaloïde de la berbérine avait une activité antibiotique à large spectre contre plusieurs variétés de bactéries et champignons pathogènes.

Ceux-ci sont impliqués dans de nombreuses infections courantes chez l'humain (staphylocoques, streptocoques, *E. coli*, chlamydia, diphtérie, salmonelle, choléra, pneumocoque, Pseudomonas - otites notamment -, dysenterie, candidose, etc.).

Par ailleurs, l'activité antivirale des alcaloïdes n'est pas négligeable. Elle a été mise en évidence à travers des études *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs virus tels que celui de l'influenza H1N1 (**Chebili, 2012**).

Chapitre 2.
Généralités sur l'espèce
Pergularia tomentosa

I.2.1. Présentation de famille des Asclépiadacées

Importante famille tropicale, qui est peu représentée au Sahara septentrional mais compte déjà une dizaine d'espèces dans le Sahara central. Ce sont des plantes vivaces, de port très variable, à feuilles simples généralement opposées, parfois par trois, à tissu sécrétant un latex; les fleurs sont régulières de type 5mais présentent des particularités de structure curieuses. Les filets des étamines portent du côté externe des appendices de forme variée, le plus souvent en languette, dont l'ensemble est appelée *couronne*, les étamines elles-mêmes sont soudées en partie à la région stigmatique de l'ovaire et l'ensemble forme un organe spécial appelé *gynostège*. Le pollen n'est pas pulvérulent mais aggloméré sous forme de masses correspondant chacune au contenu d'une loge d'anthère et que l'on appelle *pollinies*; il est transporté par les insectes grâce à des dispositifs spéciaux. L'ensemble de ces caractères rappelle beaucoup ce que l'on observe chez les Orchidées. Le pistil comprend deux carpelles qui sont libres ou presque libres dans leur partie ovarienne et soudés entre eux au niveau du style et du *gynostège*; ce dernier se termine par un plateau pentagonal situé au centre même de la fleur. Au cours de la maturation, les carpelles se séparent complètement et le fruit comprend un ou deux follicules, suivant que les deux carpelles se développent ou que l'un des deux avorte; les graines sont nombreuses et généralement pourvues d'une aigrette de poils (Bouhamdi, 2012).

I.2.2. Généralité sur *Pergulariatomentosa* L.

Pergularia tomentosa L. fait partie de la famille des asclépiade (Asclépiadaceae) qui comporte environ 200 genres et 2500 espèces, essentielles herbacées ou buissonnantes propres aux régions tempérées et subtropicales. Cette famille est connue par sa richesse en cardénolides, notamment les genres: *Asclépias*, *Pergularia*, *Gomphocarpus* (Rebouh et Belkhirat, 2016).

I.2.2.1. Noms vernaculaires

Pergularia vient du latin "Pergula" qui signifie « vigne » en raison de la capacité de la plante à s'accrocher. *Tomentosa* signifie poilu: la plante est couverte de petits poils qui lui donnent sa couleur verdâtre. *Pergularia tomentosa* L. Cette espèce est également connue sous une dénomination synonyme: *Daemiacordata*. Et possède de nombreux noms folkloriques:

Arabe : En Algérie *Pergularia tomentosa* L. est connue sous le nom de Tellakh, en Egypte et en Arabie Saoudite, elle est connue sous le nom Ghalaka, et Ghoulga, Demya, leben el Hamir et Kalga, au Maroc elle est appelée Elhalga.

Targui : tashkat, dellakal, tellakh.

Français : Pergulaire.

Anglais : *Pergularia* (Rebouh et Belkirat, 2016).

I.2.2.2. Position systématique de *Pergularia tomentosa* L.



Figure 2: *Pergularia tomentosa* L. (Tlili, 2015).

Embranchement: Spermaphytes.

Sous Embranchement: Angiospermes.

Classe: Dicotylédones.

Sous classe: Rosidae.

Ordre: Gentianales.

Famille: Asclepiadaceae.

Genre: *Pergularia*.

Espèce: *Pergularia tomentosa* L. (Mesbahi, 2011).

I.2.3. Description botanique de *Pergularia tomentosa*

C'est une plante herbacée ou semi-ligneuse, arbrisseau vivace pouvant dépasser 1m d'hauteur. Les jeunes rameaux volubiles s'enroulent fréquemment autour des plus anciens lui donnant un aspect touffu, contenant :

- **Un latex:** blanc, corrosif qui peut endommager la peau.
- **La tige:** couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile, tomenteuse à l'état jeune.
- **Les feuilles:** Opposées, vert amande, ovales ou arrondies, en cœur à la base, caractérisée par l'absence des stipules et pétiole de 0,5 à 1,5cm de long.
- **L'inflorescence:** En grappes abondantes au bout de longs pédoncules;
- **Les fruits:** Composés de deux follicules, portent de petites pointes;
- **Les fleurs:** bisexuées, régulières, parfumées; 5-mères. Sépales et pétales plus ou moins soudés à la base. Corolle rotacée ou campanulacée, doublée d'une paracorolle à 5 pièces, en général d'origine staminale. Etamines 5 à anthères sessiles, en général adhérentes au stigmate, souvent déhiscentes en pollinies.
- **Les graines:** ovoïdes, aplaties, de 7-9 mm environ 6 mm, bords pales, à poils courts denses, munies d'une touffe de poils à une extrémité, d'environ 3 cm de long.
- **Période de végétation:** Floraison en printemps (Tili, 2015).



Figure 3: fleurs, feuilles et fruits de *Pergularia tomentosa* L. (Al-mekhlafi et Masoud, 2017).

I.2.4. Distribution géographique

Pergularia tomentosa L. est une plante vivace des pays secs. Elle pousse sur les sols généralement sableux et couvre de vastes régions allant du sud Algérien jusqu'en Afrique du nord. Sa présence est relevée dans quatre compartiments phytogéographiques qui vont du climat sud-sahélien au climat nord-sahélien. Elle fleurit en saison sèche, sa souche vivace pousse en saison des pluies et donne une plante feuillue (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

I.2.5. Compositions biochimiques de *Pergularia tomentosa* L.

Les études phytochimiques menées sur le *Pergularia tomentosa* montrent la présence de métabolites primaires et secondaires.

I.2.5.1. Métabolites primaires

Sont directement impliqués dans les processus indispensables au développement normal et à la reproduction de la cellule de l'organisme: les glucides, les lipides, les protéines (**tableau III**) (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

Tableau III: Composition en métabolites primaires des différentes parties de *Pergularia tomentosa* (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

Organe végétal	Lipides (%)	Protéines (%)	Glucides (%)
Feuilles	6,83 ± 0,76	6,39 ± 0,17	53,27 ± 1,75
Tiges	2,17 ± 0,76	4,74 ± 0,14	56,92 ± 1,27
Racines	2,67 ± 0,29	3,35 ± 0,48	61,31 ± 2,84

I.2.5.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des produits à structures chimiques souvent complexes, très dispersés et différents selon les espèces; ils sont produits en très faibles quantités, ils existent plus de 20 000 métabolites secondaires classés selon leurs structures chimiques (**Bouhmama, 2013**). Ce sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. *Pergularia tomentosa* est connu par son contenu en molécules biologiquement actives tels que les polyphénols:

flavonoïdes, tanins, glycosides cardiaques, les glycosides cyanogènes, des saponines, (tableau IV) (Rebouh et Belkirat, 2016).

Tableau IV: composition en métabolites secondaires des différents organes de *Pergularia tomentosa*. (Rebouh et Belkirat, 2016).

Organe végétale	Métabolites secondaires
Feuilles	alcaloïdes, glycosides cardiaques, les glycosides cyanogènes,
Tiges	des saponines, des flavonoïdes, des tanins. Glycosides cyanogènes
Racines	Glycosides cardiaques Des saponines, des tanins

I.2.6. Usages traditionnels

- Cette plante est utilisée pour le tannage, écrasée et étalée sur la peau. Elle fait tomber les poils rapidement. A cet effet on pile la plante et on étend la pâte ainsi obtenue sur la peau: après quelques heures de contact un simple grattage fait tomber très facilement les poils (Bouhamdi, 2012).
- L'extrait de lait des feuilles de *Pergularia tomentosa* a été utilisé dans le traitement des maladies de peau, telles que la teigne (Al-mekhlafi et Masoud, 2017).
- Plante également utilisée contre les morsures de serpent (Bouhamdi, 2012).
- *Pergularia tomentosa* entraîne la disparition ou la rareté des espèces telles *Schoenefeldia gracilis*, *Alysicarpus ovalifolius*, *Brachiaria rmosa* qui sont toutes de bonnes plantes fourragères.
- Cette plante est peu consommée à l'état vert. Parce qu'elle entraîne des intoxications.
- Les morsures vénéneuses sont lavées avec de l'eau dans laquelle on a fait tremper des feuilles et des tiges pilées de *Pergularia tomentosa* (Bouhmama, 2013).
- L'augmentation de potassium alimentaire diminue la pression artérielle chez l'homme et réduit le risque d'accident vasculaire cérébral. Ainsi, le maintien d'un apport élevé en potassium peut être atteint en consommant les tiges et les racines de *P. tomentosa*.
- La plante est aussi utilisée contre les bronchites et les hémoptysies et la tuberculose, à cet effet on récolte la racine et on la conserve fraîche à l'abri de l'air.

- A l'état sec elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les douleurs dentaires et la fatigue générale.
- Elle constitue aussi un palliatif alimentaire pour le bétail pendant les moments difficiles de l'année. En perspective, la valorisation de cette espèce peut se diversifier lorsqu'on envisage son incorporation à une proportion acceptable dans la formulation des aliments pour bétail (**Bouhamdi, 2012**).

I.2.7. Activités biologiques et thérapeutiques de *Pergularia tomentosa* L.

I.2.7.1. Activité anti microbiennes

Les extraits aqueux et à plusieurs solvants organiques des feuilles, des tiges et des racines ont montré une activité antifongique contre une série de champignons pathogènes, tout comme une activité protectrice des organes chez le crapaud *Bufo regularis* infecté par *Aspergillusniger*. Des effets bactéricides et moluscicides ont également été répertoriés. Les extraits méthanoliques des parties aériennes, de même que les isolats de coroglaucigénine, de 16 α - acétoxyalotropine et de calactine, ont eu une activité de dissuasif alimentaire sur la légionnaire *Spodopteralitoralis* (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

Le mécanisme d'action des extraits de *P. tomentosa* contre les pathogènes fongiques peut être due à l'inhibition de la paroi des cellules fongique. Les flavonoïdes ont une forte activité antimicrobienne. Ils peuvent inhiber des *Streptococcus mutans* et d'autres bactéries (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

I.2.7.2. Activité anti oxydante

Les magnésiums sont des micronutriments antioxydants et leur présence pourrait donc stimuler le système immunitaire, et aider à éliminer les carences en magnésium qui pourraient conduire à de graves troubles métaboliques et de compromettre la santé de l'organisme (**Bouhamdi, 2012**).

I.2.7.3. Activité molluscicide

Les cardénolides de *Pergularia tomentosa* L trouvés dans ses extraits sont toxiques pour les escargots terrestres, et aussi pour les mammifères (**Bouhmama, 2013**).

I.2.7.4. Activité cytotoxique

Huit glycosides cardénolides ont été isolés à partir des racines de *Pergularia tomentosa* L pour étudier l'activité potentielle contre les cancers, ces composés testés in vitro

ont montré l'inhibition de croissance de cellule de différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, et pour leur capacité à inhiber la Na^+ / K^+ Activité ATPase.

Les résultats obtenus suggèrent que les caractéristiques structurales des cardénolides étudiés ont des propriétés spécifiques cytotoxiques (**Bouhamdi, 2012**).

I.2.7.5. Larvicide

Les alcaloïdes (extraits de la partie aérienne) ont un effet larvicide considérable avec un taux de mortalité dépendant de la dose. D'autre part, ils sont également décrits comme antifeeding, causant la perte de poids des larves avec une réduction de la teneur en protéines et en glucides. Ces résultats indiquent que *P. tomentosa* peut être un agent prometteur naturel pour le contrôle des larves de criquets (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

I.2.7.6. Antidermatophytique

La présence des tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, glycosides, saponin glycosides, cardiac glycosides, anthraquinones et stéroïdes dans composition de *P. tomentosa* peut être responsable de l'activité antidermatophytique présentées par les plantes contre la plupart des dermatophytes testés (**Bouhmama, 2013**).

I.2.7.7. Anti tumorale

Les effets inhibiteurs de ghalakinoside sur les taux d'acide urique, Ca^{2+} , GGT, ALP et la LDH sont en faveur de son potentiel anti-tumoral. Des glycosides cardénolides isolée des racines de *P. tomentosa* ont été testés dans un essai *in vitro* d'inhibition de la croissance de souches cancéreuses. Cela comprenait six différentes lignées cellulaires humaines de cancer, et pour leur capacité à inhiber la Na^+ / K^+ , activité ATPase, en plus des modifications morphologiques induites dans des lignées cellulaires de cancer humain (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

Chapitre 3.

Méthodes d'analyses des

alcaloïdes

I.3.1. Détection et caractérisations des alcaloïdes

Les tests de caractérisation sont basés sur une extraction simple et rapide. Le plus généralement. On précipite les alcaloïdes par des réactifs généraux des alcaloïdes. L'extraction préliminaire, peut-être une extraction classique qui consiste à une macération rapide dans un alcool: la solution alcoolique est évaporée et le résidu repris par de l'eau acidifiée; après filtration les alcaloïdes sont recherchés dans le filtrat (**Mamadou, 2011**).

Un autre test consiste à réaliser une caractérisation dans de l'eau acidifiée; après filtration les alcaloïdes sont éventuellement révélés dans le filtrat par les réactifs généraux des alcaloïdes. Si la présence des alcaloïdes est douteuse, il faut alcaliniser la solution dans un milieu basique dilué (à moitié par exemple) puis l'extraire par un solvant chloré. Ainsi, le résidu obtenu est repris par l'eau acidifiée et la présence des alcaloïdes est révélée par les réactifs généraux des alcaloïdes (**Mamadou, 2011**).

Ces réactions générales de précipitation sont fondées sur la capacité qu'ont les alcaloïdes de se combiner avec des métaux et des métalloïdes: bismuth, mercure, tungstène, iode. Dans la pratique, on emploie la solution iodo-iodurée. Le tétraiodomercurate de potassium connu sous le nom de réactif de MAYER (qui donne des précipités blanc-jaunes) et le tétraiodobismuthat de potassium, plus connu sous le nom de réactif de DRAGENDORFF (coloration rouge-orangée). Il est également possible d'utiliser le réactif silico-tungstique (mélange d'oxydes de tungstène et de silicium) ou des solutions d'iodo-platinates alcalins. La spécificité de ces réactifs n'est pas absolue : des protéines, des α -pyrones, certaines coumarines et des hydroxyl-flavones, des lignanes et autres composés peuvent donner des réactions faussement positives avec le réactif de DRAGENDORFF (**Mamadou, 2011**).

D'autres réactifs peuvent être utilisés pour mettre en évidence les alcaloïdes, notamment ceux qui donnent des réactions colorées caractéristiques de groupes d'alcaloïdes:

- Le paradiméthylaminobenzaldéhyde pour les alcaloïdes de l'ergot de seigle;
- Le sulfate de cérium et d'ammonium qui différencie les indoles (jaunes), les dihydroindoles (rouges), les β -anilinoacrylates (bleus), les oxindoles;
- La ninhydrine pour les arylalkylamines;
- La réaction de Vitali-Morin pour les esters de l'acidetropique;
- Les réactifs au chlorure ferrique en milieu chlorhydrique (tropolones) ou perchlorique (*Rauwolfia*).

Les réactions citées ci-dessus permettent de caractériser la présence des alcaloïdes, mais sont insuffisantes pour vérifier l'identité d'une drogue; elles ne donnent pas non plus de renseignements sur la composition d'un mélange (**Mamadou, 2011**).

I.3.2. Extraction des alcaloïdes

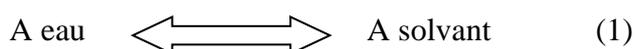
Les alcaloïdes existent, dans les plantes, sous forme saline. L'extraction des alcaloïdes repose, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part (**Mamadou, 2011**).

I.3.3. Types d'extraction des alcaloïdes

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne (**Benabdallah, 2016**).

I.3.3.1. Extraction liquide-liquide

Elle est basée sur la solubilité différentielle d'une même substance dans deux solvants non miscible. Dans le cas où l'un des solvants est constitué par l'eau, le second doit être un liquide de faible constante diélectrique, solvant organique inerte de préférence, comme le tétrachlorure de carbone, le benzène, le cyclohexane ou le chloroforme. Soit «A» une substance soluble à la fois dans l'eau et un autre solvant, à l'équilibre hétérogène de partage de A entre les phases liquides (**Benabdallah, 2016**).



On définit la constante d'équilibre D, coefficient de partage de la substance A entre le solvant et la phase aqueuse.

$$D = [A]_{\text{eau}}/[A]_{\text{solvant}} \quad (2)$$

L'extraction liquide-liquide est une méthode de choix pour la séparation de liquide lorsque la distillation ou la cristallisation ne sont pas possible ou trop difficiles. Deux opérations distinctes doivent être effectuées pour réaliser une extraction liquide-liquide.

- Le mélange intime des deux phases par brassage (agitation),
- La séparation des deux phases par décantation.

La durée d'agitation est régie par la cinétique de transfert de soluté vers la phase organique pour atteindre une concentration d'équilibre, tandis que la durée de décantation

est conditionnée par le temps de séparation des deux phases non miscible (**Benabdallah, 2016**).

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide.

a- Extraction liquide-liquide discontinue

Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter. Il existe plusieurs modèles d'ampoules à décanter (**Figure 4**). Celles ayant la tubulure au-dessus du robinet sont les plus utilisées, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc de mieux séparer les deux phases (**Benabdallah, 2016**).

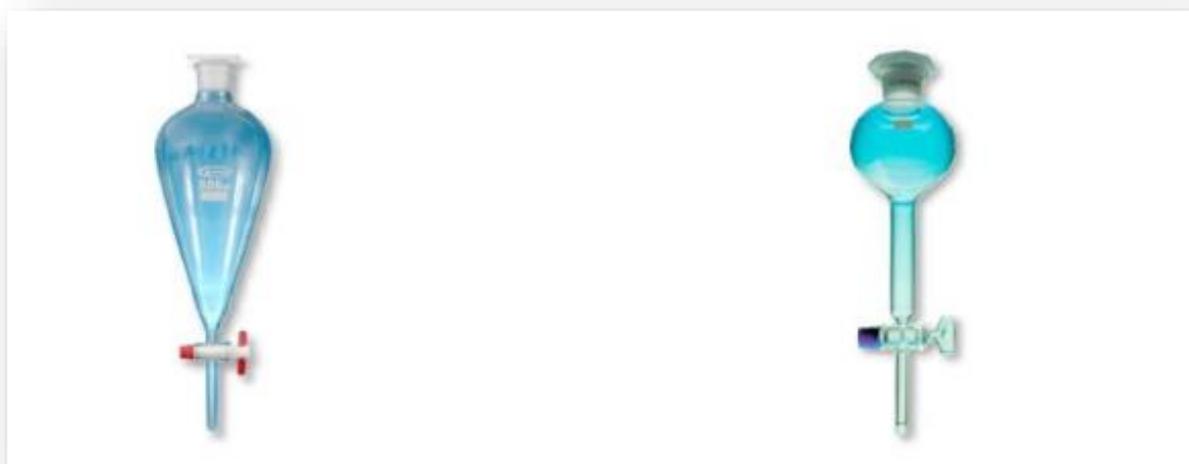


Figure 4: Les différents types d'ampoule à décanter (**Benabdallah, 2016**).

b- Extraction liquide-liquide continue

On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire (**Benabdallah, 2016**).

I.3.3.2. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide (**Benabdallah, 2016**).

Pratiquement, il est impossible de dissoudre un seul composé, d'autres constituants de la phase solide ont été entraînés avec lui, quel que soit le solvant utilisé. En laboratoire de chimie organique, on utilise parfois des appareils plus efficaces, les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa, qui fonctionnent en continu (**Figure 5**) (**Benabdallah, 2016**).

a- Techniques de dissolution

- ✓ Il faut avant tout réduire le prélèvement en fines particules ce qui favorise l'action du solvant en augmentant la surface de contact.
- ✓ Il est possible de procéder en continu ou effectuer des phases successives d'extractions suivies de filtration ou de centrifugation (**Benabdallah, 2016**).

Extracteur de Soxhlet	Extracteur de Kumagawa
	
<p>L'extracteur de Soxhlet est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur: Franz Von Soxhlet.</p>	<p>Très proche de l'extracteur de Soxhlet, le Kumagawa a l'avantage de pouvoir être utilisé à des températures bien supérieures et d'être moins encombrant grâce à la cartouche incorporée dans le porte ballon.</p>

Figure 5: Les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa (**Benabdallah, 2016**).

b- Principe d'extraction par soxhlet

Un extracteur Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue d'un solide par un solvant (**figure 6**) Il se compose d'un corps en verre dans lequel est placé une cartouche en papier filtre épais, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction. Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction, Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (**Hamidi, 2013**).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps en verre, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits (**Hamidi, 2013**).

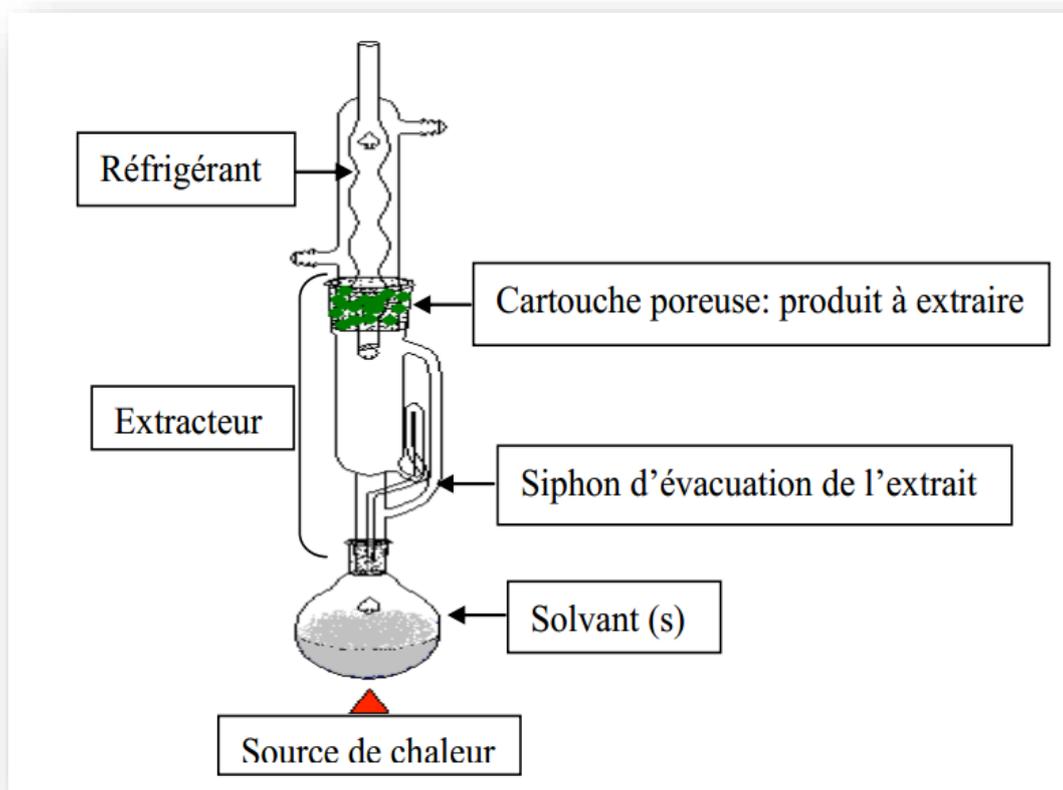


Figure 6: Un appareil de Soxhlet (**Hamidi, 2013**).

I.3.3.3. Extraction par ultrasons (sonication)

Les ondes ultrasons ont une fréquence allant de 16 KHz à 1GHz et sont inaudibles par les humains. Les vibrations dues aux ultrasons sont la source d'énergie permettant le re-largage des métabolites dans les matrices complexes. Le phénomène principal durant la sonication est la création de cavités (plus particulièrement la création et l'effondrement de ces cavités), la friction et l'accroissement des débits de diffusion (Grégory, 2009).

I.3.3.4. Méthode de (Stas-Otto)

La matière végétale pulvérisée est soumise à un lavage à l'éther de pétrole et basifiée par ajout de l'ammoniaque (NH₄OH) pendant une nuit afin de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines. Les bases ainsi libérées sont ensuite solubilisées dans du chloroforme pendant une nuit, puis concentrées sous pression réduite. Le résidu sec est dissous dans du H₂SO₄, l'opération est répétée au tant de fois qu'il est nécessaire. La solution est basifiée par NH₄OH jusqu'à PH= 9, puis on procède à une nouvelle extraction par le chloroforme dans une ampoule à décanter quatre fois pour l'épuisement totale de la phase aqueuse. L'extrait de chloroforme est traité par du sulfate de sodium anhydre NaSO₄ pour éliminer toutes traces d'eau, une fois filtré l'extrait est concentré et évaporé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif pour obtenir les alcaloïdes totaux (Dehak, 2013).

I.3.4. Les techniques d'études physico-chimiques

I.3.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatogrammes sur couche mince (CCM) permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Elles sont composées d'un support en aluminium ou en verre sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu de sorption (par exemple la silice SiO₂) comme phase stationnaire. Ces plaques sont plongées d'environ 0,5 cm dans une phase mobile. Cette dernière est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherchée. Les composés déposés à environ 1 cm du bas de la plaque sont alors humectés et dissous par la phase mobile qui progresse par capillarité le long de la phase stationnaire. Selon la nature des phases mobiles et stationnaires, chaque constituant du mélange à analyser migre d'une certaine hauteur (Milcard, 2013).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Les systèmes de solvants les plus couramment employés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante):

- Toluène/ Méthanol (95:5) + 200 µL de NH₄OH.
- Dichlorométhane / Méthanol (90:10) + 200 µL de NH₄OH.
- Butanol/ acide acétique/ eau (4/1/5).
- Chloroforme/ ammoniaque/ méthanol (8/1.5/0.5).

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et sont souvent adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse (**Milcard, 2013**).

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant révélation (par le révélateur des alcaloïdes) au réactif de DRAGENDORFF. L'utilisation du réactif de DRAGENDORFF permet également de rassembler judicieusement les fractions récoltées suite aux différentes chromatographies (**Milcard, 2013**).

I.3.4.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) combine les avantages de ces deux techniques, à savoir:

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): haute sélectivité et efficacité de séparation,
- MS (Mass Spectroscopy): informations structurales et sélectivité encore augmentée (**Milcard, 2013**).

I.3.4.3. La Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique de chromatographie moderne pour la séparation des produits naturels d'origine végétale. C'est une méthode chromatographique liquide/liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système bi-phasique de solvants. D'une manière simplifiée, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partages reliées entre-elles par des capillaires (**Milcard, 2013**).

I.3.4.4. La Chromatographie Flash

La chromatographie Flash est une technique de fractionnement et de séparation rapide et peu coûteuse pour la purification de produits de synthèse organique ou d'extraits naturels. La séparation se fait comme sur une chromatographie liquide à pression atmosphérique, néanmoins la colonne de silice étant sous pression (1-2 bar), la purification par rapport à un système équivalent à pression atmosphérique est meilleure, beaucoup plus rapide et il est possible de traiter une quantité plus élevée d'échantillon. Dans cette technique, le support chromatographique, qui peut être de la silice normale ou de la silice en phase inverse, est conditionné dans des cartouches. Les échantillons à purifier sont injectés sous forme liquide directement sur la colonne ou sous forme solide par adsorption préalable à de la silice (Milcard, 2013).

Partie II.

Expérimentale

Chapitre 1.

Matériels et méthodes

II.1.1. Matériels

II.1.1.1. Matériel végétal

La plante étudiée *Pergularia tomentosa* L, a été récoltée durant le mois d'Avril 2017 dans la région Méguibra (El-Oued).

Au laboratoire, les feuilles sont séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière. La poudre sera utilisée dans les différentes analyses ultérieures.

II.1.1.2. Matériels de laboratoire

Nous avons utilisé les appareils suivants:

- pH mètre ;
- Balance électronique;
- Rotavapeur ;
- Etuve ;
- Plaque chromatographie sur couche mince ;
- Spectrophotomètre UV-Visible ;
- Ampoule à décantation ;
- Plaque chauffante ;
- Soxhlet.

Un certain nombre d'accessoires et petit matériel spécifique est utilisé dans le cadre de cette étude : Micropipettes, Spatule, Coton, Papier à filtre, gants et masques pour manipulation des produits dangereux et différents types de verrerie (bêchers, fioles jaugées, Ballons, pipettes graduées, tubes à essais, Erlenmeyers, burette...).

II.1.1.3. Produits chimiques

L'eau distillée, Méthanol, Chloroforme, Ammoniaque, Dichlorométhane, Ether de pétrole, Butanol, Acide acétique, Acide sulfurique, Sulfate de sodium, Réactif de DRAGENDORFF, DPPH, vitamine C (Acide ascorbique), DMSO, Gentamicine, Augmentine.

II.1.2. Méthodes analytiques

II.1.2.1. Test phytochimique

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des composés azotés en particulier les alcaloïdes, La mise en évidence s'effectue par des tests phytochimiques réalisés généralement sur des extraits déjà préparés (par épuisement à chaud ou par macération) ou directement sur la poudre d'échantillon à analyser.

Les réactions de caractérisation qualitative basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ont été effectuées.

A 1 ml de l'extrait, 5ml d'HCl 1% sont ajoutés. Le mélange est chauffé au bain marie, puis divisé en deux volumes égaux. Les 2 volumes sont traités séparément par le réactif de DRAGENDORFF (réactif à l'iodobismutate de potassium) qui donne une précipitation jaune blanche.

II.1.2.2. Extraction des alcaloïdes totaux (Mamadou, 2011)

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des feuilles du *Pergularia tomentosa* est obtenue par une extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin dans l'eau d'une part et d'autre part dans les solvants organiques.

- 80 g de matériel végétal ; poudre de feuilles du *Pergularia tomentosa* est délipidée par 300 ml d'éther de pétrole par macération et sous agitation mécanique à température ambiante pendant 24 heures.
- Après filtration, le marc est alcalinisé par une solution de 30 ml d'ammoniaque (0.5N) pendant au moins 24 heures à température ambiante permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique.
- Les alcaloïdes totaux sont extraits par l'extracteur de Soxhlet en utilisant un solvant non miscible avec l'eau, La poudre alcalisée est placée dans le Soxhlet fixée sur un ballon contenant 500 ml de dichlorométhane et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal.
- La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté, Au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des feuilles.

- A l'issue de cette opération, l'extrait brut est lavé trois fois successives par une solution de 150 ml d'acide sulfurique (0.5N) pour chaque volume, les trois fractions sont reprises dans une ampoule à décantation, alcalinisées jusqu'à pH 9 par ajout de quelques ml d'ammoniaque (0.5N).
- Nous épuisons ensuite trois fois la solution par 150 ml de chloroforme, en agitant doucement l'ampoule à chaque fois.
- Nous récupérons les trois fractions organiques dans un Erlenmeyer, qui seront déshydratées par filtration sur papier filtre soutenant du sulfate de sodium anhydre.
- L'extrait recueilli dans un bêcher taré est évaporé à sec par rota-vapeur.

Calcul de rendement

Nous pouvons déterminer le rendement des extraits alcaloïdes secs des feuilles de *Pergularia tomentosa* en calculant le rapport suivant

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

- P1: poids du ballon après évaporation;
- P2: poids du ballon vide;
- P3: poids de la matière végétale de départ.

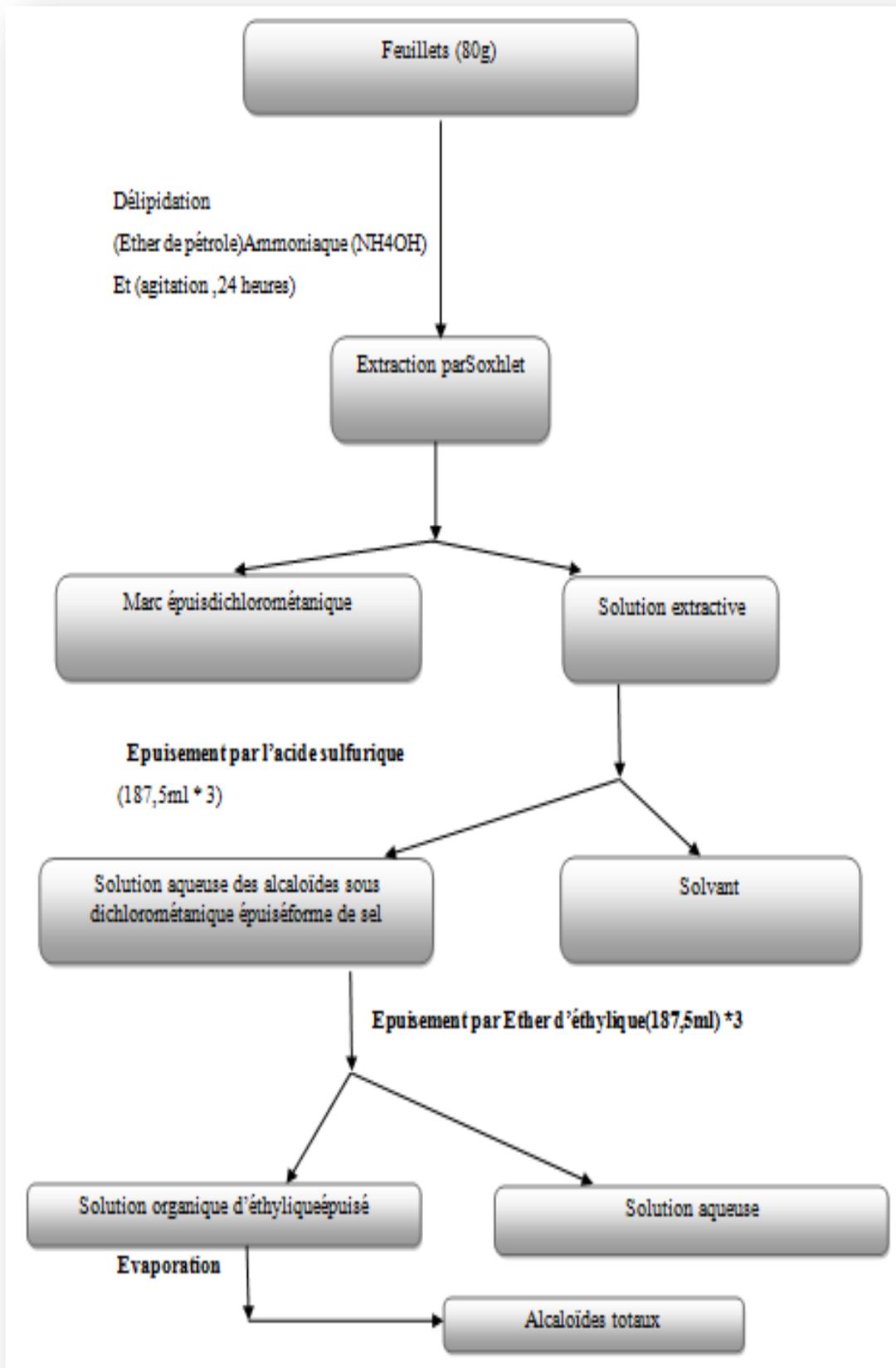


Figure 7: protocole d'extraction des alcaloïdes totaux à partir des feuilles de *Pergularia tomentosa* (Mamadou, 2011).

II.1.2.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silica gel 60F-254, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur des feuilles d'aluminium, ce qui constitue la phase stationnaire. Sur les plaques commercialisées, on a déposé 5 µL de l'extrait (8 mg/ml dans le méthanol) et ensuite introduits dans des bécher en verre recouvert contenant la phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Dans notre cas, deux systèmes de solvants ont été utilisés. Nous avons utilisé deux systèmes mobiles différents

- Butanol/acide acétique/eau (4/1/5)
- Chloroforme/ammoniaque/méthanol (8/1.5/0.5)

Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées sous lampe 365 nm, pulvérisées par DRAGENDORFF, puis séchées à 37°C pendant 10 minutes à fin de révéler les spots obtenus.

Le rapport frontal (R_f) est déterminé pour chaque constituant comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

II.1.3. Évaluations des activités biologiques

II.1.3.1. Activité antioxydante : Test de piégeage du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité anti radicalaire de notre extrait, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par (Bouhamdi, 2012). Le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène. Le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine).

a- Préparation de dilutions d'extrait

Des dilutions dans méthanol va préparer à partir de l'extrait brute (solution mère 10 mg/ml) pour différentes concentrations de 8mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml.

En utilisant la formule suivante

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

- C_1 : Concentration de l'extrait dans 1 ml ;
- C_2 : Concentration voulu dans la dilution ;
- V_1 : Volume rechercher ;
- V_2 : Volume final.

Une fois le volume rechercher (V_1) est calculé. Le reste du volume est complété pour atteindre le volume final.

b- Mode opératoire

- Nous avons préparé une solution de DPPH (0.024 mg/ml) par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100ml de méthanol.
- Les tubes control contiennent à la place de l'extrait 50 μ l de méthanol et 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH fraîchement préparée.
- Les autres contiennent 50 μ l de différentes concentrations de l'extrait et 1.950 ml de solution de DPPH.
- Le mélange est laissé à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes et mesurée à 517 nm.

c- Expression des résultats

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante

$$\text{Activité antiradicalaire\%} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 12,5mg/ml. Alors que pour l'antioxydant standard (vitamine C) est comprises entre 0 et 0,1 mg/ml.

IC50 : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

II.1.3.2. Évaluation de l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion en milieu gélosé est utilisée pour rechercher l'activité antimicrobienne, Le milieu de culture utilisé est la gélose Mueller-Hinton.

- Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes.
- Nous avons utilisé des disques de papier Whatman de 4 mm de diamètre, Les disques ont été imprégnés dans l'extrait (5 mg/ml) dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde), ensuite déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne.
- La boîte est incubée à l'étuve à 37°C durant 24 heures.
- A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halotranslucide autour du disque, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

Les souches bactériennes testées arrivées à partir L'institut Pasteur, sont représentées dans le **tableau V**.

Tableau V Description des différentes souches microbiennes testées.

Espèce bactérienne	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli</i>	Bacilles à gram négatifs, la famille des entérobactéries, responsables des infections urinaires, septicémie méningite du nourrisson (Hammoudi, 2015) .	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Non mobiles, commensale du tube digestif, provoquent des infections urinaires ou respiratoires parfois compliquées de septicémies et des infections nosocomiales (Hammoudi, 2015) .	ATCC 700603
<i>Listeria innocua</i>	Petits bacilles à Gram positifs, mobiles à 20-25°C, à extrémités arrondies, elle responsable a Listériose de l'adulte et de l'enfant, Listériose de la femme enceinte et Listériose néonatale (Curie, 2003) .	CLIP 74915

On a utilisé deux antibiotiques différents comme références. Il s'agit de la Gentamicine (**GEN**) et Augmentine (**AUG**).

Chapitre 2.

Résultats et discussions

II.2.1. Test phytochimique

L'apparition d'une coloration, ou d'une précipitation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques (DRAGENDORFF) qui va affirmer la présence et / ou l'absence des alcaloïdes existant dans les feuilles de *Pergularia tomentosa*.

Le résultat est mentionné dans le **tableau VI**.

Tableau VI: Résultat des test phytochimique de feuille de *Pergulariatomentosa L.*

Groupe	DRAGENDORFF
Alcaloïdes	+

(+) : test positive.

Le résultat de test phytochimique a révélé la mise en évidence la présence des alcaloïdes dans notre extrait. Notons que des résultats similaires ont été obtenus sur la même espèce (**Bouhamdi, 2012 ; Bourmita et al., 2013**).

Les parties aériennes de *Pergularia tomentosa* se sont montrées riches en alcaloïdes, tandis que la partie souterraine caractérisé par l'absence totale des alcaloïdes (**Tili, 2015**).

Autre étude a montré que la même espèce se contient aussi différents métabolites secondaires tel que les tanins, flavonoïdes, polyphenoles et les terpenoides (**Rufai et al., 2015**).

La richesse de la plante *Pergularia tomentosa* en nombreux composés chimiques d'intérêt thérapeutique pourrait justifier ses nombreux usages en médecine traditionnelle.

II.2.2. Extractions des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des feuilles du *Pergularia tomentosa* se fait selon le protocole de **Mamadou (2011)**, nous a permis d'obtenir un extrait de couleur brun jaunâtre avec un rendement d'extraction de 0.5 %.

Notre résultat est similaire avec les travaux de **Khuzhaev et Aripova (1998)** sur *Arundo donax*. Aussi avec **Razzakov et al. (1998)** qui montre que le rendement des alcaloïdes dans *Mandragora turcomanica* est 0.22%, et **Allouni (2011)** qui trouve un taux d'alcaloïde 0.1% à partir des graines de *Datura stramonium*.

Nous avons comparé notre rendement avec d'autre plantes par **Shakirova et al. (2003)** sur les parties aériennes de *Petilium eduardi*. Cet auteur a montré que le rendement d'alcaloïde est 1.32% qu'est supérieure à notre résultat obtenus dans les feuilles du *Pergularia*

tomentosa L. Ces variations peuvent être justifiées par la répartition différentielle des métabolites secondaires peuvent être partiellement dues aux facteurs génotypes qui commandent l'accumulation de ces composés dans la plante (**Bouhamdi, 2012**). Aussi on a observé des rendements chez *Fumaria capreolata* et *Fumaria bastardii* allant respectivement jusqu'à 1,33% et 2,66%.

La méthode d'extraction adoptée et les réactifs spécifiques utilisés pouvant agir sur le rendement total d'alcaloïdes (**Bougoffa, 2006**).

II.2.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, cette technique informe sur le contenu en phytoconstitués en se basant sur les résultats analytiques (**Zeghouane, 2014**). Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour l'extrait brut alcaloïdique de feuilles de *Pergularia tomentosa* sur une plaque de gel de silice en utilisant deux systèmes :

- Chloroforme / méthanol / ammoniaque (8/0.5 /1.5) (v/v).
- Eau / acide acétique / butanol (5/1 /4) (v/v).

De ce fait nous avons procédé à la révélation avec le réactif DRAGENDORFF pour détecter la présence des spots de composés d'alcaloïdes dans l'échantillon.

Les spots sont visualisés avant et après révélation sous une longueur d'onde de 365 nm. Cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes.

Les rapports frontaux (R_f) des différents composés de plante étudiée dans la phase mobile (chloroforme / méthanol / ammoniaque) sont représentés dans le **tableau VII**.

Tableau VII: Résultats de CCM des extraits bruts des feuilles de *Pergularia tomentosa* (chloroforme / méthanol / ammoniaque).

Phase mobile: Chloroforme/ méthanol/ ammoniaque(8/0.5 /1.5) (v/v).			
Rf	Observation Visuel	UV à 365 nm	DRAGENDORFF
0.14	Vert	Bleu	Marron
0,3	-	Rouge	-
0,33	Vert	Bleu	Vert
0,83	-	Vert	-
0,95	Jaune	Bleu	Bleu

Les rapports frontaux (R_f) des différents composés de plante étudiée dans la phase mobile (eau / acide acétique / butanol) sont représentés dans **le tableau VIII**.

Tableau VIII: Résultats de CCM d'extrait alcaloïde des feuilles de *Pergularia tomentosa* (eau / acide acétique / butanol).

Phase mobile : Eau / acide acétique / butanol(5/1 /4) (v/v).			
Rf	Observation Visuel	UV à 365 nm	DRAGENDORFF
0.18	-	Bleu	Marron
0.92	Vert	Violet foncé	Marron

Les résultats de l'analyse chromatographique ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes. L'extrait bruts semblent avoir des différents types des alcaloïdes,

mais avec des concentrations différentes selon l'intensité des tâches obtenues. Ce qui confirme la richesse d'extrait en cette métabolite secondaire.

La plaque de CCM de système de chloroforme/ méthanol/ ammoniaque (**figure 8**) visualisés sous UV à 365nm révèle cinq tâches différentes, alors que le système de l'eau / acide acétique / butanol (**figure 9**) montre seulement deux tâches.

Le système de migration constitué de chloroforme; méthanol et ammoniaque a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots.

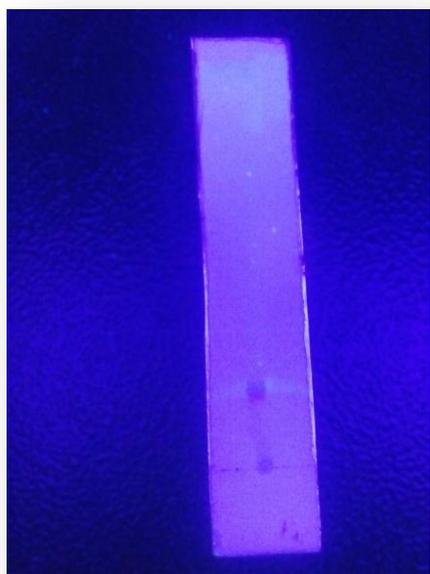


Figure 8: chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de *Pergularia tomentosa* de système de chloroforme/ méthanol/ ammoniaque (5/1/4) (v/v).

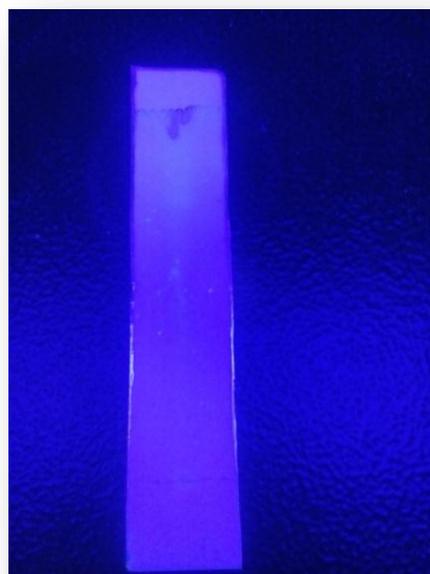


Figure 9: chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de *Pergularia tomentosa* de système eau / acide acétique / butanol (8/0.5/1.5) (v/v).

On a comparé notre résultat avec d'autre espèce dans la même famille (Asclepiadaceae), **Seck et al. (2015)** indique que Le screening phytochimique d'extrait des racines de *Leptadenia hastate* qui réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) ne présence aucun tâche des alcaloïdes.

Par comparaison avec d'autre espèce, **Madiélé et al.(2014)** montre que la chromatogramme d'extrait d'alcaloïde de *Enantia chloranthes* fait ressortir sept taches à

différents couleurs, alors que **Sanogo et al. (2014)** se trouve seulement quatre taches au niveau de chromatogramme d'extrait d'alcaloïde de *Argemone mexicana L.*

En général, les constituants chimiques diffèrent selon la partie de plante aussi d'une espèce à l'autre (**Bougar et Belkacem kourmi, 2016**). Comme en peut expliquer ces différences par le variabilité de solubilité des alcaloïdes dans les différentes systèmes des phases mobiles, selon **Dehak (2013)** les alcaloïdes en générale sont solubles dans les solvants organiques par une ordre de solubilité chloroforme > acétone > éthanol > méthanol > éthyl acétate > éther > n-hexane, alors que Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires, sauf rares exception (**Afoun et Ammour, 2017**).

Les analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince (CCM) seulement est insuffisante pour identifier exactement les différents types des alcaloïdes constituent dans notre extrait, pour bonne identification il faut ajouter des analyses par des techniques plus développé tell que CLHP et RMN.

II.1.2.4. Evaluation des activités biologiques

a- Test de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait d'alcaloïde est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été défini comme une concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC₅₀ sont déterminés graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration des extraits et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

A des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé, l'acide ascorbique (**Figure 10**), il a montré une activité antiradicalaire puissante avec de IC₅₀ de $1.077 \pm 0,213$ mg/ml. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

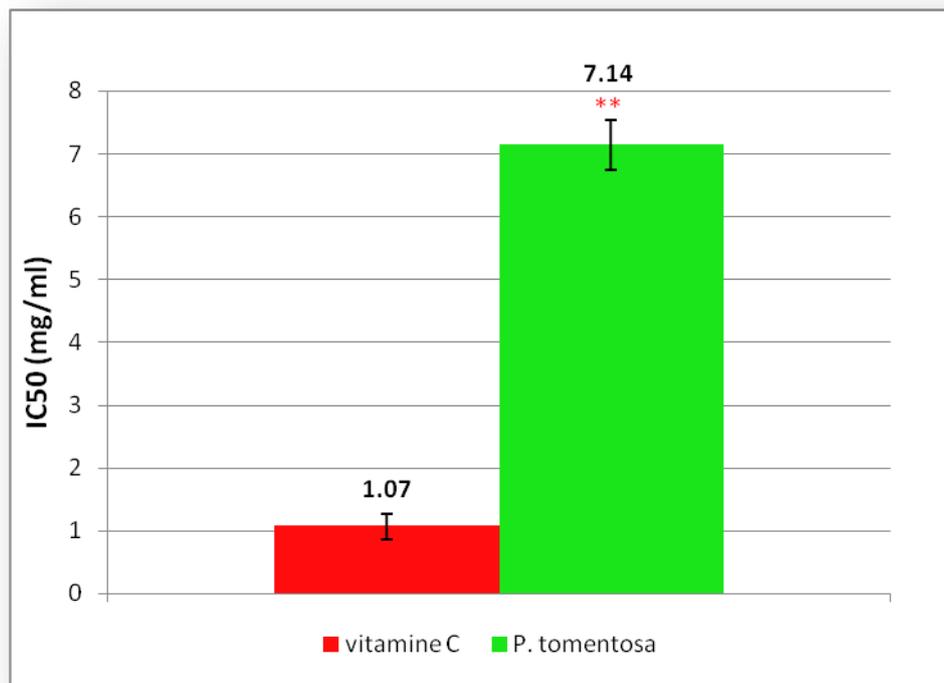


Figure 10: Histogramme des résultats d'activité antioxydante.

Nous notons que la valeur obtenue par notre extrait est comparable à celle de l'acide ascorbique. Une analyse de variances ANOVA (Minitab 17) a été faite dans le but de comparer entre l'activité de notre extrait et le pouvoir antiradicalaire de l'acide ascorbique (**figure 11**). Cette analyse montre une différence hautement significative ($p < 0.01$) des alcaloïdes par rapport aux l'acide ascorbique.

En comparant l'IC50 des alcaloïdes totaux (7.14 mg/ml) avec celle de l'acide ascorbique (1.07 mg/ml). Nous remarquons qu'elle est faible et donc l'extrait des alcaloïdes totaux présente une activité antioxydant modéré.

Nous avons comparé nos résultats avec des travaux portés sur les feuilles d'autres espèces végétales. **Mezouar (2013)** ont montré que le IC50 de l'extrait des alcaloïdes des *Berberis vulgaris* (2.80 mg/ml) présentent un pouvoir antioxydant supérieur de celui de notre extrait. De même que **Bouhamdi (2012)** ont trouvé de IC50 d'extrait des feuilles du *Pergularia tomentosa* égale 1.782 mg/ml très largement supérieur pouvoir antiradicalaire.

Si nous comparons nos résultats avec un autre organe *Fredolia aretioides*, on trouve que l'IC50 de l'extrait alcaloïdique des racines est de 0,54 mg/ml (**Bentabet et al., 2014**), ce qui est une valeur inférieure à celle de notre extrait. Les racines de *Fredolia aretioides* présente donc une forte activité par rapport à notre feuille du *Pergularia tomentosa*.

Bettaieb et al. (2017) montre que l'activité antiradicalaire a des variations statistiquement significatives en fonction de l'organe.

Des études antérieures ont montré un effet antioxydant différents des extraits de *Pergularia tomentosa* issues de diverses régions, l'activité antioxydant est différent entre les espèces des plantes végétale (**Tlili, 2015**).

b- Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait brut des alcaloïdes totaux des feuilles de *Pergularia tomentosaa* été faite par la méthode de diffusion des disques.

- Contre *Listeria innocua*

Les diamètres des zones d'inhibition contre *Listeria innocua* sont indiqués dans la **figure 11**.

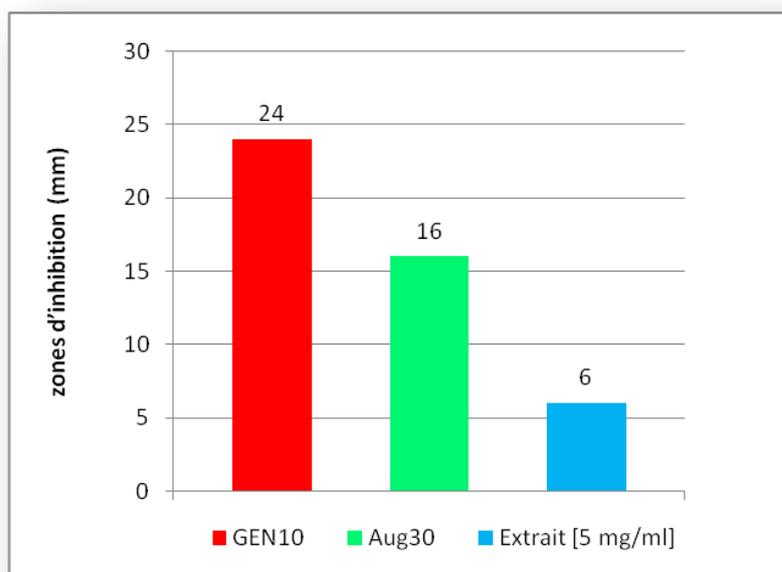


Figure 11:les diamètres des zones d'inhibition de *Listeria innocua*.

D'après la **figure11**, *Listeria innocua* est sensible à la Gentamicine et Augmentine avec des diamètres de zones d'inhibition de 24 et 16 mm respectivement, et une zone de 6 mm pour l'extrait. Qui présente une activité modérée à celle d'Augmentine.



Figure 12: Activité d'extrait des alcaloïdes des feuilles du *P. tomentosa* sur *Listeria innocua*.

- **Contre *Klebsiella pneumoniae***

Les diamètres des zones d'inhibition contre *Klebsiella pneumoniae* sont indiqués dans le **figure 13**.

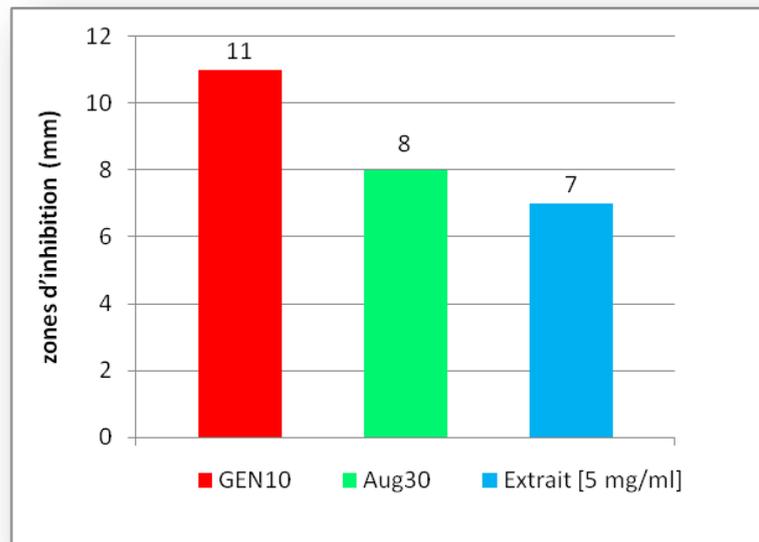


Figure 13: diamètres des zones d'inhibition de *Klebsiella pneumoniae*.

Notons que *Klebsiella pneumoniae* est sensible à la Gentamicine avec un diamètre de zones d'inhibition de 11 mm et moins sensible à l'Augmentin qui a un diamètre de zones

d'inhibition de 8 mm, avec une zone d'inhibition de 7mm pour l'extrait, indiquant une activité antibactérienne similaire de les antibiotiques standard.



Figure 14: Activité d'extrait d'alcaloïdes des feuilles du *P. tomentosa* sur *Klebsiella pneumoniae*.

- **Contre *Escherichia coli***

Les diamètres des zones d'inhibition contre *Escherichia coli* sont indiqué dans le **figure 15**.

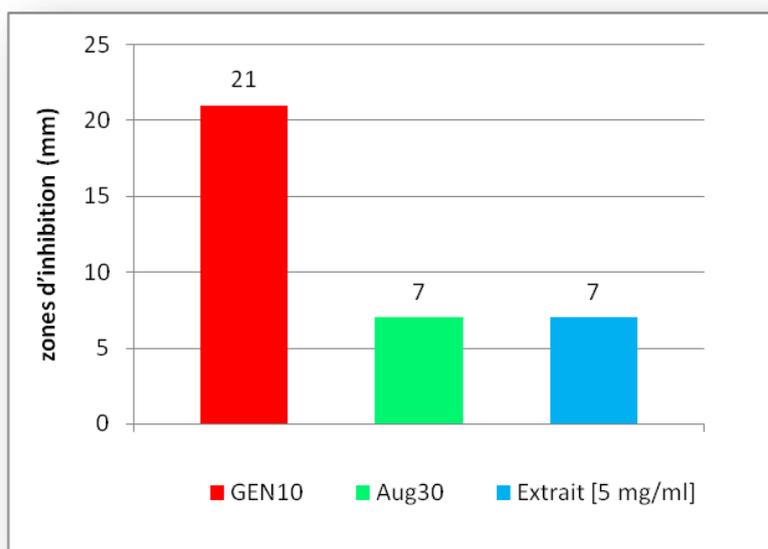


Figure 15: Les diamètres des zones d'inhibition d'*Escherichia coli*.

Escherichia coli est sensible à la Gentamicine et l'Augmentine avec des diamètres des zones des inhibitions de 21 et 7 mm respectivement, et pour l'extrait on observe une zone d'inhibition de 7 mm de diamètre. Notre extrait présente une activité égale avec l'Augmentine et comparable à celle de Gentamicine.



Figure 16: Activité d'extrait d'alcaloïdes des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*.

A la lumière de ces résultats, notre extrait montre une bonne capacité antibactérienne sur les trois souches testées.

Les travaux de **Mezouar (2013)** montrent que l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* était actifs sur *Escherichia coli*. **Yala et al., (2016)** aussi indique que l'extrait de *Eryngium foetidum* possède une activité antibactérienne sur les bactéries Gram positives.

L'extrait d'alcaloïde et des autres extraits de *Pergularia tomentosa* a exercé une inhibition de croissance des différentes souches bactériennes telles que l'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (**Bouhmama, 2013**).

Ces résultats confirmer l'effet antimicrobien des feuilles de *Pergularia tomentosa*. Cette efficacité est due à la présence des alcaloïdes qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antimicrobiens (**Tlili, 2015**).

Les alcaloïdes sont des substances actives, ils peuvent agir contre des bactéries, elles jouent un rôle crucial dans la défense antibactérienne (**Chebili, 2012**), a cause de leurs propriétés physico-chimique qui sont déjà mentionné dans la partie bibliographique.

On remarque que l'activité antibactérienne contre *Listeria innocua* est élevé à celle de *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, ce qui conformé par l'étude de **Kebili (2016)** qui indique que les bactéries à GRAM positif plus sensible par rapport les bactéries à GRAM négatif. Cela nous fait émettre une hypothèse que ce résultat peut être dû à la différence de la paroi des bactéries; par exemple l'action des β -lactamines est liée à la structure de la paroi bactérienne. En règle générale, la paroi des bactéries à Gram positif se laisse pénétrer sans difficulté par les β -lactamines, car le peptidoglycane ne s'oppose pas au passage des molécules d'aussi petite taille. Cette règle ne s'applique pas aux bactéries à Gram négatif à cause de la structure particulière de la paroi de ces bactéries qui ne laissent passer les β -lactamines qu'à travers les porines. Les porines sont des protéines transmembranaires ayant la faculté de se regrouper pour former des canaux, des pores remplis d'eau, permettant ainsi la diffusion à travers la membrane de différents solutés hydrophiles.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active, il serait également intéressant de compléter ce travail par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides(CMB) et fongicide(CMF), des extraits d'alcaloïdes de cette plante.

Conclusion

Conclusion

Le sud algérien est riche en plantes médicinales qui peuvent avoir des propriétés thérapeutiques, à titre d'exemple *Pergularia tomentosa* L. qui pousse à l'état spontané dans la région de Méguibra (El-Oued), cette plante est fréquemment employée pour ses vertus médicinales, car elle contient des principes actifs qui agissent sur l'organisme.

L'extraction des alcaloïdes par la macération nous a permis de constater que le rendement des alcaloïdes est 0.5%.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM), nous a conduit à plusieurs classes des alcaloïdes sont observés selon leurs couleurs et leur rapports frontaux.

Ces résultats ne constituent qu'une première étape, il serait également intéressant de compléter ce travail avec l'ajouté des analyses par des techniques plus développées telles que CLHP et RMN.

Concernant l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage de radical DPPH, en comparant les IC₅₀ de l'extrait d'alcaloïdes par rapport à l'acide ascorbique, nous avons remarqué que l'extrait des alcaloïdes totaux présente une activité antioxydante modérée de l'ordre de 1.077 mg/ml, 7.14 mg/ml.

L'étude de l'activité antibactérienne des alcaloïdes des feuilles de *Pergularia tomentosa* sur des microorganismes pathogènes s'est avérée importante, vu que cette plante a révélé une activité importante sur les 3 souches testées. L'activité antibactérienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Klebsiella pneumoniae*.

Les diamètres de zones d'inhibition variant entre 6 à 24 mm, notre extrait montre une bonne capacité antibactérienne sur les trois souches testées. Mais cet extrait est plus efficace contre les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives.

Ces résultats nous sont confirmés que *Pergularia tomentosa* est une plante médicinale qui a une importance non négligeable en médecine. En effet, elle possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. Aussi on peut dire que cette plante possède une activité antioxydante modérée, et peut être utilisée comme une source d'agents antibactériens qui ouvrent des perspectives intéressantes.

Références bibliographiques

Afoun, M., & Ammour, S. (2017). Etude de l'activité antioxydante des alcaloïdes d'un mélange de *Phoenix dactylifera* et de *Matricaria pubescens*. Mémoire Master en Pharmacologie Moléculaire. Université A. Mira. Bejaia. 31 p.

Allaoua, N., & Lamriben, H. (2017). Etude de l'activité antibactérienne des alcaloïdes d'un mélange de *Phœnix dactylifera et Matricaria pubesens*. Mémoire de Master en Biotechnologie microbienne. Université A. Mira. Bejaia. 30 p.

Al-Mekhlafi, N., & Masoud, A. (2017). Phytochemical And Pharmacological Activities of *Pergularia tomentosa L.* A Review. Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences. 4(11). 4558-4565.

Benabdallah, H. (2016). Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Master Analyses biochimiques. Université Ferhat Abbas. Sétif. 75 p.

Benslama, A. (2016). Substances d'origine végétale. Université Mohamed Khider-Biskra. 68 p.

Bentabet, N. et al. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. Université Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen. Springer. doi 10.1007/s10298-014-0834-x

Berkal, G., & Bouchama, S. (2016). Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale: *Euphorbia characias L.* Mémoire de Master en Biochimie Moléculaire et Santé. Université des Frères Mentouri. Constantine. 60 p.

Bettaieb, R. et al. (2017). Phytochemical composition and antioxidant activity of *Lavandula dentate* extracts. Journal of new sciences. Agriculture and Biotechnology. 39(2). 2096-2105.

Bougar, N., & Belkacem Kourmi Z. (2016). Contribution à la caractérisation physico-chimique et anti-bactérienne de l'extrait de la plante *urtica dioica L (ortie dioïque)*. Mémoire de Master en Chimie. Université Djilali Bounaâma. Khemis Miliana. 53 p.

Bougoffa, K. (2006). Identification par HPLC des polyphénols et alcaloïdes de deux espèces de « Fumaaria » et leurs activités antioxydantes et antiperoxydase. Mémoire de Magister En Biologie Moléculaire. Université A.Mira. Bejaia. 97 p.

Bouhamdi, A. (2012). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des feuilles de *Pergularia tomentosa L.* de la région d'Adrar. Mémoire de Master en Biochimie appliqué. Université Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen. 57 p.

Bouhmama, A. (2013). Contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa L.* de la région d'Adrar. Mémoire de Master en Biologie. Université de Tlemcen. Tlemcen. 56 p.

Bourmita, Y. et al. (2013). Recherche préliminaire des sources végétales sahariennes a alcaloïdes pour usage bio-insecticides. Algérien journal of arid environment. 3(1). 98-102.

Chebili, S. (2012). Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cytisus triflorus* L'Hérit. Et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydante. Mémoire de Magister en Biologie. Université M'Hamed Bougara. Boumerdès. 96 p.

Dehak, K. (2013). Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Doctorat de Chimie. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 22 p.

Dih, A., & Belguendouz, A. (2017). Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes extraits d'*Osyris alba L.*, récoltée au niveau de la région de Beni-Snousse. Tlemcen. Mémoire de Master en biologie. Université Abou-Bekr Belkaïd. Tlemcen. 39 p.

Facchini, P.J., St-Pierre, B. (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Current Opinion in Plant Biology. 6(8). 657-666.

FELLOUS, A. (2003). la station d'élevage de la Gazelle dorcas (*Gazelle dorcas*) dans le sud-ouest algérien. *IIème Séminaire Antilopes Sahelo Saharienne*, 1-5 mai 2003, Agence Nationale pour la Conservation de la Nature, Agadir Maroc. 7p. **BAHORUN, T. et al. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal of Arzneimittel-Forschung*. 46 : 1086-1089.

Ghedjati, N. (2014). Toxicité aigüe et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium*. Mémoire de Magister en Biologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. 63 p.

Gomes, C. et al. (2012). Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 481-487.

Grégory, P. (2012). Etude de l'impact de l'Esca sur la qualité des raisins par une approche protéomique. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Bordeaux Segalen. Bordeaux. 141 p.

Hamidi, A. (2013). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de Magister en Chimie Organique. Université Kasdi Merbah . Ouargla. 86 p.

Hammoudi, R. (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Thèse de Doctorat en biologie. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 131 p.

Kebili, Z. (2016). Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région d'Ouargla. Mémoire de Magister en Biologie. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 102 p.

KEMASSI, A. et al. (2014). Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien), *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 1(1) : 1-5.

Khuzhaev, V. U., Aripova S. F. (1998). Alkaloids of *Arundo donax*. *Chemistry of Natural Compounds*. 34(1). 108-109. doi: 0009-3130/98/3401

Madiélé, A. B. et al. (2015). Caractérisations Analytiques Des Extraits Colorants Des Plantes Tinctoriales d'Afrique Centrale. *Lebanese Science Journal*. 16(1).

Mamadou, B. (2011). Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au mali. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur d'université. Université Blaise Pascal de Clermont. Ferrand. 137 p.

Mesbahi, Z. (2011). Bioactivité des extraits foliaires de *pergularia tomentosa* (*Asclepiadaceae*) sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (fokal, 1775) (*Orthoptera-Acrididae*). Mémoire d'ingénieur d'état en sciences agronomique. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 71p.

- Mezouar, D. (2013).** Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris*. Mémoire de Magister en Biologie. Université Abou Bekr Belkaïd. Tlemcen. 112 p.
- Milcard, F. (2013).** Etude de l'effet des alcaloïdes sur la corrosion de l'acier C38 en milieu acide chlorhydrique 1M: Application à *Aspidosperma album* et *Geissospermum laeve* (Apocynacées). Thèse de Doctorat en Chimie. Université des Antilles et de la Guyane. Guyane. 186 p.
- Mohammedi, Z. (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 160 p.
- OULD EL HADJ, M.D. et al. (2003)** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*. 3 : 47-51.
- Razzakov, N. A. et al. (1998).** Alkaloids of *Mandragora turcomanica*. *Chemistry of natural compounds*. 34(6). 741-742. doi: 0009-3130/9813406
- Rebouh, M., & Belkhirat, S. (2016).** Evaluation de l'activité antibactérienne et le pouvoir cicatrisant d'une Asclepiadaceae. Mémoire de Master en Biologie. Université M'hamed Bougara. Boumerdes. 43 p.
- Rufai, Y. et al. (2015).** Activity Guided Fractionation with Antimicrobial Evaluation of *Pergularia tomentosa L. (Asclepiadacea)* Whole Plant. *British Microbiology Research Journal*. 8(5). 567-576. doi: 10.9734/BMRJ/2015/17027
- Sanogo, R. et al. (2014).** Standardisation et essai de production industrielle d'un sirop antipaludique à base d'extraits d'*Argemone mexicana L.* *Revue CAMES – Série Pharm. Méd. Trad. Afr.* 1(17). 15-20.
- Seck, M. et al. (2015).** Etude de l'activité antifalcémiant d'extraits de racines de *Leptadenia hastata* Decne. (Asclepiadaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3(9). 1375-1383. En ligne <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.22>
- Shakirova, U. T. et al. (2003).** Accumulation Dynamics Of Alkaloids In *Petilium eduardi*. *Chemistry of Natural Compounds*. 6 (39). 603-604. doi: 0009-3130/03/3906

Tlili, M. L. (2015). Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de Magister en Biologie. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 86 p.

Yala, J. F. et al. (2016). Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'*Eryngium foetidum* récolté dans la ville de Franceville. Journal of Applied Biosciences 103:9886-9893. En ligne <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v103i1.10>.

Zeghouane, H. (2014). Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 56 p.

Résumé

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique d'une des plantes d'intérêt médicinal dans la région d'El-Oued, en l'occurrence *Pergularia tomentosa*. L'échantillon choisis est étudié à travers leur contenant qualitatif et quantitatif en composés alcaloïdes, suivi d'une analyse par chromatographie sur couche mince et évaluation *in vitro* des activités antioxydant et antibactérienne de ces composés.

L'examen phytochimique réalisé sur les feuilles de *Pergulariatomentosa* a montré la présence des alcaloïdes en quantité importante. L'extraction des alcaloïdes a permis d'obtenir un rendement de l'ordre de 0.5 %.

L'analyse qualitative par CCM, après révélation et visualisation sous UV à 365 nm, a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) des Rf et des couleurs différents, ce qui indique que la plante *Pergularia tomentosa* est riche en plusieurs classes des alcaloïdes.

L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode de DPPH, a montré que l'extrait d'alcaloïde est un pouvoir antioxydant relativement modéré par rapport à celui de l'acide ascorbique.

L'étude de l'activité antibactérienne a été effectuée sur trois souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait d'alcaloïdes des feuilles de *Pergulariatomentosa* se sont révélés activement inhibitrices vis à vis les souches testées, et sont beaucoup plus actives sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

Mots clés: *Pergularia tomentosa* L, alcaloïde, CCM, activité antioxydant, activité antibactérienne.

المخلص

يهدف هذا العمل الى دراسة احدى النباتات الطبية في منطقة الوادي، تسمى *Pergularia tomentosa*. تمت دراسة العينة المختارة من خلال المحتوى الكمي و النوعي للمركبات القلويدية والتي تم فصلها بواسطة الكروماتوغرافيا و تقييم نشاطها المضاد للأكسدة، و المضاد للبكتيريا. وقد أظهر الفحص الكيميائي النباتي الذي أجري على أوراق هذه النبتة وجود القلويدات بكميات كبيرة فيها. و استخلاص هذا المركب مكننا من الحصول على عائد 0.5 %.

التحليل النوعي بواسطة الكروماتوغرافيا CCM مكننا من الحصول على العديد من البقع المختلفة التي تعود الى انواع القلويدات الموجودة في اوراق هذه النبتة وهذا ما يدل على ان هذه النبتة غنية بهذا المركب.

تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقة احتباس الجذر الحر DPPH اظهر أن مستخلص القلويد لديه استجابة معتبرة ضد الأكسدة مقارنة مع حمض الأسكوربيك.

أجريت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا على 3 سلالات بكتيرية بواسطة طريقة الانتشار على القرص. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مستخلص أوراق هذه النبتة له فعالية ضد السلالات المجرية، وكذا نشاطها ضد البكتيريا + Gram فعال أكثر من نشاطها ضد البكتيريا - Gram.

الكلمات المفتاحية: *Pergularia tomentosa* L ، مستخلص القلويد ، CCM ، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Abstract

The present work aims to study a plant of medicinal interest in the region of El-Oued, in this case *Pergularia tomentosa*. The selected sample are studied through their qualitative and quantitative containment of alkaloid compounds, followed by separation by thin layer chromatography and *in vitro* evaluation of the antioxidant and antibacterial activities of this same compound.

The phytochemical examination carried out on the leaves of *Pergularia tomentosa* showed the presence of alkaloids in large quantity. The extraction of the alkaloids made it possible to obtain a yield of the order of 0.5%.

The qualitative analysis after separation by TLC, and visualization under UV at 365 nm, made it possible to highlight numerous spots (spots) in our extract. The number of spots in the chloroform / methanol / ammonia phase is higher than in the water / acetic acid / butanol phases, indicating that the plant *Pergularia tomentosa* is rich in several classes of alkaloids

The antioxidant evaluation that was conducted using the DPPH method showed that the alkaloid extract is a relatively moderate antioxidant relative to that of ascorbic acid.

The study of the antibacterial activity was carried out on 3 bacterial strains by the method of diffusion on disk. The results obtained indicate that the alkaloid extract from the leaves of *Pergularia tomentosa* has been shown to be actively inhibitory against the strains tested, and is much more active on Gram-positive bacteria and less active on Gram-negative bacteria.

Key words: *Pergularia tomentosa* L, alkaloid extract, TLC, antioxidant activity, antibacterial activity.