



République Algérienne Démocratique et Populaire

N série:

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

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 la caractérisation biologique des
alcaloïdes de la partie aérienne de *Pergularia
tomentosa*. L**

Présentés Par :

- BESSEI Abdelmalek
- BOUGHEZALA HAMAD Ali

Devant le jury composé de :

Président : KHELEF Yahia M.A.A, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued.

Examinatrice : YOUMBAI Asma M.A.B, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued.

Promoteur : TLILI Mohammed Laid M.A.A, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued.

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons notre gratitude et remerciement à notre Promoteur TLILI Mohammed Laid M.A.A, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued de nous avoir encadrés, pour ses orientations, ses conseils qu'il nous a prodigués et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Nous remercions chaleureusement les membres de jury : Président KHELIF Yahia M.A.A, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued.et Examinatrice YOMBAI Asma M.A.B, Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers notre travail en acceptant de l'évaluer.

Nous tenons à remercier aussi les Techniciens de labo.

A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Les principaux cycles azotés des alcaloïdes	7
II	Caractères des organes de <i>P. tomentosa</i>	16
III	Utilisations traditionnelles du <i>Pergularia tomentosa</i>	17
IV	Composition en métabolites primaires des différentes parties de <i>Pergularia tomentosa</i>	18
V	Composition minérale de <i>Pergularia tomentosa</i>	19
VI	Matériel et produits de laboratoire	20
VII	Résultats de CCM des extraits bruts des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> (chloroforme / méthanol / amoniaque)	29
VIII	Résultats de CCM d'extrait alcaloïde des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> (eau / acide acétique / butanol	29

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes	5
2	Appareil de Soxhlet	10
3	Chromatographie sur couche mince (CCM)	11
4	Photographie du <i>Pergularia tomentosa</i>	14
5	Protocol d'extraction d'alcaloïdes apartir des feuilles <i>Pergularia Tomentosa</i>	22
6	chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> de système eau / acide acétique / butanol (8/0.5 /1.5) (v/v)	30
7	résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de <i>P. Tomentosa</i> sur <i>Salmonella typhi</i>	32
8	résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de <i>P. Tomentosa</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
9	résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de <i>P.Tomentosa</i> contr <i>Escherichia coli</i>	34
10	résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de <i>P.Tomentosa</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	34
11	résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de <i>P.Tomentosa</i> contre <i>Fusarium culmorum</i>	35
12	Etude comparative de l'effet antimicrobienne sur les d'différentes souches testés	36
13	resultats de l'activité antioxydante d'extrait et d'acide ascorbique	38
14	Les résultats CE50 des alcaloïdes de <i>P. tomentosa</i>	38

Sommaire

Titres	Page
Introduction.....	1
Partie I. synthèse bibliographique	
Chapitre 1. Généralités sur les alcaloïdes	
1.1. Définition des alcaloïdes.....	
1.2. Distribution et localisation des alcaloïdes.....	3
1.3. Rôle des alcaloïdes dans la plante.....	4
1.4. Nomenclature.....	4
1.5. Biosynthèse des alcaloïdes.....	4
1.6. Classification.....	6
1.7. Propriétés physicochimiques.....	8
1.8. Propriétés pharmacologiques.....	8
1.9. Méthodes d'extraction des alcaloïdes.....	9
1.10. Les techniques d'études physico-chimiques des alcaloïdes.....	11
Chapitre 2. Généralités sur l'espèce <i>Pergularia tomentosa</i>	
2.1. Description botanique de <i>Pergularia tomentosa</i>	14
2.2. Position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i>	15
2.3. Étymologie.....	15
2.4. Caractères des organes de <i>P. tomentosa</i>	16
2.5. Origine et répartition géographique.....	17
2.6. Ecologie.....	17
2.7. Usages traditionnels.....	17
2.8. Les travaux antérieurs.....	18
2.8.1 Composition biochimique du <i>Pergularia tomentosa</i>	18
2.8.2. Activités biologiques et thérapeutiques du <i>Pergularia tomentosa</i>	19
Partie II. Expérimentale	
Chapitre 1. Matériels et méthodes	
1.1. Matériels.....	21
1.1.1. Matériel végétal.....	21
1.1.2. Matériel et produits de laboratoire.....	21
1.1.3. Souches microbiennes ciblés.....	22
1.2. Méthodes.....	22
1.2.1. Extraction des alcaloïdes.....	22
1.2.2. Rendement d'extraction.....	25
1.2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	25
1.2.4. Evaluation des activités biologiques.....	26
1.2.4.1. L'activité antibactérienne.....	26
1.2.4.2. L'activité antioxydante (Pouvoir réducteur du fer).....	29
1.2.5. Analyse statistique.....	30
Chapitre 2. Résultats et discussions	
2.1. Rendement d'extraction des alcaloïdes.....	31
2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) des alcaloïdes.....	31

2.3. Evaluation des activités biologiques.....	34
2.3.1. L'activité antibactérienne.....	34
2.3.1.1. Etude de l'effet des alcaloïdes contre <i>Salmonella typhi</i>	35
2.3.1.2. Etude de l'effet des alcaloïdes contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
2.3.1.3. Etude de l'effet des alcaloïdes contre <i>Escherichia coli</i>	36
2.3.1.4. Etude de l'effet des alcaloïdes <i>Staphylococcus aureus</i>	37
2.3.1.5. Etude de l'effet des alcaloïdes contre <i>Fusarium culmorum</i>	38
2.3.1.6. Etude comparative de l'effet antimicrobienne sur les d'différentes souches testés.....	38
2.3.2. L'activité antioxydante (Pouvoir réducteur du fer).....	40
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
CCM	Chromatographie sur couche mince
DMSO	Dimethylsulfoxyde
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV	Ultraviolet
H1N1	Sous-type de la virus de grippe A
CG/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
eV	Symbole de l'électron-volt en physique.
ppm	Partie par million
%	Pourcentage
GGT	Gamma-glutamyl transferase
ALP	Alkaline phosphatase
LDH	Lactate deshydrogénase
Cip	Ciprolan
Imi	Imipenèm
CMI	Concentrations minimales inhibitrices
CMB	Concentrations minimales bactéricides
CMF	Concentrations minimales fongicide
°C	Degré Celsius
MH	Gélose Mueller-Hinton
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ENS	Ecole Normale Supérieure
PH	potentiel hydrogène

N	Normalité
DO	Densité optique
PAMR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistants
ADN	Acide désoxyribonucléique
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
TCA	D'acide trichloracétique
CE50	Concentration efficace
nm	Nanometer
Rf	Rapport frontal
A _{0.5}	concentration efficace a absorbance 0.5

Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne **(Tabuti et al., 2003)**.

En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales **(Benkhniue, 2010)**. Le Sahara Algérien est constitué de 500 espèces, dont on dénombre 162 espèces endémiques dans le Sahara seul et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Plusieurs espèces sont connues par leurs propriétés thérapeutiques remarquables **(Ozenda, 1991; Maiza et al., 1993; Chehma, 2006)**.

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique **(Merzoug, 2009)**. L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradition thérapeutique **(Konkon et al., 2006)**. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. A titre indicatif, les alcaloïdes font partie de ces composés et sont, à faibles doses, dotés de propriétés pharmacologiques et toxicologiques remarquables. De même, forment un groupe très diversifié de molécules dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies **(Bruneton, 2009)**.

Les antibiotiques, comme exemple, ont joué un rôle capital dans l'éradication de plusieurs maladies contagieuses graves au cours du 20^e siècle, mais la résistance bactérienne est devenue un sérieux problème, jusqu'au point où les antibiotiques de 3^{ème} génération sont devenus dans plusieurs cas inefficaces. C'est dans un communiqué publié le 30 Avril 2014 que l'OMS tire la sonnette d'alarme contre la résistance aux antibiotiques. . Par conséquent, il existe un besoin de développer des médicaments antimicrobiens alternatifs pour le traitement des maladies infectieuses à partir des plantes médicinales qui semblent moins agressifs **(Arshad et al., 2010)**.

Introduction

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 famille des Asclepiadaceae (**Maman, 2003**). Bien qu'elle soit toxique, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle contre les dermatoses et les angines (**Ould el hadj et al., 2003**), les spasmes et les diarrhées (**Al-Qura'n, 2005**), 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 antibactérienne et antioxydante d'extrait préparé.

Cette étude s'envisagé en deux parties ; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier est consacré aux alcaloïdes, leur classification, leurs propriétés pharmacologiques et leur méthodes d'extractions. Le deuxième chapitre concerne une description détaillée de la plante étudiée.

La deuxième partie quant à lui, il est partie en deux chapitres, dont le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- L'extraction des alcaloïdes.
- L'analyse de l'extrait par CCM.
- Evaluation de l'activité antibactérienne.
- Evaluation de l'activité antioxydant (Pouvoir réducteur du fer).

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

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 01. Généralité sur les alcaloïdes

Les végétaux produisent des substances chimiques de structures variées commun les métabolites primaires et secondaires (**Edeas *et al.*, 2007**).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, terpènes, les alcaloïdes) qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents la pharmacologie ou l'agroalimentaires (**Macheix *et al.*, 2005**).

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde - à savoir la morphine - à partir de l'opium en 1806 (**Harborne, 1995**).

Après la découverte de sertonner deux pharmaciens français Pelletier et Caventou, découvrent une importante série de principes actifs entre 1817 et 1820 : caféine, émétine, strychnine, quinine, cinchonine et coniine seront isolées. Le terme « alcaloïde » a été utilisé pour la première fois en 1819 par Meisner, quand il observa que ces composés apparaissaient comme des « alcalis », des bases donc il les dénommera « alcaloïdes » (**Aniszewski , 1994**)

1.1. Définition des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires le plus souvent d'origine végétale, d'une grande ou petite toxicité, qui agissent sur le système nerveux, qui ont un caractère basique et un azote comme composant. Les alcaloïdes constituent l'une des plus grandes familles de métabolites secondaires, avec près de 10 000 à 12 000 structures différentes (**Donatien, 2009**).

Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (**Dewick, 2001; Bhat, 2005**).

1.2. Distribution et localisation des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont principalement présents dans le règne végétal chez les Angiospermes qui en contiennent 10 à 15 %, sont rares chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*) et les champignons (psilocine). Ces composés sont également

présents chez les animaux (flustramine, saxitoxin, samandarine,...etc.). Les alcaloïdes chez les végétaux sont souvent localisés dans les tissus périphériques (assises externes des écorces de tiges et de racines, téguments des racines,...etc.). Ils sont stockés dans des vacuoles cellulaires, Leurs synthèse se fait souvent dans des sites précis : racines en croissance, cellules spécialisées de laticifères, chloroplastes, avant d'être transportés dans leurs sites de stockage. (Singla *et al.* , 2010).

1.3. Rôle des alcaloïdes dans la plante

Les alcaloïdes interviennent dans la protection de la plante contre les agents pathogènes (Singla *et al.*, 2010). Les alcaloïdes jouent un rôle essentiel dans la protection du végétale contre les animaux come 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).

1.4. Nomenclature

Dans ce groupe de composés, la nomenclature systématique est peu utilisée. L'utilisation des noms triviaux est dominante. Ce dernier, se termine typiquement par "ine" (Popl *et al.*, 1990) ; il dérive du nom du genre ou de l'espèce, du nom vulgaire, de l'effet physiologique, de l'aspect physique de l'alcaloïde ou du nom de celui qui l'a découvert (Abdelkader, 2003).

1.5. Biosynthèse des alcaloïdes

L'origine des alcaloïdes vrais remonte aux acides aminés entre autres: l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, le 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 benzyl isoquinoléines, plus

rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé comme dans le cas de la spartéine. (figure1)

Quand la molécule comporte des carbones supplémentaires, ils sont apportés par des éléments largement impliqués dans d'autres métabolismes : acétate (tropanes), diméthylallyl pyrophosphate (ergolines, furoquinoléines) ou plus spécifiques à un groupe particulier de végétaux comme le sécologanoside (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 précurseur sont une origine strictement terpénique et l'amination de la molécule est tardive (Nacoulma, 2012).

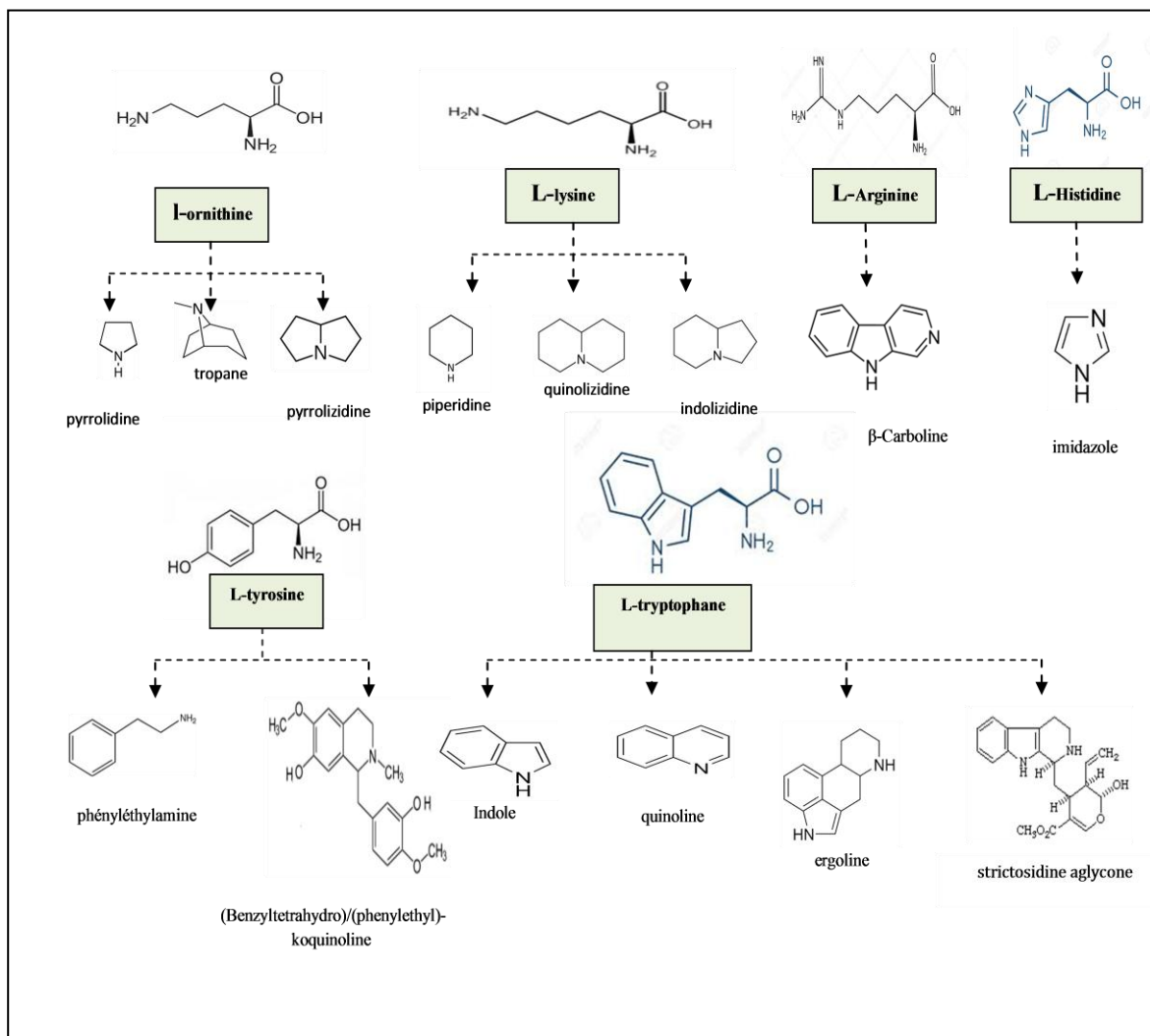


Figure 01 : Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes (Nacoulma, 2012).

1.6. Classification

Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant il y a plus de 10 000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés à partir de sources végétales, animales, ou de micro-organismes. Le nombre de composés d'alcaloïdes connus et leur diversité structurale ont fait de leur classification une tâche difficile à établir et pour cela leur classification est basée sur plusieurs critères : l'origine biologique, la voie de biosynthèse, et la structure (Badiaga, 2011).

1.6.1. Selon l'origine biosynthétique

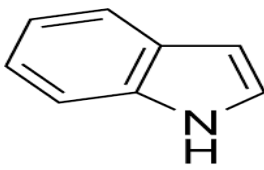
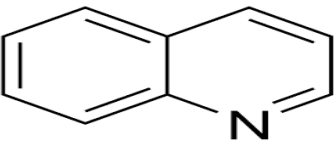
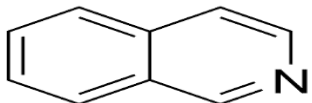
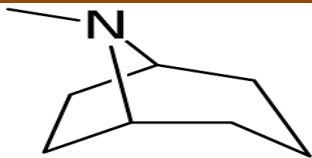
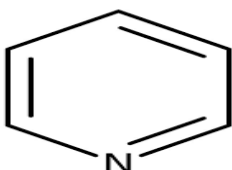
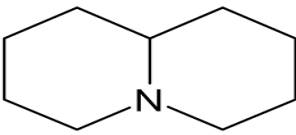
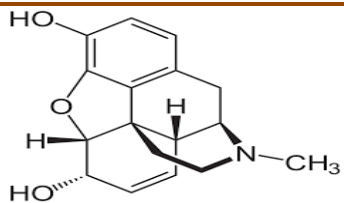
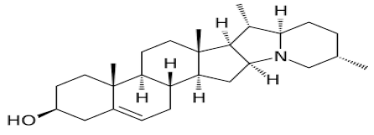
La classification des alcaloïdes la plus utilisée est celle se basant sur la structure chimique de ces composés et leurs précurseurs moléculaires, ainsi les alcaloïdes sont classés en trois grands types : les alcaloïdes vrai, les pseudo- alcaloïdes et les proto-alcaloïdes (Aniszewski, 2007).

- **Les alcaloïdes vrais** qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique. Ils existent dans la plante sous forme de sels, ont pour origine biosynthétique un acide aminé et sont dotées d'une activité pharmacologique significative.
- **Les pseudo-alcaloïdes** qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais excepté leur origine biosynthétique. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate.
- **Les proto-alcaloïdes** qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés (Bruneton, 1999 ; Maldonado, 2012).

1.6.2. Selon leur composition chimique et structure moléculaire

La constitution chimique des alcaloïdes est extrêmement variée, le seul point commun est la présence d'un azote qui confère à la molécule un caractère basique plus ou moins prononcé. L'azote est le plus souvent intra-cyclique et entre dans la formation d'un noyau de base déterminant la classification (Catier et Roux, 2007). (Tableau I)

Tableau I : Les principaux cycles azotés des alcaloïdes (Gonzalez *et al.*, 1984).

noms	structures
Indole	
Quinoline	
Isoquinoline	
Tropane	
Pyridine	
Quinolizidine	
Morphine	
Solanidine	

1.7. Propriétés physicochimiques

- ❖ Masse moléculaire variant de 100 à 900g/mol.
- ❖ La plupart des bases non oxygénées sont liquides.
- ❖ Les bases oxygénées sont normalement des solides rarement colorés.
- ❖ Les bases non oxygénées donnent des points de fusion au-dessous de 200 °C.
- ❖ En général, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu apolaires, et sont solubles dans les alcools.
- ❖ Les alcaloïdes à l'état de bases et en solution sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène.
- ❖ Les sels sont formés grâce à la basicité des alcaloïdes associés avec des acides minéraux ou organiques.
- ❖ Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools et insolubles dans les solvants organiques.
- ❖ Les sels se conservant assez bien, constituent la forme commerciale habituelle des alcaloïdes (**Bruneton, 1999**).

1.8. Propriétés pharmacologiques

Leurs propriétés pharmacologiques concernent des domaines variés;

- Au niveau du système nerveux central: dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (caféine, strychnine)
- Au niveau de système nerveux autonome: sympathomimétiques (éphédrine), parasympathomimétique (pilocarpine)
- Anesthésiques locaux (cocaïne)
- Antipyrétique (quinidine)
- Anti-tumoraux (ellipticine)
- Anti-paludiques (quinine) (**Bruneton, 2009**).
- Anti-tumoraux, d'anti-parasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer (**Iserin et al., 2007**).
- Antivirale: l'effet des alcaloïdes contre les virus 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**).
- Antimicrobiens 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, dysenterie, candidose, etc.) (Chebili, 2012).

1.9. Méthodes d'extraction des alcaloïdes

Il existe trois types principaux d'extraction des alcaloïdes : extraction par les solvants organiques non polaires, extraction par les solvants organiques polaires et extraction par l'eau acide. (Paris et Hurabielle, 1981).

1.9.1. Extraction par les solvants organiques non polaires (Méthode de Stas-Otto)

La plante séchée et pulvérisée est traitée par une solution aqueuse alcaline (ammoniaque, carbonate de sodium et eau de chaux). Les alcaloïdes ainsi libérés sont extraits par un solvant organique non polaire.

L'épuisement se fait à froid par macération, percolation ou à l'aide d'un appareil à épuisement continu (Soxhlet). On obtient ainsi une solution organique dans laquelle on trouve les alcaloïdes à l'état de base.

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 2) 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.

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).

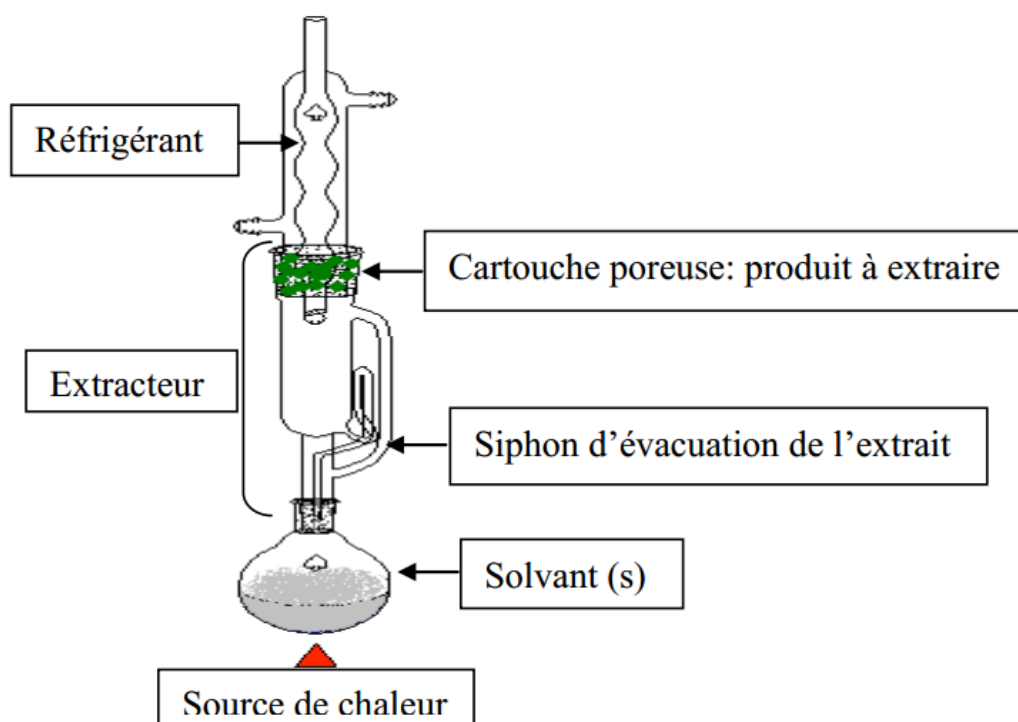


Figure 02 : appareil de Soxhlet (Hamidi, 2013).

1.9.2. Extraction par solvant organique polaire

La drogue pulvérisée est traitée par une solution alcoolique acide, cette solution est ensuite évaporée à sec. Le résidu est repris par l'eau acide. Après alcalinisation, la solution aqueuse est épuisée par un solvant organique non polaire. On obtient ainsi une solution organique d'alcaloïdes bases purifiés. Après évaporation du solvant, on obtient un résidu d'alcaloïdes totaux (bases).

1.9.3. Extraction par l'eau acide

La drogue pulvérisée est épuisée par l'eau acide. On obtient une solution aqueuse acide de sels d'alcaloïdes. On peut ajouter :

- un agent alcalin : On obtient ainsi un précipité d'alcaloïdes bases que l'on peut recueillir ou que l'on peut extraire par un solvant organique non polaire.
- un réactif précipitant : Les alcaloïdes totaux peuvent ainsi être récupérés à partir du complexe formé. (Paris et Hurabielle, 1981).

1.10. Les techniques d'études physico-chimiques des alcaloïdes

1.10.1. 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. (Figure 3) (**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 dans la séparation des alcaloïdes 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.

Ces révélateurs généraux de précipitation sont fondés 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).

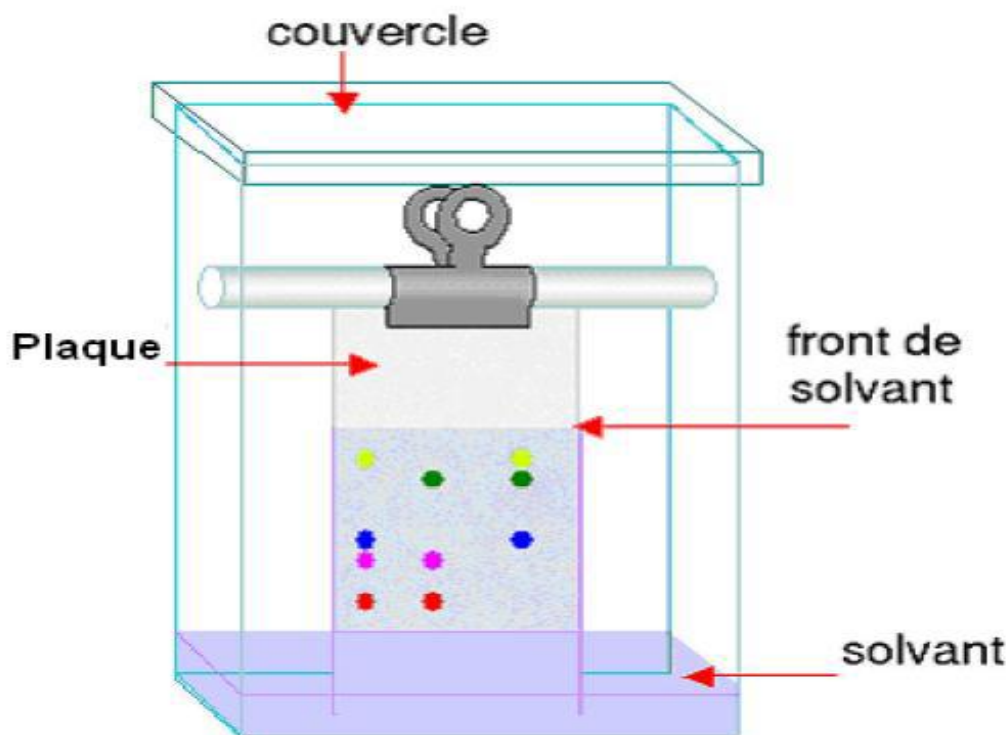


Figure 03 : Représentation des différents éléments de CCM (Milcard, 2013).

1.10.2. Analyse par chromatographie C.L.H.P

La CLHP (*HPLC*) est une technique de séparation très puissante, elle est très utilisée dans de nombreux secteurs d'activités tels l'agroalimentaire, l'industrie chimique et pharmaceutique, les cosmétiques, etc.

C'est une méthode physico-chimique basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la phase mobile (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression au travers de la colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase stationnaire (Nollet et Toldra, 2013).

Les conditions opératoires d'analyse des alcaloïdes sont

- ✓ Débit: 1 ml/min ;
- ✓ Volume d'injection: 20 μ l ;
- ✓ La température est réglée à 250 C;
- ✓ Longueur d'onde: 300 nm ;
- ✓ Concentration de l'échantillon: 10 mg/ml ;
- ✓ Temps d'analyse : 50 min.

1.10.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) en analyse métabiologique repose à la fois sur sa sensibilité, sa robustesse et sur l'existence de bases de données regroupant plus de 100 000 composés facilitant le travail d'identification.

Cependant l'analyse par GC/MS nécessite une étape de modification chimique afin de rendre les molécules volatiles et n'est pas applicable aux composés thermolabiles. Par ailleurs, le couplage GC/MS repose sur l'utilisation de sources à impact électronique, qui souvent ne permettent pas d'observer la masse du composé intact, mais seulement des ions issus de sa fragmentation, ce qui rend délicate toute identification de composés inconnus, ou non décrits dans les bases de données. Tous ces éléments ont justifié le développement de méthodes de couplages entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (**Garnier *et al.*, 2009**).

Les conditions appliquées étaient les suivantes: le gaz vecteur était l'hélium, le volume d'injection était de 1 µl avec un rapport de division de 1: 20; le débit du gaz vecteur (hélium) était 1,6 ml/min. les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été fixées à 250°C; la température de la colonne a été programmée à partir de 100°C (3 min) jusqu'à 310°C à 6°C/min avec maintien de 310°C (3 min) et les spectres de masse ont été enregistrés à 70 eV (**Tidjani, 2015**).

Chapitre 02.
Généralités sur
l'espèce *Pergularia*
tomentosa

La famille de l'asclépiade (Asclépiadacée) comporte environ 200 genres et 2500 espèces, essentielles herbacées ou buissonnantes propres aux régions tempérées et subtropicales (**François, 2008**). Cette famille est connue par sa richesse en cardénolides, notamment les genres : *Asclépias*, *Pergularia*, *Gomphocarpus* et *Calotropis* (**Gohar et al., 2000**).

Le genre *Pergularia* comprend deux espèces polymorphes ; *Pergularia tomentosa* et *Pergularia daemia*. Des formes intermédiaires entre les 2 espèces sont présentes à Socotra (Yémen) et elles viennent d'être incluses dans *Pergularia tomentosa*.

2.1. Description botanique de *Pergularia tomentosa*

Le *Pergularia tomentosa* c'est une plante herbacée ou semi-ligneuse, arbrisseau vivace pouvant dépasser 1 m d'hauteur (Fig.4). Les jeunes rameaux volubiles de cette plante s'enroulent fréquemment autour les plus anciens lui donnant un aspect touffu (**Ozenda, 2004**), Floraison en printemps (**Chehma, 2006**).



Figure 4: Photographie du *Pergularia tomentosa* (**Tlili, 2015**).

2.2. Position systématique de *Pergularia tomentosa*

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Ordre : Gentianales

Famille : Asclepiadaceae

Genre : *Pergularia*

Espèce : *Pergularia tomentosa* L. (**Ozenda, 1991**).

2.3. Étymologie

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: *Daemia cordata*. Et possède de nombreux noms folkloriques:

- **Arabe** : En Algérie *Pergularia tomentosa* L. est connue sous le nom de Tellakh (**Maiza et al., 1993**) , en Egypte et en Arabie Saoudite elle est connue sous le nom Ghalaka (**Al-Said et al., 1988.**), et Ghoulga, Demya, leben el Hamir et Kalga(**Chehma, 2006**).
- **Targui** : tashkat, dellakal, tellakh.
- **Français** : Pergulaire
- **Anglais** : *Pergularia* (**Rebouh et Belkirat, 2016**).

2.4. Caractères des organes de *P. tomentosa*

Tableau II : Caractères des organes de *P. tomentosa* (Schmelzer et Gurie-Fakim, 2013).

Organes	Caractères
	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.
	- 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.
	- Un latex : blanc, corrosif qui peut endommager la peau - Les fruits: Composés de deux follicules, portent de petites pointes; - La tige : couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile, tomenteuse à l'état jeune; - Les graines : ovoïdes, aplaties, de 7-9 mm environ 6 mm, bords pales, à poils denses, munies d'une touffe de poils à une extrémité, d'environ 3 cm de long.

2.5. Origine et répartition géographique

Pergularia tomentosa est largement réparti dans le désert du Sahara jusqu'aux déserts du sud et de l'est de l'Iran, à l'Afghanistan et au Pakistan, en passant par la Corne de l'Afrique, le Sinaï (Egypte), la Jordanie et la péninsule Arabique.

P. tomentosa 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 (**Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013**).

2.6. Ecologie

P. tomentosa pousse bien dans les déserts où les précipitations ne dépassent souvent pas les 100 mm par an, dans le lit des oueds et sur les plateaux, sur des sols argileux à sablonneux, graveleux et pierreux. Il est présent depuis le niveau de la mer jusqu'à 1000 m d'altitude. Le long de la mer Rouge, on le trouve au sein des communautés de plantes qui dominent les plaines sablonneuses (**Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013**).

2.7. Usages traditionnels

Elle possède un large spectre d'utilisations en médecine traditionnelle. Dans le tableau suivant sont résumées les principales enquêtes ethnobotaniques réalisées sur cette espèce.

Tableau III : Utilisations traditionnelles du *Pergularia tomentosa*

Régions	Partie utilisée	mode d'utilisation	Usages	Références
Sahara septentrional algérien	Feuilles et fleurs	Décoction	Angine, teigne, dermatose	Ould el hadj, <i>et al.</i>, (2003)
	Partie aérienne	Décoction	Hypoglycémiant	Kemassi <i>et al.</i>, (2014).
Tassili N'ajjer	Racine	Usage interne	Les Frissons, bronchite, constipation	Hammiche et Maiza, (2006).
	Partie aérienne		Décoction et usage interne	
			Décoction et	

		usage externe	peau : dermatose et dépilatoire	
Mauritanie	/	/	Morsures venimeuses, tuberculose, maux de dents	Hmeyada, (2009).
Côte d'Ivoire	feuille	Jus	Collyre, les maux de tête.	Schmelzer et Gurib-Fakim, (2013)
Milieu rural	/	/	Tannerie	

2.8. Les travaux antérieurs

2.8.1 Composition biochimique du *Pergularia tomentosa*

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

2.8.1.1. 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 IV : Composition en métabolites primaires des différentes parties de *Pergularia tomentosa* (Hassan *et al.*, 2007)

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

2.8.1.2. Métabolites secondaires

Pergularia tomentosa est connu par son contenu en molécules biologiquement actives tels que les polyphénols: flavonoïdes, tanins, glycosides cardiaques, les glycosides cyanogènes, des saponines, des flavonoïdes, des tanins (Hassan *et al.*, 2007).

2.8.1.3. La composition minérale

La composition minérale de la plante montre une grande quantité de phosphore et de potassium dans la racine et la tige. Des teneurs importantes de sodium, de magnésium et de calcium sont relevées dans les extraits des feuilles (Sheded *et al.*, 2006).

Tableau V: Composition minérale de *Pergularia tomentosa* (Hassan *et al.*, 2007).

Organe Végétal	Phosphore (ppm)	Potassium (ppm)	Sodium (ppm)	Magnésium (%)	Calcium (%)
Feuilles	1,85 ± 0,05	2,97 ± 0,210	4,13 ± 0,31	0,32 ± 0,06	0,25 ± 0,010
Tiges	7,07 ± 0,06	215,0 ± 10,00	2,03 ± 0,15	0,15 ± 0,030	0,16 ± 0,01
Racines	8,13 ± 0,06	167,30 ± 5,03	2,33 ± 0,15	0,25 ± 0,008	0,08 ± 0,003

2.8.2. Activités biologiques et thérapeutiques du *Pergularia tomentosa*

2.8.2.1. Larvicide

Les résultats des travaux d'**Acheuk et Doumandji-Mitiche (2013)**, montre que 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.

2.8.2.2. Anti tumorale

Les effets inhibiteurs de ghalakinoside sur les taux d'acide urique, Ca²⁺, GGT, ALP et la LDH sont en faveur de son potentiel anti-tumoral (**Al-Said *et al.*, 1989**).

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 (**Piacente *et al.*, 2009**).

2.8.2.3. Anti-dermatophytique

La présence des tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, glycosides, saponinglycosides, cardiacglycosides, 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 (**Shinkafi, 2013**).

2.8.2.4. Bactéricides et antifongique

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 *Aspergillus niger*. Des effets bactéricides et molluscicides ont également été répertoriés. Les extraits méthanoliques des parties aériennes, de même que les isolats de coroglaucigénine, de 16 α -acétoxycalotropine et de calactine, ont eu une activité de dissuasif alimentaire sur la légionnaire *Spodoptera littoralis* (Bekheet et al., 2011).

2.8.2.5. Molluscicide

L'activité molluscicide de deux cardénolides extraite à partir de *Pergularia tomentosa*, a été évaluée par rapport à l'escargot terrestre *Monacha obstructa* (Férussac), ces résultats expliquent l'utilisations possibles de cette plante contenant des cardénolides, comme molluscicide (Hussein et al., 1999).

2.8.2.6. Toxicité

Les hétérosides sont très cardio-toxiques lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse. Ils sont peu absorbés lorsqu'ils sont ingérés par voie orale, ce qui pourrait expliquer l'information contradictoire de l'utilisation de la plante comme fourrage. Certains de es cardénolides issus de la racine et des parties aériennes ont montré une activité cytotoxique contre plusieurs lignées de cellules cancéreuse humaines *in vitro*. Dans un essai sur des souris, des extraits aqueux et à l'éthanol se sont avérés être très toxiques. Ils ont tout d'abord causé la paralysie des membres, puis l'asphyxie. A des doses plus élevées, les extraits ont causé une augmentation de la toxicité dans le tissu musculaire isolé, probablement par stimulation directe.

Un hétéroside du type pergularine a eu un effet similaire sur le tissu musculaire, mais a augmenté la contraction cardiaque (Neuzinger, 1996). *La Pergularia tomentosa* est considérée comme une plante toxique réputée nocive pour la grossesse (Hammiche et al., 2013).

Partie II :

Expérimentale

Chapitre 01.
Matériels et
méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Matériel végétal

La reconnaissance botanique de la plante a été faite par Monsieur Eddoud Amar du département des sciences biologiques de l'université Kasdi Merbah de Ouargla.

Le matériel végétal utilisé correspond à des feuilles de l'espèce *Pergularia tomentosa* L. La récolte s'est effectuée en mars 2017 au niveau de la localité de Méguibra (wilaya d'Eloued).

Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures (Catier et Roux, 2007). Après séchage, les feuilles de la plante ont été broyées et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leurs analyses.

1.1.2. Matériel et produits de laboratoire

Tableau VI : Matériel et produits de laboratoire

verreries et appareillage	milieux de culture	Produits chimiques
Autoclave, Soxhlet Bain marie, Erlenmeyer Béchers, Plaque chauffante Boîtes de pétri Etuve 37°C ,25°C fiolle, entonnoir, Flacons Papier filtre, pipette gradué Pipette pasteur Spectrophotomètre Tubes à essai,pH mètre Balance électronique Rotavapeur, Etuve Plaque chromatographie sur couche mince Spectrophotomètre UV- Visible Ampoule à décantation	Gélose Mueller Hinton (MH) Gelose sabouroud Gelose nutritive	Eau distillée Eau physiologie Méthanol, Chloroforme, Amoniaque, Dichlorométhane,Ether de pétrole,Butanol, Acide acétique, Acide sulfurique, Sulfate de sodium, Réactif de DRAGENDORFF vitamine C (Acide ascorbique), DMSO Ciprolan, Imipenem

1.1.3. Souches microbiennes ciblées

Nous avons choisi de tester notre extrait sur les souches microbiennes suivantes parce qu'elles sont les agents pathogènes les plus fréquemment impliqués dans les infections humaines.

Tableau VII : Les souches microbiennes ciblées

Les souches		références	Gram	La source
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8737	-	Institut de Pasteur d'Alger
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	
	<i>staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	+	
	<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028	-	
Champignons	<i>Fusarium culmorum</i>	/	/	laboratoire des Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse de l'ENS Alger

1.2. Méthodes

1.2.1. Extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques à caractère basique qui existent habituellement dans les plantes à l'état de combinaisons salines et dont l'extraction est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin :

- Les alcaloïdes, à pH basique, sont sous forme de bases insolubles ou peu solubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires et les alcools à titre élevés.
- En milieu acide, les alcaloïdes sont à l'état de sels fortement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont par contre insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 2009**).

Selon **Bruneton, (1999)** et **Vercauteren, (2007)**, l'extraction des alcaloïdes totaux à partir la partie aérienne de *Pergularia tomentosa* est 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.(figure 05)

- ❖ 80 g de la poudre végétale sont dégraissées par 300 ml d'éther de pétrole par macération à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, le marc est alcalinisé par une solution 30 ml d'ammoniaque (0.5N) pendant 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 Soxhlet en utilisant 500 ml de dichlorométhane. Au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des poudres.
- ❖ A l'issue de cette opération, l'extrait brut est lavé trois fois successif 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 l'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.
- ❖ L'extrait recueilli est évaporé sous vide par un rotavapeur.
- ❖ Le résidu sec représente les alcaloïdes totaux.

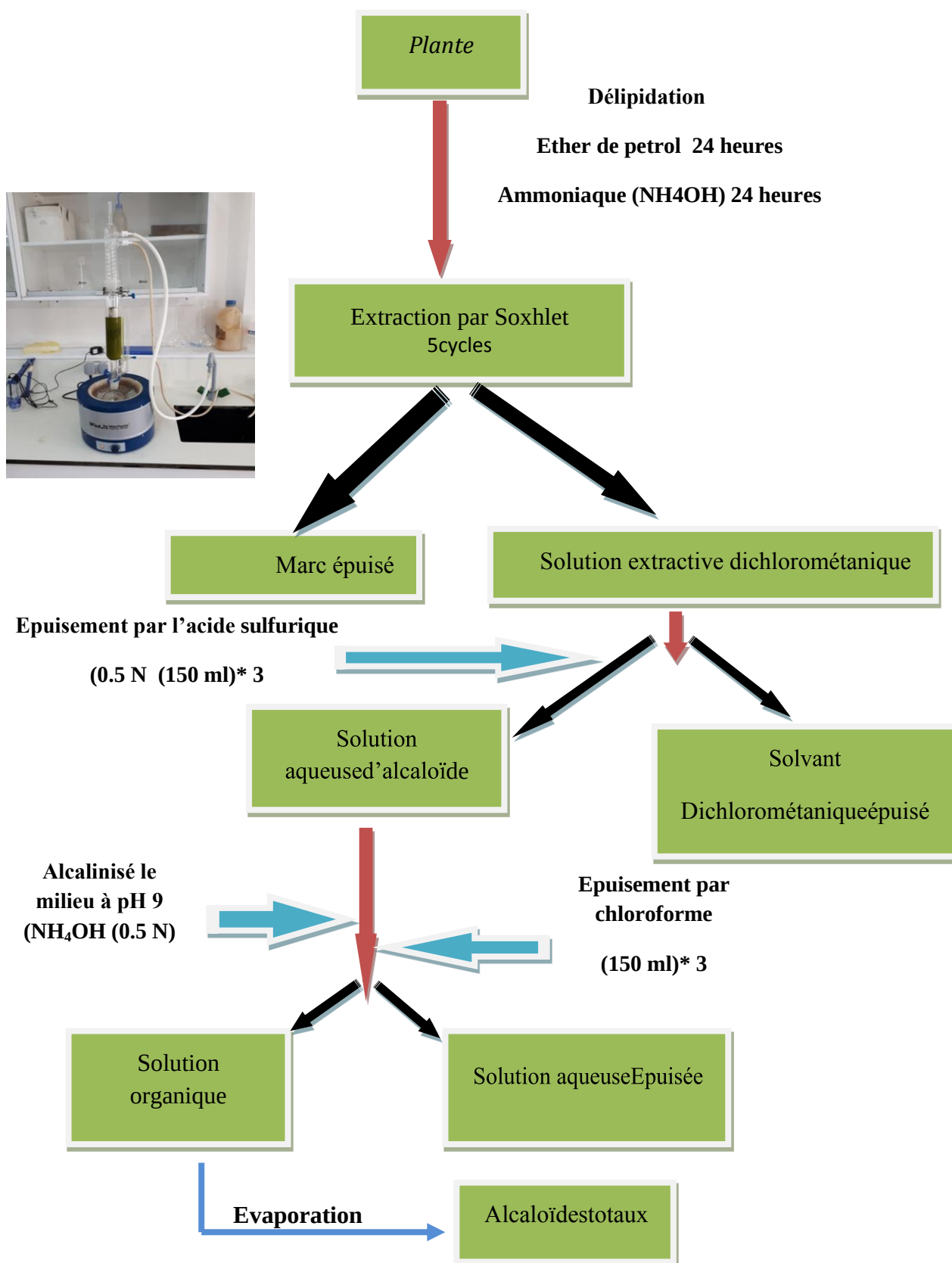


Figure 5: Protocole d'extraction des alcaloïdes des feuilles de *Pergularia tomentosa*.

1.2.2. Rendement d'extraction

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

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{P1}{P0} \times 100$$

- P1: poids du l'extrait ;
- P0: poids de la matière végétale de départ.

1.2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

En dépit du développement des techniques d'analyse plus fines et plus sensibles, cette méthode demeure une technique de routine largement utilisée dans les laboratoires vu son faible coût de revient. La simplicité de sa réalisation, la valeur des informations apportées ainsi que son utilisation aussi bien à l'échelle analytique qu'à l'échelle préparative sont des facteurs qui la rendent reste très intéressante. Il s'agit d'une méthode physique de séparation, dans laquelle les composés à séparer sont distribués différemment, selon leurs caractéristiques particulières entre deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. Cette dernière se déplace à travers la première phase dans une direction définie (**Popl et al., 1990**).

1.2.3.1. Procédure de CCM

Un volume de 10 µl de l'extrait solubilisé dans le méthanol est déposé. Le développement des chromatogrammes s'effectue en phase normale sur des plaques d'aluminium Silica gel 60 F254 (Merck) 0.25 mm d'épaisseur dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié, à l'aide d'une micropipette, nous déposons l'extrait sur la plaque à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. La plaque est ensuite mise dans une cuve contenant la phase mobile. Quand le front du solvant arrive à la ligne du bord supérieur de la plaque, le chromatogramme est retiré, séché et pulvérisé avec le réactif de Dragendorff jusqu'à l'apparition de spots colorés. Différentes phases mobiles ont été utilisées.

- ✓ La phase mobile (1) : «méthanol/chloroforme/ammoniaque : 79/20/1 (V/V/V).
- ✓ La phase mobile (2) : Butanol/acide acétique/H₂O : 4/1/5 (V/V/V).

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et après la révélation par réactif de DRAGENDORFF (**Milcard, 2013**).

1.2.3.2. Calcul des facteurs de rétention (rapport frontal des spots)

Le facteur de rétention (Rf) est calculé pour chaque spot. Ceci permet la détermination de la composition des extraits en alcaloïdes (**David et Hazel, 1998**).

Le Rf est estimé par l'équation de **Audigie et al., (1995)**

$$R_f = \frac{\text{La distance parcourue par la substance}}{\text{La distance parcourue par le solvant}}$$

1.2.4. Evaluation des activités biologiques

1.2.4.1. L'activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie université Echahid Hamma Lakhdar El OUED. L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

a. Préparation des milieux de culture

Dans notre travail nous avons utilisé comme milieux de culture les suivants:

Pour tester l'activité biologique des souches bactériennes nous avons utilisé le milieu gélose Muller Hinton (MH). La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre.

Pour tester l'activité biologique des souches fongiques nous avons utilisé le Gélose Sabouraud. La gélose de Sabouraud stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. (**Hellal, 2011**).

b. Préparation des disques

Nous avons préparé les disques par papier wattman de 6mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, il faut stériliser les disques 30 minutes à 120°C dans un tube essai bien fermé. Et garder le jusqu'à l'utilisation.

c. Préparation des pré-cultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries.

Les souches de levures à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose Sabouraud et incubé pendant 48 h à 25°C pour obtenir une culture jeune des levures.

d. Préparation des suspensions

La suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune de 18 heures, puis prélever quelque colonie de la culture et l'émulsionner dans 9ml d'eau physiologique stérile jusqu'à obtention d'une DO comprise entre 0.08 et 0.1 à 700 nm correspond à une concentration de 0,5 McFarland (Hellah, 2011).

e. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Ensemencer la boîte de pétrie dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes .

f. Dépôt des disques et incubation

Déposer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres.

Quatre disques imbibés de 10 µl de différentes doses d'extrait à tester ont été déposés, un disque de 10 µl de DMSO et deux disques d'antibiotique de référence.

Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures pour les souches bactériennes couvercle en bas, et incubé les boîtes à 25°C pendant 48 heures pour les souches fongiques couvercle en bas.

g. La lecture des résultats

La lecture des résultats est réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

h. Les souches ciblées

- ***Staphylococcus aureus*** Cocci, à GRAM positif, de la famille des Micrococcaceæ, immobile et disposées en grappe de raisins, présente sur le corps et les muqueuses, et souvent responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales (20 % des cas). Cette bactérie est responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang. Elle peut entraîner aussi des abcès, des ostéites, des endocardites, des gastro-entérites et des infections pulmonaires. L'espèce Staphylocoque doré acquiert facilement des résistances aux antibiotiques (**Perry et al., 2004; Lowy, 1998**).
- ***Pseudomonas aeruginosa*** Bacille à GRAM négatif mobile, opportuniste, fréquemment incriminée dans les infections nosocomiales grâce à sa capacité de persister dans les milieux hospitaliers, sa résistance naturelle et son pouvoir d'acquisition de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques. Au cours des deux dernières décennies, l'augmentation de la prévalence des infections à *P. aeruginosa* multirésistants (PAMR) a été rapportée par plusieurs centres hospitaliers à travers le monde (**Chinbo et al., 2014**). *P. aeruginosa* est impliquée dans les infections des plaies et de l'appareil respiratoire, infections des voies urinaires et les septicémies (**Perry et al., 2004**).
- ***Escherichia coli*** est un bacille à gram négatif (**Patrick et al., 1988**), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (**Steven et al., 2004**). C'est un saprophyte normal du tube intestinal de l'homme et des animaux. C'est l'un des agents responsables de septicémies, de suppurations, de diarrhées et même de dysenteries (**Kaper, 2004**).
- ***Salmonella typhi*** Le genre Salmonella est l'un des 32 genres de la famille des Enterobacteriaceae (**Bergeron, 2009**). Salmonella est un bacille Gram négatif non sporulant, dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches (à l'exception de *S. Gallinarum* qui n'en possède pas) et qui est de type aéro-anaérobie. Ces bâtonnets de 2 à 3 µm de long sont des bactéries mésophiles, peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel. Leur développement est optimal pour des températures proches de la température corporelle des animaux à sang chaud, 35 à 37°C, et un pH de 6,5 à 7,5. Ces bactéries sont capables de résister à un large spectre de températures (-20 à 60°C) et de pH (4,1 à 9). Toutes ces caractéristiques font de ces bactéries, des organismes extrêmement résistants aux conditions environnementales

parfois défavorables et expliquent leur caractère ubiquiste (**Korsak et al ., 2004**). La *salmonella typhi* est responsable de fièvres typhique.

- ***Fusarium culmorum*** Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. Sur milieux usuels le thalle, il donne (**Patrick et al., 1988**), un mycélium plus ou moins aérien. De couleur rarement blanche ou crème, il peut être ochracé ou plus souvent de colorations vives : rose, rouge ou violet (**Aoki et Donnel, 1999**).

1.2.4.2. L'activité antioxydante (Pouvoir réducteur du fer)

Les radicaux libres sont produits dans le cadre de processus métaboliques normaux. Sous les conditions physiologiques, la production de ces radicaux au niveau cellulaire est étroitement contrôlée par un énorme système de défense dit système antioxydant (**Sies, 1997**). Cependant, une surproduction de radicaux libres d'un côté et (ou) une déficience du système antioxydant de l'autre côté, conduira à une augmentation significative de la production de ces radicaux, qui submergent la défense antioxydante et imposent un stress oxydatif pour le système physiologique (**Martínez-Cayuela, 1995**).

Le stress oxydatif peut causer des dommages aux lipides, protéines ou l'ADN cellulaires, inhibant leurs fonctions normales. Le stress oxydatif est donc impliqué dans de nombreuses maladies dégénératives telles que l'athérosclérose, les maladies coronariennes, le vieillissement et le cancer (**Valko et al., 2007**).

L'intérêt croissant pour la substitution des antioxydants alimentaires synthétiques par des matières naturelles favorise le dépistage de nouveaux antioxydants à identifier dans les sources végétales (**Moure et al., 2001**).

Le pouvoir réducteur d'extrait de *P. tomentosa* a été déterminé en utilisant la méthode de réduction du Fer (FRAP) décrit par **Chaouche et al. (2015)**, elle est basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} .

Cette méthode consiste à mélanger 200 μl de l'extrait à différentes concentrations (0 à 1000 $\mu\text{g/ml}$) avec 500 μl de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 500 μl d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 mn à 50°C, puis 500 μl d'acide trichloracétique TCA à 10% (m/v) sont ajoutés pour arrêter la réaction. 1,7 ml d'eau distillée et 200 μl de FeCl_3 à 0.1% (m/v) sont ajoutés au mélange. La lecture de

l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ($A_{0.5}$), concentration de l'extrait correspondante à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ($D.O = f([])$). L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle de témoins positifs qui est l'acide ascorbique (vitamine C), utilisé à différentes concentrations (0 à 500 $\mu\text{g/ml}$).

1.2.5. Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel Excel 2007. Toutes les expériences ont été faites en trois répétition, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

Chapitre 02.

résultats et

discussion

2.1. Rendement d'extraction 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, Le taux d'extraction des alcaloïdes a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le rendement \%} = [P_1 / P_0] \times 100$$

$$P_1 = 0,12 \text{ g}$$

$$P_0 = 80 \text{ g}$$

$$\text{Le rendement \%} = (0,12 / 80) \times 100 = \mathbf{0,15 \%}$$

Le rendement obtenu par soxhlet est très faible de l'ordre de 0,15 %, ce qui confirmé par les travaux de **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 justifié par la répartition différentielle des métabolites secondaires peuvent être partiellement dues aux facteurs génotypes qui commandent l'accumulation de ces composés dans la plante (**Ebrahimzadeh et al., 2008 ; 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 adopté et les réactifs spécifiques utilisé et la solubilité dans le solvant d'extraction pouvant d'agir sur le rendement total d'alcaloïdes (**Bougoffa, 2006**).

En effet, le rendement d'extractions des plantes dépend essentiellement de la variété, la saison de récolte, la localisation géographique, les différentes maladies que peuvent affecter la plante, la maturité de la plante et les organes (**Park et Cha, 2003**), la manière et la durée de la conservation (**Özgüvenet Tansi, 1998**).

2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) des alcaloïdes

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 :

- ✓ phase 1: Chloroforme / méthanol / ammoniaque (8/0,5 /1,5) (v/v).
- ✓ phase 2: 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 254 et 365 nm. Cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes.

Les chromatogrammes obtenus dans ces phases sont regroupés dans les tableaux 7 et 8

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

Phase mobile 1: Chloroforme/ méthanol/ ammoniaque(8/0,5 /1,5) (v/v).				
Rf	Observation Visuel	UV à 254 nm	UV à 365 nm	DRAGENDORFF
0,86	Jaune	-	Vert	Marron
0,92	-	vert	-	-

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

Phase mobile 2 : Eau / acide acétique / butanol (5/1 /4) (v/v).				
Rf	Observation Visuel	UV à 254 nm	UV à 365 nm	DRAGENDORFF
0,41	violet	-	-	Marron
0,47	Bleu	-	-	Vert
0,53	-	Vert	-	-
0,55	-	-	Bleu	Marron
0,77	jaune	-	-	Bleu
0,88	Jaune	Vert	Violet	Marron

Les résultats de l'analyse chromatographique ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes. L'extrait brut semble 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 ce métabolite secondaire.

La plaque de CCM de système de chloroforme/ méthanol/ ammoniaque, révèle deux tâches; alors que le système de l'eau / acide acétique / butanol montre six taches.

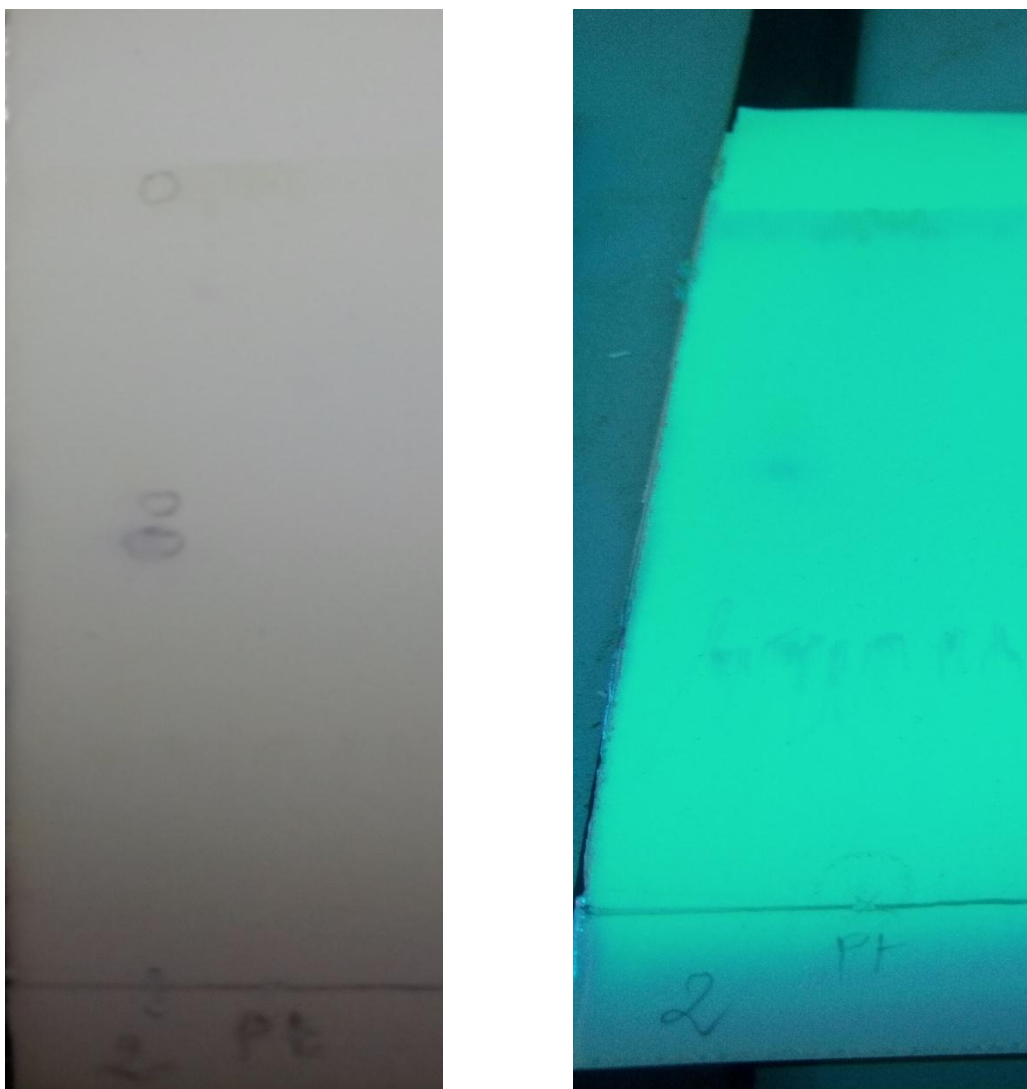


Figure 6 : Chromatogramme d'extrait alcaloïde des feuilles de *Pergularia tomentosa* de système : eau / acide acétique / butanol (8/0,5/1,5) (v/v).

Il n'est pas possible de comparer un R_f obtenu avec les valeurs signalées dans la littérature car les valeurs de R_f observées sont difficilement reproductibles, elles sont influencées par de nombreux facteurs (température, humidité, La phase stationnaire, et la phase mobile...) difficiles à contrôler (Ribereau, 1968).

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 le chromatogramme d'extrait d'alcaloïde de *Enantia chlorantha* a 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 on peut expliquer ces différences par la variabilité de solubilité des alcaloïdes dans les différents 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 tel que CLHP et RMN.

2.3. Evaluation des activités biologiques

2.3.1. L'activité antibactérienne

Nous avons étudié *in vitro*, le pouvoir antibactérien d'extrait d'alcaloïdes des feuilles de *Pergularia tomentosa* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller- Hinton pour les bactéries, et Sabouraud pour le levure.

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des germes pathogènes, qui sont: *salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*, *staphylocoque aureus*, et *fusarium culmorum*.

DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que ce dernier est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes

2.3.1.1. Etude de l'effet des alcaloïdes contre *Salmonella typhi*

Les diamètres des zones d'inhibition contre *Salmonella typhi* sont indiqués dans la figure 7.

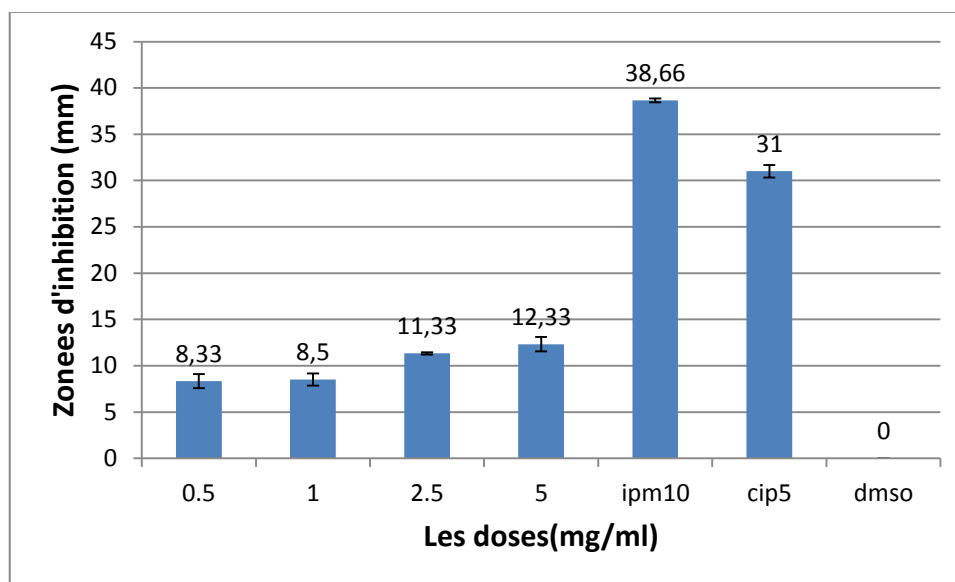


Figure 7: Résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de *P. Tomentosa* sur *Salmonella typhi*

D'après la **figure7**, *Salmonella typhi* est sensible à la Imipenem et Ciprolan avec des diamètres de zones d'inhibition de $38,66 \pm 0,22$ et $31 \pm 0,66$ mm respectivement, et une zone de $8,33 \pm 0,77$ mm jusqu'à $12,33 \pm 0,77$ mm pour les différentes doses croissantes de l'extrait.

2.3.1.2. Etude de l'effet des alcaloïdes contre *Pseudomonas aeruginosa*

Les diamètres des zones d'inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans la figure 8.

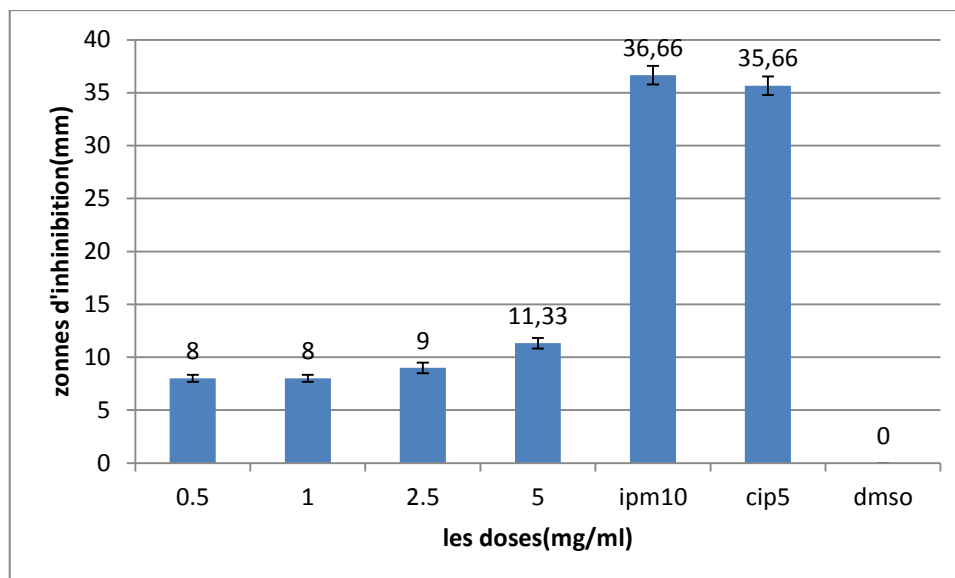


Figure 8: Résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de *P. Tomentosa* sur *Pseudomonas aeruginosa*

D'après figure 8 le *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible à la Imipenem et Ciprolan avec des diamètres de zones d'inhibition de $36,66 \pm 0,88$ et $35,66 \pm 0,88$ mm respectivement, et sensible à les alcaloïdes de *P. tomentosa* de l'ordre de 11,33mm pour la dose de 5 mg/ml.

2.3.1.3. Etude de l'effet des alcaloïdes contre *Escherichia coli*

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition contre *Escherichia coli* sont schématisés dans la figure 9.

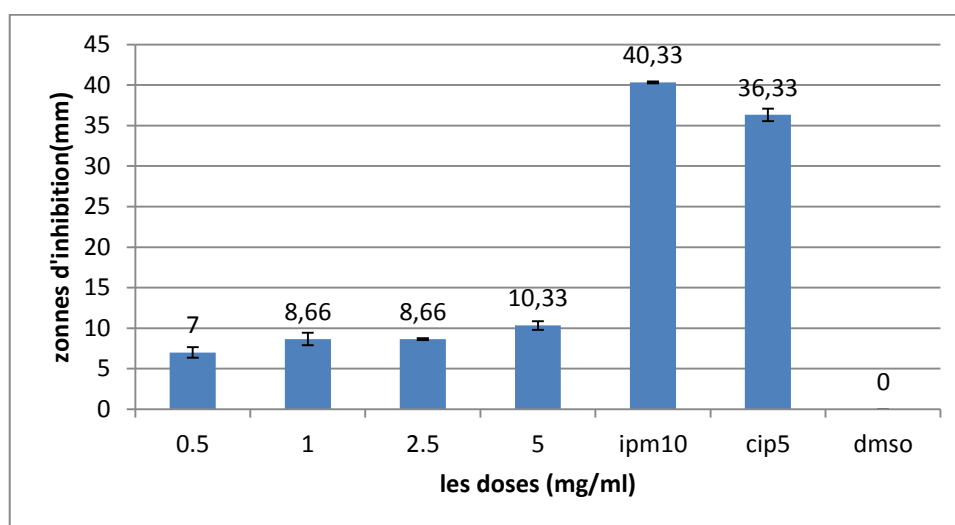


Figure 9: Résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de *P. Tomentosa* contre *Escherichia coli*

Ces résultats montrent que l'extrait des alcaloïdes de *P. Tomentosa* présente un bon pouvoir antimicrobien avec des zones d'inhibition de $7 \pm 0,66$ mm à $10,33 \pm 0,55$ mm, par rapport les antibiotiques de référence testés.

2.3.1.4. Etude de l'effet des alcaloïdes *Staphylococcus aureus*

La figure 10 présente l'effet de notre extrait contre *Staphylococcus aureus*

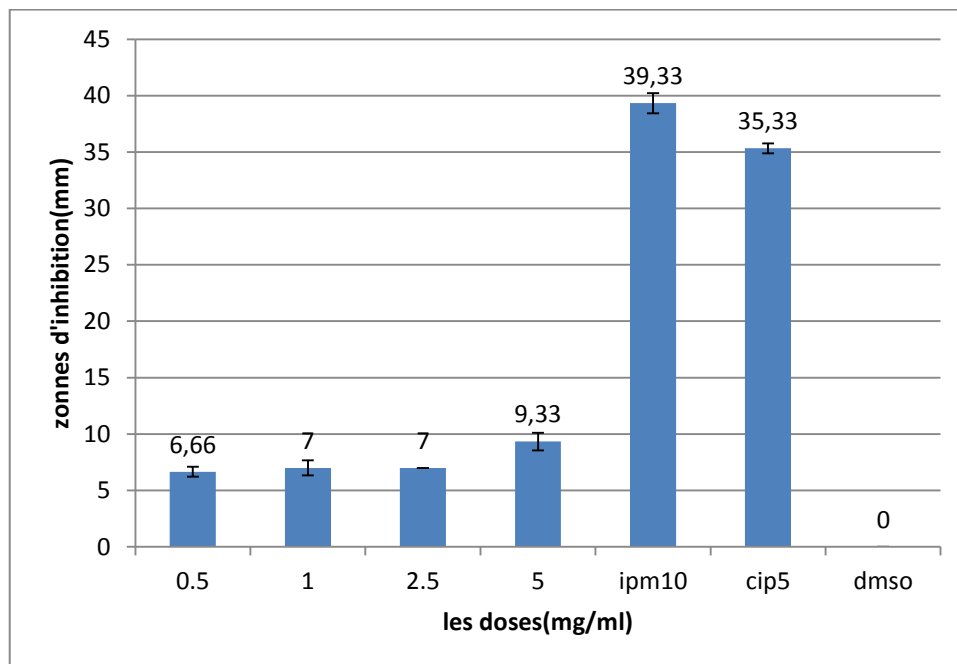


Figure 10: Résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de *P. Tomentosa* sur *Staphylococcus aureus*

D'après la figure 10 ce dessus l'Imipénème et Ciprolan ont une activité antimicrobienne très puissante par rapport l'extrait des alcaloïdes qui présente une activité moyenne de l'ordre de $9,33 \pm 0,77$ mm pour la dose de 5mg/ml.

2.3.1.5. Etude de l'effet des alcaloïdes contre *Fusarium culmorum*

Les résultats de l'activité antifongique sont regroupés dans la figure 11.

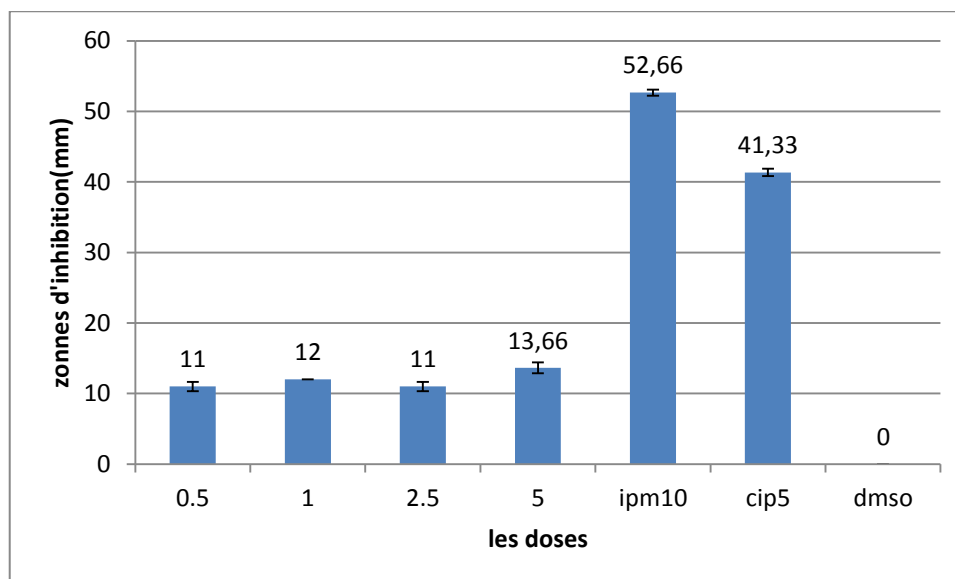


Figure 11: Résultats des zones d'inhibition des alcaloïdes de *P. Tomentosa* contre *Fusarium culmorum*

Ces résultats montrent que l'extrait d'alcaloïdes a une activité antifongique remarquable de l'ordre de $11 \pm 0,66$ mm à $13,66 \pm 0,77$ mm pour les différentes doses croissantes par contre les antibiotiques de références présentent une puissance très puissantes.

2.3.1.6. Etude comparative de l'effet antimicrobienne sur les différentes souches testées

Les résultats de comparaison entre les pouvoirs antimicrobiens sur les souches d'intérêts sont montrés dans la figure 12.

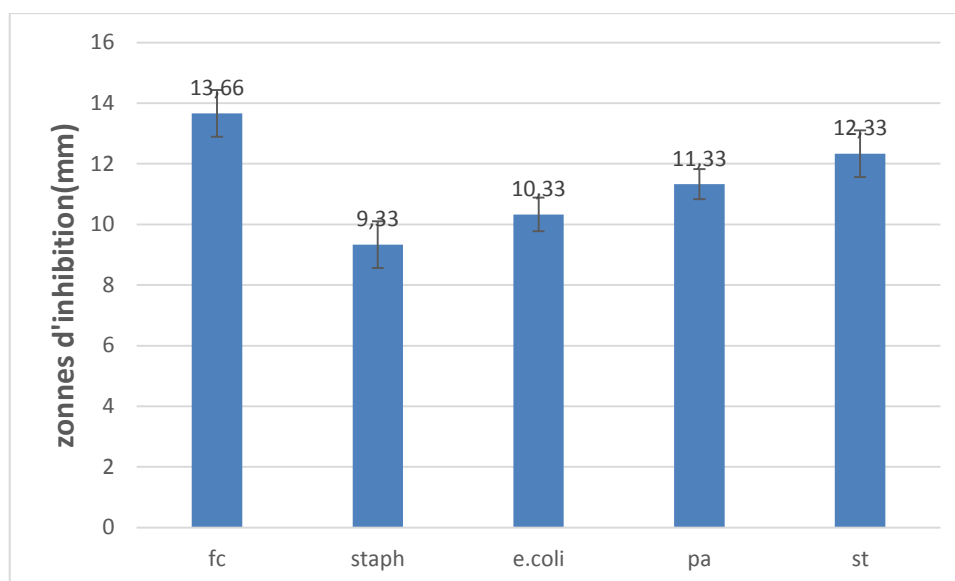


Figure 12 : Etude comparative de l'effet antimicrobienne sur les d'différentes souches testés

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* est révélé actif envers toutes les souches microbiennes testées, mais avec des degrés différents, et le *Fusarium culmorum* est la souche la plus sensible de l'ordre de $13,66 \pm 0,77$ mm par contre staphylococcus aureus est la plus résistant avec un zone de $9,33 \pm 0,77$ mm.

A la lumière de ces résultats, notre extrait montre une bonne capacité antimicrobienne sur les Cinq souche testés.

Nos résultats sont en accord avec les résultats trouvés par **Ouinis et Belila (2018)**, dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'alcaloïdes de *P. tomentosa* sur *E. coli*, *klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* de concentration de 5 mg/ml.

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

Selon **Hassan et Umar (2007)**, le pouvoir antifongique d'extrait de *Pergularia tomentosa* peut être dû à leur efficacité dans la dégradation de la paroi cellule fongique.

Les huiles essentielles, flavonoides, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions de potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (**Rhayour, 2002**).

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes (**David et Sudarsanam, 2013**).

Les résultats indiquent que nos extrait est actifs sur les grams positifs et grams négatifs, Cette importante bioactivité est similaire à l'effet des alcaloïdes de *Fumaria officinalis* étudié par **Iwasa et al., (2001)**, qui ont trouvé l'effet antimicrobienne est en relation avec leur teneur élevée en alcaloïdes isoquinoléiques causant des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries a gram négatif, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire permettant ainsi la pénétration des alcaloïdes à l'intérieur de la bactérie.

L'effet des alcaloïdes sur les souches gram positifs et grams négatifs est confirmé les travaux de **Iannello et al. (2014)** qui ont révélé la présence d'une activité antibactérienne des alcaloïdes de *Crinum angustum*, les grams positifs se sont avérés plus sensibles que les grams négatifs.

Les alcaloïdes peuvent être utilisés dans les systèmes alimentaires pour prévenir la croissance de bactéries d'origine alimentaire entraînant une extension de la durée de conservation des aliments transformés.

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), d'extrait d'alcaloïdes de cette plante.

2.3.2. L'activité antioxydante (Pouvoir réducteur du fer)

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (**LI et al, 2007**). L'acide ascorbique est un puissant antioxydant, il est utilisé comme témoin. Les résultats de l'activité antioxydante d'extrait et d'acide ascorbique sont regroupés dans la figure 13.

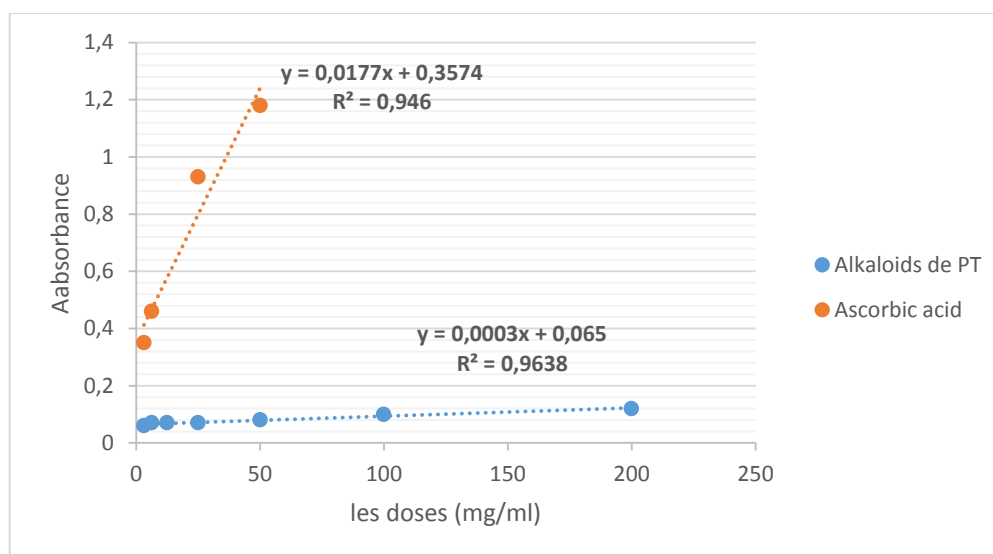


Figure 13 : Résultats de l'activité antioxydant d'extrait et d'acide ascorbique.

Les résultats obtenus nous indiquent que l'extrait possède une activité réductrice intéressante dose-dépendante, à partir des équations obtenus, nous avons calculé la concentration efficace ($A_{0,5}$), concentration de l'extrait correspondante à une absorbance égale à 0,5 (Figure 14).

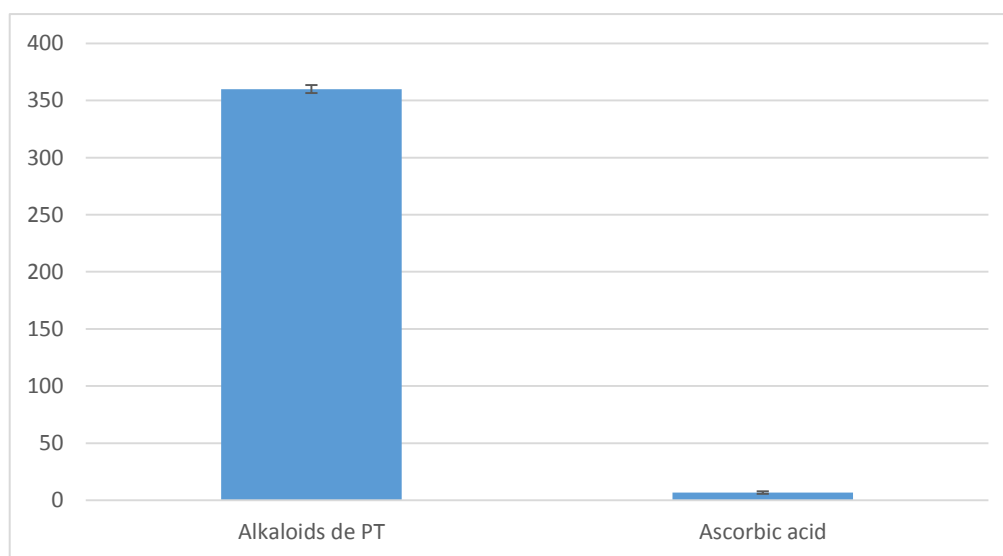


Figure 14 : Les résultats $A_{0,5}$ des alcaloïdes de *P. tomentosa*.

Les résultats du test de FRAP mentionnés sur la figure 14, indiquent que l'extrait alcaloïdique de *P. tomentosa* possède l'effet antioxydant important de l'ordre 395,85 µg/ml et l'acide ascorbique exerce l'effet le plus important, à une valeur égale à 6,77 µg/ml. L' $A_{0,5}$ est le pouvoir antioxydant de l'extrait testé sont inversement proportionnelles.

Des études antérieures ont montré un effet antioxydant important des différents extraits de *Pergularia tomentosa* issues de diverses régions (**Babaamer et al., 2014** et **Yakubu et al., 2015**). Les $A_{0.5}$ enregistrées pour les extraits des feuilles et les fleurs de *L. multifida*, *L. stoechas* et *L. dentata* sont très élevées par rapport à l'acide ascorbique qui se révèle beaucoup plus actif (**Ramdan et al., 2017**).

La variabilité de le pouvoir antioxydant peut s'expliquer par plusieurs facteurs influencés on peut citer diverses régions de la plante étudiée, différent entre les espèces des plantes végétale (**Tlili, 2015**), de l'organe végétal à tester, le période de récolte (**Bettaieb et al., 2017**) et les conditions expérimentales différent solvants (**Benhammou et al., 2009**).

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004 ; Kumaran et Karunakaran, 2007**).

Ces résultats suggèrent également que la plante étudiée constitue une source prometteuse des molécules bioactives tels que les alcaloïdes qui présentent la capacité de donner des électrons et des protons ce qui favorise la réduction du fer ferrique $Fe(III)$ en fer ferreux, aussi bien ces principes actifs peuvent récupérer les espèces oxygénées et les radicaux libres et les rend moins ou non réactifs (**Khadhri et al., 2016**).

conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires (Yakhlef, 2010).

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 par Soxhlet des alcaloïdes a donné un rendement massique faible de 0.15 %. L'analyse qualitative des extraits alcaloïdiques se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) avec différents systèmes de séparation. Il montre une hétérogénéité et une diversité des alcaloïdes, sont observés selon leurs couleurs et leurs rapports frontaux. Ces résultats ne constitue qu'une première étape, il serait également intéressant de compléter ce travail avec l'ajouté des analyses par des techniques plus développée tel que CLHP et RMN.

L'étude de l'activité antimicrobienne 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 cinq souches testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *salmonella typhi* et *fusarium culmorum*), les diamètres de zones d'inhibition variant entre 6 à 13 mm, notre extrait montre une bonne capacité antimicrobienne.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode de réduction du fer, a révélé une réponse antioxydante considérable avec l' $A_{0.5}$ de l'ordre de 395,85 $\mu\text{g/ml}$ et l'acide ascorbique exerce l'effet le plus important, à une valeur d' $A_{0.5}$ égale à 6,77 $\mu\text{g/ml}$.

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

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antimicrobienne et antioxydante de cette plante.

Références bibliographiques

- Abdel-Kader, M.S.; Kassem, F.F. et Abdallah, R.M. (2003).** Two Alkaloids from *Ephedra aphylla* growing in Egypt. Natural Product Sciences. Vol. 9. N° 2: 1-4.
- Acheuk, F. et Doumandji-Mitiche, B. (2013).** Insecticidal activity of alkaloids extract of *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) against fifth instar larvae of *Locusta migratoria cinerascens* (Fabricius 1781) (Orthoptera: Acrididae). International Journal of Science and Advanced Technology. 3(6) : 8-13.
- Afoun, M. et Ammour, S. (2017).** Etude de l'activité antioxydante des alcaloïdes d'un mélange de *Pheonix dactylifera* et de *Matricaria pubescens*. Mémoire Master en Pharmacologie Moléculaire. Université A. Mira. Bejaia. 31 p.
- Allouni, R. (2011).** Etude de la toxicité des alcaloïdes totaux des graines de *Datura stramonium* L. sur les animaux de laboratoire. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas .Sétif.92p
- Al-Said, M.S.; Ahu-Jayyab, A. et Hifnawy, M.S. (1989).** Biochemical studies on ghalakinoside. a possible antitumor agent from *Pergularia tomentosa*. Journal of Ethnopharmacology. 27 : 235-240.
- Al-Said, M.S.; Hifnawy, M.S.; Mcphail, A.T. et Mcphail, D.R. (1988).** Ghalakinoside. a cytotoxic cardiac glycoside from *Pergularia tomentosa*. *Phytochemistry*. Vol.27. No. 10 : 3245-3250.
- Aniszewski, T. (1994).** The biological basis of quinolizidine alkaloids. Science of Legumes. 1: 1-24.
- Aniszewski, T. (2007).** Elements of Applied Botany. Socrates/Erasmus Programme. Warsaw University. [In Polish]. Joensuu: Joensuu University Press.110
- Aoki, T.; Donnel, K. (1999).** Morphological and molecular characterisation of *Fusarium pseudograminearum* sp. Nov. formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia. 91 : 597-609.
- Arshad, .S. S.; Muhammad, M. A.; Randhawa, I.; Ashraf, I. et Choudhry, K. M. (2010).** Rural women's involvement in decision-making regarding lives stock management .Pakistan J. Agri. Sci..47(2): 1-4.
- Audigie, C.; Dupont, G. et Zonszain, F. (1995).** Principe des méthodes d'analyse biochimique. 2ème Edition. Ed. Biosciences et Technique. Paris. 44-56p.
- Babaamer, Z.; Sekhari, L.; Al-Jaber, H. et Al-Qudah, M. (2013).** Extraction and identification of triterpenoids from *Pergulariat tomentosa* L. Annales des Sciences et Technologie; 5: 1: 1-4.

- Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologique de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. pp : 20-22.
- Bekheet, S.H.M.; Abdel-Motaal, F.F. et Mahalel, U.A. (2011).** Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *Pergularia tomentosa* aqueous extracts on some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. *Tissue and Cell*. 43 : 398- 404.
- Belila, S.; Ounis, Z. (2018).** Contribution à l'étude phytochimique et biologique des alcaloïdes de la partie aérienne de *Pergularia tomentosa L.* Mémoire master en biologie. 69p
- Benhammou, N.; Atik-Bekkara, F. et Kadifkovapanovska, T. (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie* 12 (12): 1259-1266.
- Benkhighe, O.; Zidane, Z.; Fadli, M.; Elyacoubi, H.; Rochdi, A.; Douira A. (2010).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53 (2010-2011) 191-216.
- Bergeron, N.; (2009).** Caractérisation phénotypique d'isolats de *Salmonella Typhimurium* provenant de porcs sains ou septicémiques. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université de Montréal. 263p.
- BettaiebRebey, I.; Bourgou, S.; SaidaniTounsi, M.; Fauconnier. M.L. et Ksouri, R. (2017).** Etude de la composition chimique et de l'activité anti oxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavandula dentata*). *Journal of new sciences. Agriculture and Biotechnology*. 39(2). 2096-2105.
- Bhat, S. V.; Nagasampagi, B. A. et Sivakumar, M. (2005).** Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India.. Ch. 4. 237.872p.
- Bougar, N. et Belkacem-Kourmi, Z. (2016).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et anti-bactérienne de l'extrait de la plante *Urtica dioica L* (ortie dioïque). Master en Chimie. Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana. 81p.
- Bougoffa, K. (2006).** Identification par HPLC des polyphénols et alcaloïdes de deux espèces de « Fumaria » 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.

- Bruneton, J. (1999).** Terpènes et stéroïdes. In pharmacognosie. phytochimie. plantes médicinales. 3ème Edition : Lavoisier. pp : 484-53
- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie. Phytochimie. plantes médicinales. 4e éd.. revue et augmentée. Paris. Tec & Doc - Éditions médicales internationales.1288 p.
- Catier, O. et Roux, D. (2007).** Botanique. Pharmacognosie. Phytothérapie: Cahiers du préparateur en pharmacie. 3ème ed. France: Wolters Kluwer.144.
- Chaouche, T. M.; Haddouchi, F.; Atik-Bekara, F.; Ksouri, R.; Azzi, R.; Boucherit, Z.; Tefiani, C. et Larbat, R. (2015).** Antioxidant. haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus*. Industrial Crops and Products. 64:182-187.
- 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.
- Chehma, A. (2006).** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional Algérien. Ed. Dar Elhouda. Ain M'lila.137p.
- Chinbo, M.; Moutachakkir, M.; Addebbous, A.; El Khoudri, N., Chabaa, L. et Soraa, N. (2014).** Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* dans un hôpital pédiatrique marocain: implications thérapeutiques. International Journal of Innovation and Scientific Research. Vol. 11. N°. 2. pp. 283-290
- Chung, R.; Firth, M.; & Kim, J.B. (2002).** Institutional monitoring and opportunistic earnings management. Journal of Corporate Finance. 8(2).29-48.
- David B.C. et Sudarsanam G. (2013).** Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). Journal of Acute Disease; 222-225.
- David, J.H. et Hazel, P. (1998).** Analytical biochemistry. 3ème Edition. Ed. Prentice Hall. Angleterre: 336p.
- Dehak, K. (2013).** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Doctorat de Chimie. Université Kasdi Merbah. Ouargla. 22 p.
- Dewick, P.M (2001).** Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 2nd Edition. John Wiley and sons. LTD. England.550p.
- Dih, A. et 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.

- Donatien, C. (2009).** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes extraction. identification d'alcaloïdes-caractérisation. quantification de polyphénols : Etude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako. pp 145.
- Ebrahimzadeh, M. A.; Pourmmorad, F. et Hafezi, S. (2008).** Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. *Turkish journal of biology*. 32 : 43-49.
- Edeas, M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*. 5(5). 264-270.
- Francois, R. (2008).** Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité. Edition Dunod. Paris. 726p.
- Garnier, J.P.; Brandely, M.L. et Taburet, A.M. (2009).** Actualités en Pharmacie et Biologie Clinique.Maladie d'Alzheimer Accidents Vasculaires cérébraux Protéomique. Métabolique.Ed.john Libbey Eurotext. paris.p57.
- Gohar, A.A.; EL-Olemy, M.M.; Abdel-Sattar, E.; El-Said, M. et Niwa, M. (2000).** Cardenolides and β -SitosterolGlucoside From *Pergularia Tomentosa*. L. *Naturel productScience*. 6(3) : 142-146.
- González, A.G.; Barrera, J.B.; García, T.Z. et Rosas, F.E. (1984).** Sesquiterpene lactones from Centaurea species. *Phytochemistry*. Vol. 23(9): 2071–2072.
- 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.
- Hamliche, V. et Maiza, K. (2006).** Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of TassiliN'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 105 : 358–367.
- Hamliche, V.; Merad, R. et Azzouz, M. (2013).** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer-Verlag France. Paris. 300p.
- Harborne, J. B. (1995).** Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1995; 14: 83-98.
- Hassan, S.; Umar. R.; Ladan, M.J.; Myemike, P.; Wasagu, R.S.U.; Lawal, M. et Ebbo, A.A. (2007).** Nutritive Value. Phytochemical and Antifungal Properties of *Pergularia tomentosa* L. (Asclepiadaceae). *International Journal of Pharmacology*. 3 : 334–340.
- hastata* Decne. (Asclepiadaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3(9). 1375-1383. En ligne
- Hellah, Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur sardine (*Sardina*

pilchardus). Thèse de magister. Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 120p.

Hmeyada, A. (2009). Contribution à l'étude des plantes médicinales de Mauritanie. *Ann. Univ. Lomé (Togo)*. Tome XVII. pp. 9-27.

<http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.22>

Hussein, H.I.; Al-Rajhi, D.H.; El-Shahawi, F.I. et Hashem, S.M. (1999). Molluscicidal Activity of *Pergularia tomentosa* (L.). Methomyl and Methiocarb. Against LandSnails. *International Journal of Pest Management*. 45 : 211–213.

Iannello, C.; Bastida, J.; Bonvicini, F.; Antognoni, F.; Gentilomi, G.A. et Poli, F. (2014). Chemical composition. and in vitro antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Nat Prod Res*. 28(10):704-10.

Iserin, P.; Masson, M.; Restellini, J. P.; Ybert, E.; De Laage de Meux, A.; Moulard, F.; Zha, E.; De la Roque, R.; De la Roque, O.; Vican, P.; Deelesalle –Féat, T.; Biaujeaud, M.; Ringuet, J.; Bloth, J. et Botrel, A. (2007). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

Iwasa, K.; Moriyasu, M.; Tachibana, Y.; Kim, H.S.; Wataya, Y.; Wiegred, W.; Bastow, F.K.; Cosentino, M.; Kozuka, M. et Lee, H.K. (2001). Simple isoquinoline and benzulisoquinoline alkaloids as potential Antimicrobial. Antimalarial. Cytotoxic and Anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (9): 2871-2884.

Jeong, H.S. et al. (2004). RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins. *Nucleic Acids Res* 32(2):407-14

Kaper, J.B.; Nataro, J.P. et Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2:123-140.

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.

Khadhri, A.; ElMoknir, R. et Smiti, S. (2016). Composés Phénoliques et Activités Antioxydantes De Deux Extraits De Chardon a Glu. *Atractylisgummifera*. 39:47-53.

Konkon, N.G.; Simaga, D. et Adjoungova, A. (2006). Etude phytochimique de *mitragynainermis* (willd.)ktze (rubiaceae). plante a feuille antidiabetique «PharmMédTradAfr. Vol. 14 . pp 73-80.

- Korsak, N.; Clinquart A. et Daube, G. (2004).** Salmonella spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale: un réel problème de santé publique ? Les annals de médecine vétérinaire 148(4): 174-193
- Kumaran, A. et Karunakaran, J.R. (2007).** In-vitro antioxi-dant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT Food Sci. Technol.. 40(2): 344.
- latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. pp : 20-22.
- Li, Y. et al. (2007)** An enzyme-coupled assay for amidotransferase activity of glucosamine-6-phosphate synthase. Anal Biochem 370(2):142-6.
- Lowy, F. D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. The New England Journal of Medicine. Vol. 339. N° 8. pp. 520-532.
- Macheix, J.J.; Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques. 192
- Madiélé, A. B. et al. (2014).** Caractérisations Analytiques Des Extraits Colorants Des Plantes Tinctoriales d'Afrique Centrale. Lebanese Science Journal. 16(1).
- Maiza, K.; Brac De La Perriere, R.A. et Hammiche, V. (1993).** Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11eme Conférence international d'Ethnomédecine. Heidelberg:169-171.
- Maldonado, M. (2012).** *Peumus boldus* M. De la botanique à la thérapeutique. Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état. Université Joseph Fourier. faculté de pharmacie de Grenoble. pp : 6-19.
- Mamadou, B. (2011).** Etude Ethnobotanique. phytochimique et activités biologiques de *auclea 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
- Martinez-Cayuela M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie Vol. 77. pp: 147-161
- Merzoug, S. (2009).** Structure du Fuligule nyroca Aythyanyroca dans les zones humides du littoral Est de l'Algérie : Statut et description des habitats. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. 101 p.
- 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
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M. Et Sineiro J. (2001).** Natural antioxydants from residual sources. Food Chemistry. P 72- 145-171.
- Nacoulma, AP. (2012).** Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92p.
- Neuzinger, H.D. (1996).** African Ethnobotany: Poisons and Drugs: Chemistry Pharmacology. Toxicology. Edition: HAPMAN ET HALL. Germany. pp. 246-248
- Niszewski, T. (2007).** Elements of Applied Botany. Socrates/Erasmus Programme. Warsaw University. [In Polish]. Joensuu: Joensuu University Press.
- Nollet, L.M.L.; et TOLDRA, F. (2013).** Food Analysis by HPLC. Third Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. London. 1063p
- 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.
- Ozenda, P. (1991).** Flore de Sahara. Mise à jour et augmentée. 3ème ed. Dunod. CNRS. Paris. 262 p.
- Ozenda, P. (2004).** Flore et végétation du Sahara. 3ème édition. CNRS. Paris. 661 p.
- Ozgüven, M. et Tansi, S. (1998).** Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 22(6): 537-542.
- Paris, M. et Hurabielle, M. (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris. pp: 102-103-104-107.
- Park, H.J. et Cha, H.C. (2003).** Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean. Journal of biological society. 7: 327-330.
- Patrick, B.; JEAN, L. et Michel, S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108
- Perry, J.J.; Staley, J.T. et Lory, S. (2004).** Microbiologie. Cours et questions de révision. Dunod. 912 p.

- Piacente, S.; Masulio, M.; De Neve, N.; Dewelle, J.; Hamed, A.; Kiss, R. et Mijatovic, T. (2009).** Cardenolides from *Pergularia tomentosa* Display Cytotoxic Activity Resulting from Their Potent Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Nat. Prod.* 72 : 1087–1091.
- Popl, M.; Fahnrich, J. et Tatar, V. (1990).** Chromatographic Analysis of Alkaloids. Marcel
- RAHYOUR, K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. UFR : These De Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Faculté des Sciences. Dhar Mehraz. Fès. 170.
- Ramdan, B.; Amakran, A.; Bakrim, N.; Vannier, B.; Greche, H. et Nhiri, M. (2017).** Anti-glycation and radical scavenging activities of hydro-alcohol and aqueous extracts of nine species from Lamiaceae family. *Journal of Medicinal Plants.* 5(1). 331-345.
- Razzakov, N.A. (1998).** Alkaloides of *Mandragora turcomanica*. chemistry of natural compounds. 34. 741-742.
- Rebouh, M. et 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.
- Ribereau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod Ed. Paris.
- 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.
- Schmelzer, G.H. et Gurib-Fakim, A. (2013).** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(2) plantes médicinales 2. Fondation PROTA. Wageningen. Pays-Bas. pp : 224-226.
- Seck, M. et al. (2015).** Etude de l'activité antifalcémiant d'extraits de racines de *Leptadenia*
- Shakirova, U.T. et al. (2003).** Accumulation Dynamics Of Alkaloids In *Petilium eduardi*. *Chemistry of Natural Compounds.* 6 (39). 603-604.
- Sheded, M.G.; Pulford, I.D. et Hamed, A.I. (2006).** Presence of major and trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert. Egypt. *Journal of Arid Environments.* 66 : 210–217.
- Shinkafi, S.A. (2013).** Antidermatophytic activities. phytochemical screening and Chromatographic studies of *Pergularia tomentosa* L. and *Mitracarpus scaber* Zucc. (Leaves) Used in the Treatment of Dermatophytoses. *International Research Journal of Microbiology.* Vol. 4(1) : 29-37.

- Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* Vol. 82. pp. 291-295.
- Singla, D.; Sharma, A.; Kaur, J.; Panwar, B.; Gajendra, P.S. et Raghava, J. (2010).** BIADB: A curated database of benzylisoquinoline alkaloids. *BMC Pharmacology*. 8:4-10.
- Steven, P.; Rachel, C.; Martha, E.; Paul H., Jane S. et Peter W.J. (2004).** Microbiology Of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132
- Tabuti, J.R.S.; Dhillon, S.S. et Lye, K.A. (2003).** The Status Of Wild Food Plants In Bulamogicounty. Uganda. Submitted For Publication. pp. 485-495
- Tidjani, S. (2015).** Etude Phytochimique et Evaluation Biologique de L'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl. THESE doctorat en sciences. université des frères mentouri constantine.197p.
- 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 Kadi Merbah. Ouargla. 86 p.
- valco m., j.c. pihodes, j. moncol, m. izatovic et m. mazur (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.*160. 1-40.
- Yakhlef, A. (2010).** Etude de l'activité biologique des extraits de Feuilles de *Thymus vulgaris* L. Et *Laurus nobilis* L. Mémoire de Magister en Biologie. Université El Hadj Lakhdar .Batna.p110
- Yakubu, J.; Usmanyb, I .; BalamiM, v.; Jonathan, N.; Semi, Y. et Teri, D.M. (2015).** Phytochemical and elemental analyseis of some organic solvent leaf extracts of *piliostigmathonningii*(schumach) Milne-Redhead Ewemen journal of Folklore medecine.2(2): 49-57
- 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* .<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v103i1.109893>. En ligne -103:9886

Résumé

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), L'échantillon choisi est étudiés 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 antimicrobienne de ces composés.

L'extraction des alcaloïdes a permis d'obtenir un rendement massique faible de l'ordre de 0,15 %. Les résultats de l'analyse par CCM ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes. L'extrait bruts semblent avoir des différents classes des alcaloïdes, mais avec des concentrations différentes. Ce qui confirme la richesse d'extrait en ce métabolite secondaire.

L'étude de l'activité antibactérienne a été effectuée sur cinq souches par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait des alcaloïdes des feuilles de *Pergularia tomentosa* ayant une bonne pouvoir inhibitrices vis à vis les souches testées, et montre une capacité antimicrobienne remarquable.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode de réduction du fer, Les résultats obtenus nous indiquent que l'extrait possède une activité réductrice intéressante dose-dépendante par rapport à celui de l'acide ascorbique (comme témoin).

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

ملخص

الجنوب الجزائري غني بالنباتات الطبية والعطرية التي يمكن أن يكون لها خصائص علاجية ، على سبيل المثال *Pergularia tomentosa*.L. والتي تنمو تلقائيًا في منطقة الوادي وتمت دراسة أوراق هذه النبتة من خلال محتواها النوعي والكمي من المركبات القلويدية ، متبوعًا بتحليل كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة والتقييم المختبري للأنشطة المضادة للأوكسدة والمضادة للميكروبات لهذه المركبات.

استخراج قلويدات أعطى مردود منخفض يصل إلى 0.15 ٪. كشفت نتائج تحليل الكروماتوجرافيا وجود أنواع مختلفة من القلويدات ولكن بتركيزات مختلفة. هذا يؤكد ثروة المستخلص من هذا المستقلب الثانوي.

تم إجراء دراسة النشاط المضاد للميكروبات على خمس سلالات بواسطة طريقة الانتشار عن طريق القرص. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن المستخلص القلوي لأوراق *Pergularia tomentosa* له تأثير مثبط جيد على السلالات المختبرة ، وأظهر قدرة معتبرة ضد بعض الميكروبات والفطريات .

تقييم نشاط مضادات الأوكسدة باستخدام طريقة إرجاع الحديد ، تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن المستخلص له نشاط إرجاعي مثير للاهتمام مقارنة مع حمض الأسكوربيك (كشاهد).

الكلمات المفتاحية: *Pergularia tomentosa* L. ، قلويدات ، CCM ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم.

Summary

The Algerian south is rich in medicinal plants that can have therapeutic properties, for example *Pergularia tomentosa* L. which grows spontaneously in the region of Megibra (El-Oued), the selected sample is studied through their qualitative and quantitative content in alkaloid compounds, followed by thin layer chromatography analysis and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of these compounds.

The extraction of the alkaloids made it possible to obtain a low mass yield of the order of 0.15%. The results of the TLC analysis revealed the presence of alkaloids. The crude extract appears to have different classes of alkaloids, but with different concentrations. This confirms the wealth of extract in this secondary metabolite.

The study of antimicrobial activity was performed on five strains by the disk diffusion method. The results obtained indicate that the alkaloid extract of *Pergularia tomentosa* leaves has a good inhibitory effect on the strains tested, and shows a remarkable antimicrobial capacity.

Evaluation of the antioxidant activity using the iron reduction method, The results obtained indicate that the extract has an interesting reducing activity dose-dependent compared to that of ascorbic acid (as a control).

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