

UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Année : 2014-2015

N° d'enregistrement :

/.../.../.../.../

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option biochimie et analyse de bioproduits

Thème :

**Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique
des extraits de *Pergularia tomentosa* issue
de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional)**

Soutenu publiquement Par

TLILI Mohammed Laid

Devant le jury composé de :

BISSATI Samia,	Professeur,	Univ. K.M. Ouargla,	Présidente
HADJ-MAHAMMED Mahfoud,	Professeur,	Univ. K.M. Ouargla,	Rapporteur
OULD EL HADJ MOHAMED Didi,	Professeur,	Univ. K.M. Ouargla,	Examineur
DEHAK Karima,	M.C. (A),	Univ. K.M. Ouargla,	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie Monsieur HADJ MAHAMMED M., Professeur à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de diriger ce travail et pour la confiance qu'il m'a accordé et son accueil au laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques de l'université KASDI MERBAH, Ouargla.

Mes vifs remerciements vont à Madame BISSATI-BOUAFIA S. Professeur et doyenne de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla, pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie également, Monsieur OULD EL HADJ M.D., Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie ainsi que Madame OUGHLISSI-DEHAK K., Maitre de Conférences (A) à la faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury. Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements pour leur disponibilité.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Melle HAMMOUDI R. et tout le personnel du laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques (UKM Ouargla), pour leurs encouragements et leurs aides précieuses durant toute la période de ma formation en Magister.

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été précieuse pour quelques aspects de ce travail, en particulier Monsieur EDDOUD A. ainsi que tout le personnel du laboratoire de Valorisation et technologie des Ressources Sahariennes de l'université d'El-Oued. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je ne saurais omettre d'adresser mes remerciements et ma reconnaissance à tous les enseignants de l'université KASDI MERBAH-Ouargla, pour le soutien et la formation qu'ils m'ont prodigué tout au long de mes études, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond respect et grande considération.

Enfin, je remercie mes proches et amis (es). Merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ma formation.

Sommaire

Titres	Page
Introduction.....	1
Partie 01 : synthèse bibliographique	
Chapitre I. Généralités sur les composés phénoliques	
I.1. Les polyphénols.....	3
I.2. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques.....	8
I.2.1. Activité antioxydante	8
I.2.2. Activités antimicrobienne	9
I.2.3. Activité anti-inflammatoire	10
I.2.4. Prévention contre les maladies cardiovasculaires.....	10
I.3. Rôle des polyphénols dans les plantes.....	10
I.4. Méthodes Extraction des polyphénols	11
I.4.1. Macération.....	11
I.4.2. L'extraction au Soxhlet.....	11
I.4.3. L'extraction assistée par ultrasons.....	11
I.4.4. L'extraction en phase solide (EPS).....	12
I.4.5. L'extraction assistée par micro-ondes.....	13
I.4.6. L'extraction par fluide supercritique.....	13
I.5. Méthodes d'analyse des polyphénols.....	14
I.5.1. Etude par spectrophotométrie UV-visible.....	14
I.5.2. Etude par chromatographie.....	15
I.6. Applications industrielles des polyphénols.....	18
Chapitre II. Généralités sur les activités biologiques	
II.1. Activité antioxydante.....	19
II.1.1. Le stress oxydant.....	19
II.1.2. Les systèmes de défense antioxydants.....	20
II.1.3. Mécanismes d'action des antioxydants.....	20
II.1.4. Polyphénols comme antioxydants.....	20
II.1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	21
II.2. Activité antimicrobienne.....	21
II.2.1. Principales substances antimicrobiennes.....	22
II.2.2. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens.....	22
II.3. Activité anticoagulante.....	24
II.3.1. Les thromboses artérielles.....	24
II.3.2. Les thromboses veineuses.....	24
II.3.3. Cascade de coagulation veineuse.....	24
II.3.4. Traitement des maladies thrombotiques.....	27
Chapitre III. Généralités sur l'espèce <i>Pergularia tomentosa</i>	
III.1. Description botanique de <i>Pergularia tomentosa</i>	30
III.2. Position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i>	31
III.3. Origine et répartition géographique.....	32
III.4. Ecologie.....	32
III.5. Usages traditionnels.....	33
III.6. Les travaux antérieurs.....	34

III.6.1. Composition biochimique du <i>Pergularia tomentosa</i>	34
III.6.2. Activités biologiques et thérapeutiques du <i>Pergularia tomentosa</i>	38
Partie 02 : Expérimentale	
Chapitre I. Matériels et méthodes	
I. Matériel végétal.....	40
II. Tests phytochimiques.....	41
III.1. Extraction des composés phénoliques.....	44
IV. Analyses quantitatives.....	47
IV.1. Dosage de polyphénols totaux.....	47
IV.2. Dosage de flavonoïdes.....	47
IV.3. Dosage de tanins condensés.....	47
V. Analyses qualitatives.....	48
V.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	48
V.2. Analyse par chromatographie C.L.H.P.....	48
VI. Tests des activités biologiques.....	49
VI.1. Activité antioxydante.....	49
VI.1.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	49
VI.1.2. Test de FRAP.....	50
VI.2. Activité antimicrobienne.....	51
VI.3. Activité anticoagulante.....	52
VI.3.1. Temps de Quick ou taux de prothrombine (TP).....	52
VI.3.2. Temps de céphaline Kaolin (TCK).....	53
VII. Analyses statistiques.....	53
Chapitre II. Résultats et discussions	
I. Tests phytochimiques.....	54
II. Extraction des composés phénoliques.....	55
III. Analyses quantitatives.....	57
III.1. Dosage des polyphénols totaux.....	57
III.2. Dosage de flavonoïdes.....	59
III.3. Dosage des tanins condensés.....	60
III.4. Analyse statistique.....	61
IV. Analyses qualitatives.....	62
IV.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	62
IV.2. Analyse par chromatographie C.L.H.P.....	69
V. Tests des activités biologiques.....	71
V.1. Activité antioxydante.....	71
V.1.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	71
V.1.2. Test de FRAP.....	74
V.2. Activité antimicrobienne.....	78
V.3. Activité anticoagulante <i>in vitro</i>	82
Conclusion.....	84
Références bibliographiques.....	86
Annexe	

Liste des figures

N°	Figures	Page
01	Représentation des différents éléments composant la chaîne CLHP.....	17
02	Description des processus aboutissant à la formation du Thrombus.....	25
03	Cascade de la coagulation.....	26
04	Structure des cardénolides isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i>	35
05	Structure des flavonols isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i>	36
06	Structure des quelques triterpènes isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i>	37
07	Carte géographique du Sahara septentrional.....	41
08	Rendements d'extraits brutes des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> issues des quatre zones d'études.....	56
09	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	57
10	Teneurs en phénols totaux.....	57
11	Courbe d'étalonnage de rutine pour le dosage des flavonoïdes.....	59
12	Teneurs en flavonoïdes.....	59
13	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.....	60
14	Teneurs en tanins condensés.....	60
15	Effet des sites sur les teneurs en polyphénols totaux.....	61
16	Effet des sites sur les teneurs en flavonoïdes.....	61
17	Effet des sites sur les teneurs en tannins condensés.....	61
18	Chromatogramme des extraits éthanoliques des feuilles du <i>Pergularia Tomentosa</i>	63
19	Chromatogramme des fractions d'acétate d'éthyle et butanolique des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	64
20	Chromatographie sur gel de silice des fractions Aqueuse résiduelle des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	66
21	Chromatogramme des fractions éther de pétrole des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	67
22	Chromatogramme de l'extrait butanolique de feuille de site A obtenu par CHLP.....	69
23	Chromatogramme des extraits butanoliques de différents sites obtenu par CHLP.....	69
24	Histogramme des résultats de concentrations inhibitrices 50% de DPPH des différents extraits.....	72
25	Effet des sites sur l'activité antioxydante test DPPH.....	73
26	Effet des solvants sur l'activité antioxydante test DPPH.....	74
27	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.....	74
28	Effet des sites sur l'activité antioxydante par le test FRAP.....	76
29	Effet des solvants sur l'activité antioxydante par le test FRAP.....	76

Liste des tableaux

N°	Tableaux	Page
I	Principales classes des composés phénoliques.....	4
II	Différentes classes des flavonoïdes.....	6
III	Aperçu des différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale du plasma et des matrices alimentaires.....	21
IV	Les facteurs de coagulation et leurs dénominations.....	27
V	Utilisations traditionnelles du <i>Pergularia tomentosa</i>	33
VI	Composition en métabolites primaires des différentes parties de <i>Pergularia tomentosa</i>	34
VII	Composition minérale de <i>Pergularia tomentosa</i>	37
VIII	Caractéristiques géographiques des stations de récolte.....	40
IX	Gradient d'élution HPLC pour l'analyse des polyphénols.....	49
X	Les souches microbiennes testées.....	51
XI	Screening chimiques de <i>Pergularia tomentosa</i> issue de quatre sites du Sahara septentrional	54
XII	Rendements des fractions des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>	56
XIII	Résultats de CCM des extraits bruts éthanoliques des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	63
XIV	Résultats de CCM des fractions d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>	64
XV	Résultats de CCM des fractions butanoliques des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>	65
XVI	Résultats de CCM des fractions aqueuses résiduelles des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	66
XVII	Résultats de CCM des fractions éther de pétrole des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>	67
XVIII	Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH.....	71
XIX	Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test FRAP.....	75
XX	Résultats de l'activité antimicrobienne.....	79
XXI	Résultats d'activité anticoagulante des feuilles du <i>Pergularia tomentosa</i>	83

Liste des photos

N°	Photos	Page
01	Feuille et fruits de <i>P. tomentosa</i> L	30
02	<i>Pergularia tomentosa</i> L.....	31
03	Montage d'extraction des huiles essentielles à partir des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> par Clevenger.....	43
04	Activité des extraits bruts de macération des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	81
05	Activité des extraits bruts d'ultrasons des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	81
06	Activité de fractions butanoliques des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	81
07	Activité de fractions acétate d'éthyle des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	81
08	Activité de fractions butanoliques des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Candida albicans</i>	81
09	Activité de fractions aqueuse résiduelle des feuilles du <i>P. tomentosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	81

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	L'acide ribonucléique
ATTC	American Type Culture Collection
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CoA	Coenzyme A
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DPPH	Diphényl picryl hydrazyl
EOA	Espèces oxygénées activées
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power)
LC-MS	La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDL	Lipoprotéine de basse densité
MAcOEt	Fraction d'acétate d'éthyle
MAq	Fraction aqueuse résiduelle
MBr	Extrait brut éthanolique de macération
MBuOH	Fraction du n-butanol
MEP	Fraction d'éther de pétrole
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Ppm	Partie par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TCK	Temps du chéphaline-kaolin
TP	Taux de prothrombine
TQ	Temps de Quick
US	Ultrasons
USBr	L'extrait brut éthanolique de l'ultrason
UV	Ultraviolette
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Site A	Site de Méguibra (El-Oued)
Site B	Site de Negrine (Tébessa)
Site C	Site de Mansoura (Ghardaïa)
Site D	Site de Metlili (Ghardaïa)

Introduction

Le Sahara Algérien qui s'étend sur les 2/3 de la superficie du pays avec plus de deux millions de Km² recèle des ressources naturelles qui méritent une grande attention. La préservation de cet écosystème passe par l'amélioration des connaissances et la conservation de la diversité biologique comprenant la flore. Celle-ci regroupe particulièrement les plantes spontanées qui ont développé sur des milliers d'années des qualités et des adaptations qui s'harmonisent parfaitement avec les conditions déjà extrêmes de ces milieux (**FELLOUS, 2003**).

L'utilisation très vaste des plantes spontanées depuis des siècles par l'homme pour traiter les différentes pathologies courantes ont poussé les chercheurs à étudier les activités pharmacologiques des différents métabolites végétaux. Ces études ont pour but d'une part, de confirmer les propriétés thérapeutiques et d'autre part l'identification des principes actifs à l'origine de vertus attribuées aux plantes (**JENSEN, 2002**).

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

Les polyphénols, en particulier, sont doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique, expliquant ainsi leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (**BRUNETON, 2009**).

Notre travail qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine génétique qui englobe l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle et suite à des travaux antérieurs, nous nous sommes proposé d'étudier la plante *Pergularia tomentosa* issue de quatre différents sites du Sahara septentrional. L'espèce *Pergularia tomentosa* L. appartient à la famille des Asclepiadaceae. 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 de cette plante ainsi que sur l'évaluation des activités antioxydante, antimicrobienne, et anticoagulante des extraits préparés.

Cette étude a été divisée en deux parties ; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe quatre chapitres dont le premier concerne les

antioxydants. Le deuxième chapitre est consacré aux métabolites secondaires, leur classification et leurs propriétés pharmacologiques. Nous donnerons dans le troisième chapitre quelques méthodes d'évaluations de l'activité antioxydante et enfin, une description détaillée de la plante étudiée sera donnée dans le dernier chapitre.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Les tests phytochimiques des différentes parties de la plante.
- L'extraction des polyphénols par macération et aux ultrasons.
- L'analyse des extraits par CCM et CLHP.
- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins,
- Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante, par deux méthodes, la réduction de fer et le piégeage du radical libre DPPH.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne.
- Evaluation de l'activité anticoagulante

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

Partie 01 :
Synthèse
bibliographique

Chapitre I.
Généralités sur les composés
phénoliques

I.1. Les polyphénols

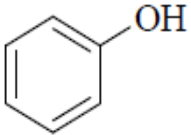
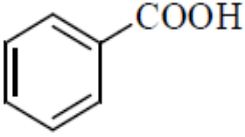
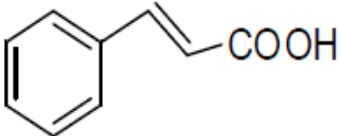
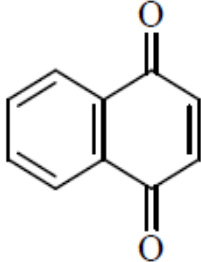
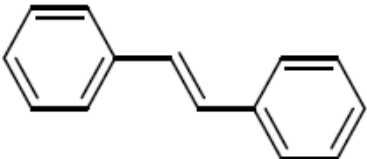
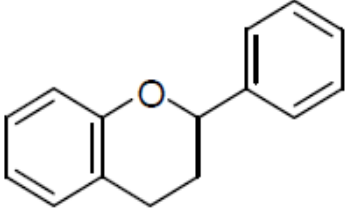
I.1.1. Généralités

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus. Ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (**KÜHNAU 1976**). Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné (**BRUNETON, 2009**).

On distingue :

- les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3)
- les flavonoïdes (C6-C3-C6)
- les lignanes (C6-C3-C3-C6)
- les stilbènes (C6-C2-C6).

Tableau I : Principales classes des composés phénoliques (REZAIRE, 2012)

Squelette carboné	Classe	Structures de base
C_6	Phénols simples	
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamique coumarines	
C_6-C_4	Naphtoquinones	
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	

I.1.2. Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- ❖ celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples.
- ❖ celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les 1,8-dihydroxyanthraquinones ou les naphthoquinones (**BRUNETON, 1999 ; KAN *et al.*, 2007**).

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, tels que les flavonoïdes (**MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002**).

I.1.3. Les flavonoïdes

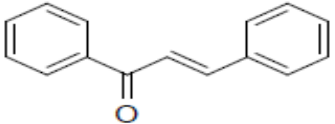
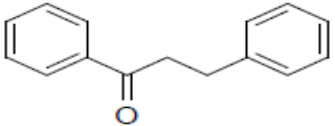
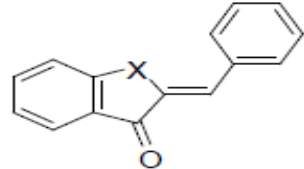
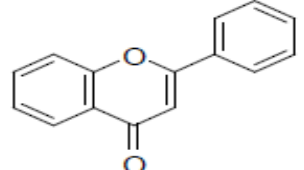
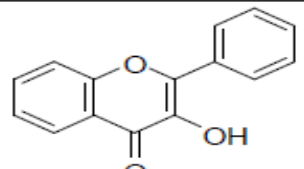
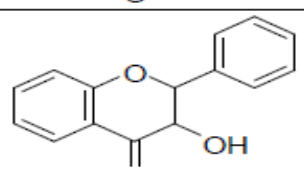
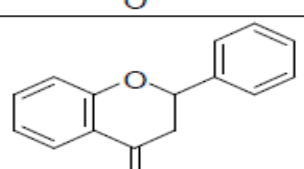
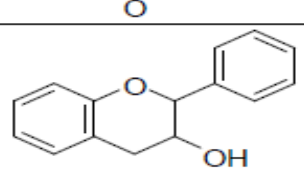
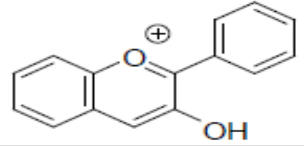
I.1.3.1. Généralités

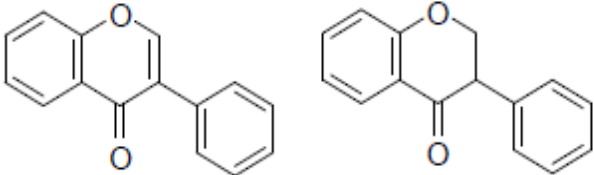
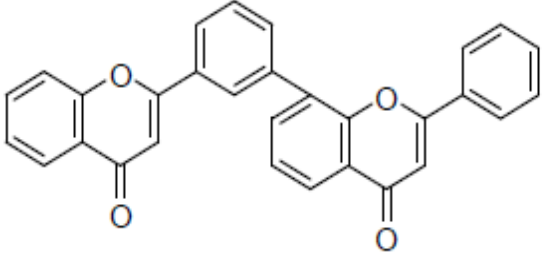
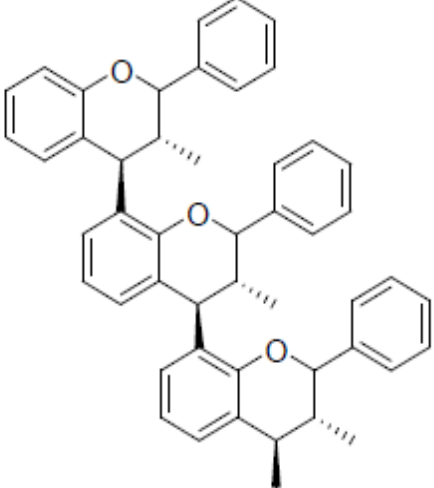
Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**BRUNETON, 1999**).

Ces molécules sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés (**D'ARCHIVIO *et al.*, 2007**). Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits. Ils présentent une structure commune en C6-C3-C6 (Tableau I). Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) (**MACHEIX *et al.*, 2006**). Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones, les flavanols) et les proanthocyanidines (tanins condensés), les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Tableau II) (**CROZIER *et al.*, 2009**).

Il existe dans chaque sous-classe de nombreux composés selon les substitutions des cycles aromatiques. La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau (**CROZIER *et al.*, 2009**).

Tableau II : Différentes classes des flavonoïdes (SARTORI-THIEL, 2003 ; HALLGAS *et al.*, 2004)

Flavonoïdes	Structure de base
Chalcones	
Dihydrochalcones	
Aurones	 X = O, S, SO ₂ ou NH
Flavones	
Flavonols	
Dihydroflavonols	
Flavanones	
Flavanols	
Anthocyanidines	

Flavonoïdes	Structure de base
Isoflavonoïdes	
Biflavonoïdes	
Proanthocyanidines ou tanins condensés	

I.1.3.2. Biosynthèse

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate *via* la phénylalanine qui est convertie en p -coumarate puis en p -coumaroyl-CoA. Le p -coumaroylCoA et les 3 malonylCoA se condense en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone. Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (**LHULLIER, 2007**).

I.1.4. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (**PERONNY, 2005**).

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables (**FIORUCCI, 2006**)

I.1.4.1. Tanins hydrolysables

Ils sont constitués par une molécule glucidique sur laquelle est estérifiée de l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide éllagique, acide m-digallique) d'où le nom de pyrogalliques et d'éllagitanins qu'on leur donne quelquefois. Ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique. Les tanins galliques et éllagiques sont caractéristiques des angiospermes dicotylédones (**BRUNETON, 2009**).

I.1.4.1. Tanins condensés (proanthocyanidines)

Les tanins condensés ou proanthocyanidols résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavanes ol-3, flavane ol-4, flavane diol -3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins « catéchiques ». Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes de végétaux, gymnospermes et fougères compris (**BRUNETON, 2009**).

I.2. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques

I.2.1. Activité antioxydante

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (**QUIDEAU *et al.*, 2011**).

I.2.2. Activités antimicrobienne

Les plantes ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (XIA *et al.*, 2011).

Il a été reporté que les raisins *Vitis vinifera* possèdent des propriétés pharmacologiques importantes, en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'acide gallique, d'acide hydroxycinnamique, de flavanols, de flavonols, et de tanins (NASSIRI-ASL et HOSSEINZADEH, 2009).

Les composés, appartenant aux acides phénoliques, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféïques. On les retrouve présents dans le thym et la téragone. Ces composés sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus (CHENG *et al.*, 2008).

Les possibilités de guérison qu'offrent les flavonoïdes sont exploités depuis très longtemps. Hippocrate prescrivait un baume de propolis contre les plaies et les ulcères. Des siècles plus tard, les propriétés antimicrobiennes de la propolis ont été attribuées aux composés de la catégorie des flavonols et flavanones. En effet, avec leur aptitude à inhiber la germination des spores de plantes pathogènes, ils sont d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme (CUSHNIE et LAMB, 2005). Les flavonols issus de fractions de propolis ont également montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 ou HSV-2, sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur de haut risque pour la transmission du VIH (KHAN *et al.*, 2005).

La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (COWAN, 1999).

I.2.3. Activité anti-inflammatoire

L'action des flavonoïdes d'un extrait de citron sur la perméabilité membranaire fut le premier effet pharmacologique connu de ces composés, il y a plus de 50 ans (**SARTORI-THIEL, 2003**).

Les études sur les flavonoïdes issus de plantes utilisées traditionnellement restent encore très répandues car, bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (**BENAVENTE-GARCIA et CASTILLO, 2008 ; CONFORTI *et al.*, 2008**).

Dans la famille des stilbènes, le resvératrol, a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro*. Les recherches se tournent actuellement vers la synthèse de produits à base de resvératrol dans le but de diminuer l'utilisation de médicaments synthétiques (**UDENIGWE *et al.*, 2008**).

I.2.4. Prévention contre les maladies cardiovasculaires

La consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire. En effet, au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (**MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002**).

I.3. Rôle des polyphénols dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour

lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (**GHEDADBA *et al.*, 2015**).

Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (**FUKAI *et al.*, 1991**).

I.4. Méthodes Extraction des polyphénols

L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété de composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (**ANTOLOVICH *et al.*, 2000**).

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction de polyphénols :

I.4.1. Macération

C'est une méthode traditionnelle et couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques (**SPIGNO et DE FAVERI, 2007 ; BUDIC-LETOC *et al.*, 2005**).

I.4.2. L'extraction au Soxhlet

Cette méthode est très appréciée car elle permet de faire des extractions en continu et d'obtenir un bon rendement, tout en restant simple et relativement peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients (**AL-BANDAK et OREOPOULOU, 2007**).

I.4.3. L'extraction assistée par ultrasons

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse, car il est facile de la réaliser dans des équipements de laboratoire communs (bains à ultrasons). L'échantillon broyé est mélangé avec le solvant approprié dans un récipient et placé dans un

bain à ultrasons, où la température de travail et le temps d'extraction sont réglés **(D'ALESSANDRO *et al.*, 2014)**.

Cette technique utilise des ondes sonores à fréquence supérieure à 20 kHz. La vibration se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme de rapides variations de pression. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compressions et de décompressions provoquant la formation de bulles. Les ultrasons entraînent de très fortes modifications de la température et de la pression à l'intérieur des bulles. Au moment où la dimension critique est atteinte, les bulles implosent. Ce processus est appelé « cavitation ».

Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matrices végétales et améliorent le transfert de matière. La « pulsation » du milieu permet d'améliorer les coefficients de transfert de matière. Les ultrasons peuvent également provoquer la rupture des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération de leur contenu. La destruction des parois cellulaires favorise l'extraction des composés d'intérêt vers le solvant. Ainsi l'application des ultrasons accélère l'extraction partir de sources végétales et dans certains cas permet aussi d'augmenter les rendements.

Elle permet l'extraction de composés thermosensibles car elle est très efficace à températures relativement basses. L'application des ultrasons permet aussi la destruction de la charge bactérienne et aide pour la meilleure préservation des molécules d'intérêt **(POUX *et al.*, 2010)**.

I.4.4. L'extraction en phase solide (EPS)

Cette technique peut être également employée pour le fractionnement et/ou la purification ou pour obtenir la concentration initiale des composés. En effet, l'extraction en phase solide avec des cartouches C₁₈ a été régulièrement utilisée pour l'extraction sélective d'acides phénoliques et de flavonoïdes des vins rouges **(PINELO *et al.*, 2006)**.

Cette méthode constitue aussi une autre option rapide et économique puisqu'elle réduit de manière significative le volume des solvants requis **(ESCRIBANO-BAILON et SANTOS-BUELGA, 2003)**.

I.4.5. L'extraction assistée par micro-ondes

C'est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes d'extraction traditionnelles. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels qu'un gain de temps d'extraction, une utilisation de petites quantités de solvants et un rendement d'extraction de polyphénols élevé (**HEMWIMON *et al.*, 2007**).

I.4.6. L'extraction par fluide supercritique

Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. La basse viscosité des fluides supercritiques confère une capacité élevée pour la diffusion permettant l'accès du solvant aux composés phénoliques liés aux parois cellulaires. En outre, tous les processus de dégradation possibles, tels qu'oxydations ou isomérisations, sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit et que le processus d'extraction peut être suivi en absence de lumière et d'air. Toutefois, cette technique d'extraction présente comme inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique (**ESCRIBANO-BAILON et SANTOS-BUELGA, 2003**).

En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature des composés (par exemple, classes de molécules phénoliques spécifiques telles que des flavonoïdes, acides phénoliques, glycosides, etc.) de la nature de l'échantillon (graines, feuilles, ramilles) et de son état physique. Indépendamment de la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction et le temps d'extraction peuvent changer selon la préparation de l'échantillon (**ANTOLOVICH *et al.*, 2000**).

Il est possible de constater que les solvants jouent un rôle très important dans plusieurs méthodes d'extraction. En effet, les composés phénoliques solubles sont généralement extraits en utilisant des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. La présence de sucres, parfois liés aux polyphénols, les rendent plus solubles dans l'eau, tandis que les combinaisons des solvants avec de l'eau s'utilisent dans le but d'extraire les glycosides. Les aglycones moins polaires sont plus solubles dans les solvants apolaires (**ESCRIBANO-BAILON et SANTOS-BUELGA, 2003**).

I.5. Méthodes d'analyse des polyphénols

L'analyse structurale des flavonoïdes a bénéficié des progrès considérables aussi bien de la spectrométrie de masse que de la résonance magnétique nucléaire et surtout, du développement récent des techniques de couplage avec la chromatographie liquide. Ces techniques ont relégué au second plan les méthodes traditionnelles telles que la spectroscopie dans l'ultraviolet.

I.5.1. Etude par spectrophotométrie UV-visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode d'analyse couramment utilisée dans les laboratoires. Elle est basée sur la capacité des molécules à absorber les radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm avec l'UV lointain entre 10 et 200 nm, le proche UV entre 200 et 400 nm et le visible entre 400 et 800 nm. La spectroscopie UV-visible présente un large domaine d'application. Elle est utilisée en chimie minérale, chimie organique, biochimie, analyses médicales et analyses quantitatives. Cette large utilisation est surtout due à sa grande sensibilité (limite de détection 10⁻⁵ M), sa précision (1-5% d'erreur), sa rapidité et sa simplicité d'utilisation (**ROUESSAC *et al.*, 2004**).

a- Analyses qualitatives

Le spectre UV-visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient.

Les flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption caractéristiques : la bande II provenant du cycle A avec un maximum entre 240-285 nm et la bande I provenant du cycle B avec un maximum entre 300-550 nm. Les changements de l'absorbance en milieu neutre (méthanol), en présence de bases (acétate de sodium, hydroxyde de sodium), d'acides de Lewis (trichlorure d'aluminium) ou d'acide borique, fournissent de précieuses indications sur le type structural, la nature et la position des substituant (**BRUNETON, 2009**).

b- Analyses quantitatives

La spectrophotométrie par absorption UV-visible peut être utilisée pour effectuer des mesures quantitatives. En effet, l'absorbance des composés est exploitée en analyse quantitative par l'application de la loi de B er-Lambert (**ROUESSAC *et al.*, 2004**).

$$A = \log [I_0/I] = \epsilon.l.C$$

Où

I_0 = intensité de la lumière monochromatique incidente envoyée sur l'échantillon

I = intensité de la lumière transmise

ϵ = coefficient d'absorptivité molaire du soluté (dépend de la longueur d'onde)

l = longueur du trajet optique

C = concentration de l'espèce détectée

I.5.2. Etude par chromatographie

La chromatographie consiste à entraîner les différentes molécules contenues dans un mélange pour les séparer en fonction de leurs vitesses d'élutions. Les molécules sont adsorbées sur un support fixe qui est la phase stationnaire et désorbées par l'éluant. Il y a donc une distribution ou partition des composants du mélange plus ou moins rapide entre ces deux phases. Les différents constituants du mélange sont récupérés séparément dans plusieurs fractions (PANAIVA, 2006).

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux types de chromatographies : la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP)

a- Chromatographie sur couche mince

Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- ✓ La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- ✓ La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- ✓ L'échantillon : environ un microlitre (μL) de solution diluée (2 à 5%) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- ✓ L'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (ANTONOT et MARCHAL, 1998).

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

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

Si plusieurs réactions colorées permettent de mettre en évidence génines et hétérosides dans les extraits bruts, l'étude préliminaire de ces extraits est classiquement dominée par la CCM mono-ou bi dimensionnelle, le plus souvent sur gel de silice normal ou éventuellement sur silice greffée, l'étude des chromatogrammes peut se faire :

- Directement chalcones et aurons sont habituellement directement visible sur les chromatogrammes. En présence de vapeurs d'ammoniac les taches passent à l'orange et au rouge ;
- Par un examen en lumière ultraviolette avant et après pulvérisation de trichlorure d'aluminium, avant et après exposition aux vapeurs d'ammoniac : la nature et le changement des fluorescences observées donnent des renseignements utiles sur le type de flavonoïdes présent ;
- Après pulvérisation d'une solution à 1% de l'ester du 2-aminoéthanol et de l'acide diphenylborique dans le méthanol, suivie d'un examen en lumière ultraviolette puis dans le visible. On améliore la sensibilité en pulvérisant en plus une solution méthanoliques à 5% de polyéthylène glycol 400.
- Après pulvérisation de chlorure ferrique, d'ansaldéhyde, d'acide sulfanilique diazoté, ou d'autres réactifs généraux des phénols;
- Par l'utilisation de réactions ou de propriétés plus ou moins spécifiques : -réaction-dite de la cyanidine avec la poudre de magnésium en milieu chlorhydrique (flavanones et dihydroflavonols) ou avec le zinc dans le même milieu.-réaction des dihydrochalcones, après action du borohydrure de sodium, avec la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (**BRUNETON, 2009**).

b- La chromatographie liquide de haute performance

Cette technique analytique repose sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) et à leur affinité respective pour la

phase stationnaire et pour la phase mobile. A leur arrivée en bout de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

L'analyse CLHP se réalise à l'aide d'un système constitué de quatre modules principaux :

1. un système de pompage
2. un système d'injection de l'échantillon
3. une colonne chromatographique
4. un détecteur (GRIGORAŞ, 2012).

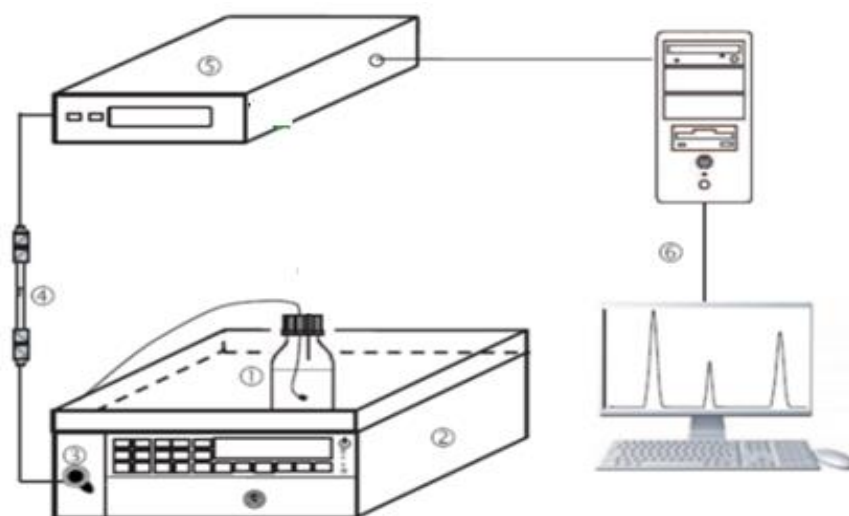


Figure 01 : Représentation des différents éléments composant la chaîne CLHP

La méthode la plus communément utilisée pour l'identification et la quantification des différents composés phénoliques. L'analyse par CLHP inclut la détermination des conditions opératoires qui seront employées pendant l'analyse, à savoir les types de colonnes à utiliser, les solvants, le temps d'analyse, etc. En général, les colonnes qui s'utilisent pour faire l'analyse de polyphénols sont presque exclusivement de phase inverse (RP) avec 100 à 300 millimètres de longueur et 4.6 mm de diamètre interne. Les systèmes d'élution sont habituellement binaires (solvant A et solvant B) : un solvant aqueux polaire acidifié tel que l'acide acétique aqueux, l'acide perchlorique, l'acide phosphorique ou l'acide formique (solvant A) et un autre solvant organique moins polaire tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui peut être acidifié (solvant B). Habituellement, on utilise un gradient d'élution où l'éluant B augmente avec le temps (MERKEN et BEECHER, 2000).

I.6. Applications industrielles des polyphénols

Les polyphénols trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels: en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (**DAGLIA, 2012**).

La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (**MOURE *et al.*, 2001**).

Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA (**SARTORI-THIEL, 2003**).

Chapitre II.
**Généralités sur les activités
biologiques**

II.1. Activité antioxydante

la propriété antioxydante a attiré l'attention de nombreux laboratoires et chercheurs dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels utilisés dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques d'une part et d'autre part pour valoriser l'effet préventif de ces métabolites contre les différentes pathologies liées au stress oxydatif.

II.1.1. Le stress oxydant

Récemment, le stress oxydant a été redéfini comme étant un déséquilibre entre les oxydants que sont les espèces oxygénées activées (EOA incluant radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet, acide hypochloreux), et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à une rupture de la signalisation redox et de son contrôle avec ou sans dommages moléculaires (oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN).

Cette définition importante permet de tenir compte à la fois des effets toxiques des EOA mais aussi de leurs effets physiologiques importants. Ainsi, les EOA à faibles doses agissent comme des messagers secondaires (transmission d'informations à la cellule) en régulant l'activité de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes codant pour diverses protéines. Les EOA peuvent déclencher de la sorte ce mécanisme protecteur très important pour l'organisme qu'est le phénomène de l'apoptose (mort cellulaire programmée de la cellule à un stade pré-cancéreux) (PINCEMAIL *et al.*, 2014).

Face à une production modérée d'EOA, c'est-à-dire à un niveau légèrement supérieur aux quantités physiologiques, l'organisme réagit en sur-exprimant ses défenses antioxydantes enzymatiques (exemple : superoxydedismutase ou SOD).

Ce phénomène, connu sous le nom d'hormésie, est une réponse biologique favorable suite à l'exposition à de faibles doses de toxines. Des études récentes indiquent que les polyphénols, ces antioxydants contenus dans les aliments (fruits et légumes, chocolat noir, thé vert. . .), sont susceptibles d'exercer par ce mécanisme d'action leurs effets protecteurs en matière de prévention des maladies cardiovasculaires et de certains cancers.

Différents facteurs internes (inflammation, ischémie perfusion) ou liés à notre mode de vie (tabagisme, exposition au soleil, à l'amiante, aux nanoparticules et aux radiations, prise de la pilule contraceptive, hyperglycémie, exercice physique intense, faible consommation de fruits et légumes. . .) contribuent à augmenter la production d'EOA dans notre organisme d'une manière excessive. Il est bien admis que les dommages oxydatifs induits par les EOA au niveau des lipides (peroxydation lipidique) et de l'ADN sont respectivement impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires et des cancers (PINCEMAIL *et al.*, 2014).

II.1.2. Les systèmes de défense antioxydants

Pour limiter les effets délétères des espèces réactives radicalaires et non radicalaires et leurs conséquences physiopathologiques, l'état redox intracellulaire est équilibré par des systèmes antioxydants (**LEOPOLD et LOSCALZO, 2009**). Ces systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les espèces réactives, soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables (**SCHULZ *et al.*, 2004**).

Donc selon le mode d'action de ces systèmes, on distingue deux classes d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

II.1.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**FAVIER, 2006**).

II.1.4. Polyphénols comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu.

Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite avec une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons π du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants (**TSAO, 2010**).

II.1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Tableau III : Aperçu des différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale

Méthode	Nom	Générateur de radicaux	Standard	Mesure/Calcul
TEAC	Total équivalent antioxydant capacité	ABTS + horseradisch peroxydase + peroxyde d'hydrogène → formation du radical (ABTS ^{•+})	Trolox	Décoloration du radical ABTS ^{•+} : λ=734 nm Unité : équivalent Trolox
FRAP	Ferric reducing ability of plasma	Réduction du Fe(III) (TPTZ) ₂ Cl ₃	Fe(II)	Changement d'absorbance à λ=593nm Unité : FRAP par rapport à une solution de Fe(II)
CUPRAC	Cupric reducing antioxydant capacity	Réduction du cuivre(II) néocuprione	acide urique	Absorbance à λ=450 nm Unité : équivalent d'acide urique
DPPH	2,2-diphénylpicrylhydrazyl	DPPH	Trolox	Diminution de l'absorbance λ=515nm Unité : équivalent Trolox
Crocin Bleaching		2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Blanchiment de la crocine λ = 433 nm Unité : équivalent Trolox
TRAP	Total radical trapping parameter	2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Diminution de la fluorescence de la β-phycoérythrine (λ=495 nm et λ=575 nm). Unité : équivalent Trolox
ORAC	Oxygène radical antioxydant capacité	2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Diminution de la fluorescence de la fluorescéine (λ=485 nm et λ=520 nm) Unité : équivalent Trolox

II.2. Activité antimicrobienne

Les molécules de synthèse chimique utilisées dans la vie courante ne répondent plus aux exigences des habitants de la planète qui cherchent des produits plus sains, plus efficaces et moins dangereux pour eux et leur environnement. 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. S'ils perdaient toute efficacité, des infections facilement prises en charge redeviendraient mortelles! Le monde s'achemine vers une ère post-antibiotique, où des infections courantes et des blessures mineures pourraient à nouveau tuer!.

Ces dernières années, de profonds changements ont marqués les connaissances en microbiologie médicale, spécialement le nombre croissant de microorganismes impliqués dans les processus pathologiques et la résistance aux traitements appliqués. Il est donc nécessaire de trouver une alternative: de nouveaux remèdes plus efficaces ayant moins d'effets secondaires que les antibiotiques et moins onéreux, comme les plantes médicinales et aromatiques (EBERLIN, 1997).

II.2.1. Principales substances antimicrobiennes

II.2.1.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995).

II.2.1.2. Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (ULANOWSKA *et al.*, 2007).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (COWAN, 1999).

II.2.2. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

II.2.2.1. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, qui appartient à la famille des Entérobactéries, de forme non sporulée, de type aérobie 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. *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections

aigues de l'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (**KAPER *et al.*, 2004**).

II.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci Gram positif appartenant à la famille de Micrococcaceæ avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées. Elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue et intoxication alimentaire (**DWORKIN et FALKOW, 2006**).

II.2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles. Ces bactéries synthétisent deux principaux types de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert. Il s'agit de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques (**PERCIVAL *et al.*, 2004**).

Pseudomonas aeruginosa est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8% des infections suites aux blessures chirurgicales (**VAN DELDEN et IGLEWSKI, 1998**).

II.2.2.4. *Candida albicans*

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80% des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées (**DELORME et ROBERT, 1997**).

II.3. Activité anticoagulante

Les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont restés les principales causes de mortalité dans le monde au cours de la décennie écoulée selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de l'année **2012**.

Principalement, elles constituent la conséquence de l'évolution et de la complication pathologique des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses c'est la raison pour laquelle plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter ces pathologies vasculaires.

Les composés polyphénoliques pourraient être des bases structurales potentielles et une source pour trouver de nouveaux coagulants (**BIJAK *et al.*, 2014**).

II.3.1. Les thromboses artérielles

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux et elle se forme habituellement après l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse liée à l'évolution de l'athérosclérose. Cette thrombose est connue sous le nom d'athérothrombose (**LACUT *et al.*, 2008**).

L'athérothrombose est responsable des complications cliniques très dangereuses regroupées en trois catégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aigue des membres inférieurs (**BEAUDEUX *et al.*, 2006**)

II.3.2. Les thromboses veineuses

La phlébite ou thrombose veineuse profonde est liée à la formation d'un caillot de sang qui bouche une veine. Elle survient le plus souvent dans une veine des jambes, mais elle peut survenir sur presque toutes les veines de l'organisme (bras, cerveau, tube digestif, reins, etc.). Les veines superficielles, sous la peau, peuvent aussi être touchées par une phlébite, on parle alors de phlébite superficielle (**LEONI, 2001**).

II.3.3. Cascade de coagulation veineuse

La formation de ce caillot fibrineux est réalisée par deux voies, la voie endogène ou intrinsèque et la voie exogène ou extrinsèque, toutes les deux aboutissant à l'activation du facteur X, une étape commune aboutit ensuite à la formation de thrombine, une sérine protéase qui catalyse la transformation de fibrinogène en fibrine insoluble.

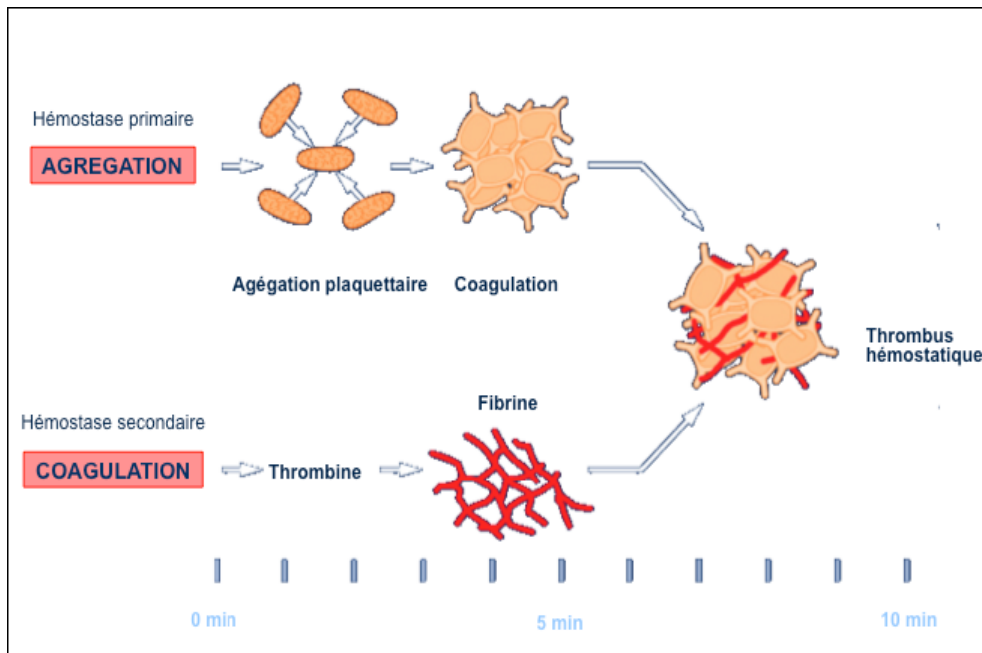


Figure 02 : Description des processus aboutissant à la formation du Thrombus (BERRADA, 2013)

II.3.3.1. Voie endogène

Les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électro-négatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriéne qui à son tour peut activer le F XII. Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (le facteur Stuart). Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accélélerine), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (VOGLER et SIEDLECKI, 2009).

II.3.3.2. Voie exogène

Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou-endothéliale. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII). Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (COLVIN, 2004). La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (AJJAN et GRANT, 2006). Les différentes étapes de coagulation sont présentées dans la figure suivante

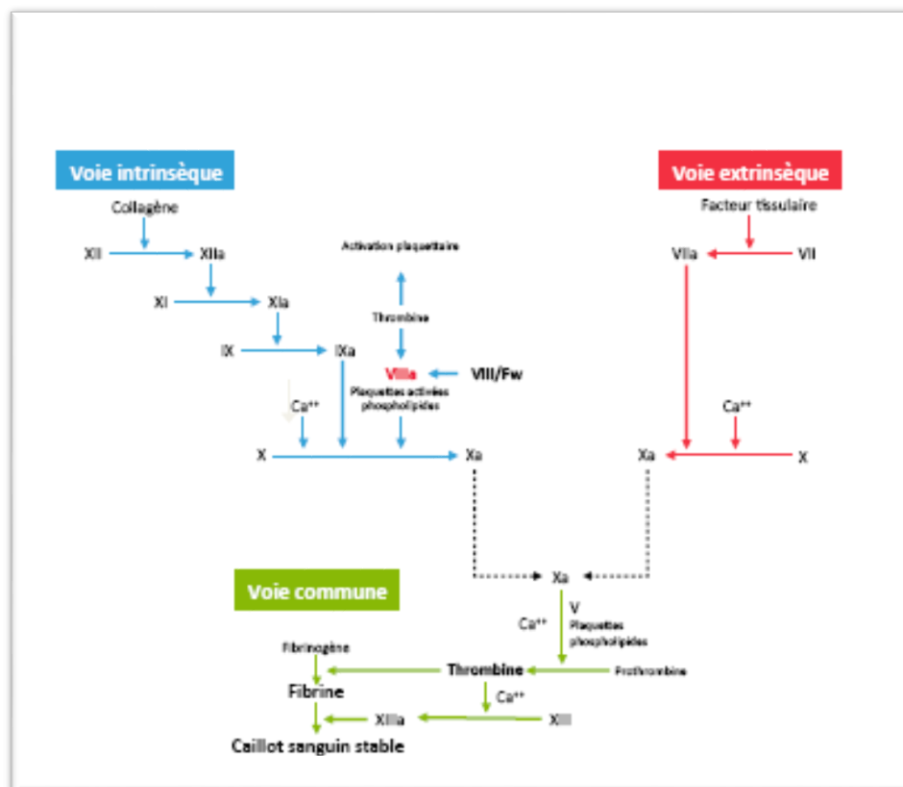


Figure 03 : Cascade de coagulation

Tableau IV : Les facteurs de coagulation et leurs dénominations

Facteurs	Dénomination	Forme activée
Facteur I	Fibrinogène	Fibrine
Facteur II	Prothrombine	Thrombine
Facteur III	Facteur tissulaire	/
Facteur IV	Calcium ionisé	/
Facteur V	Proaccéléline	/
Facteur VI	(accéléline, ancien nom du Facteur Va)	Facteur Va
Facteur VII	Proaccéléline	Facteur VIIa
Facteur VIII	Facteur antihémophile A	Facteur VIIa
Facteur IX	Facteur Christmas ou facteur antihémophile B	Facteur IXa
Facteur X	Facteur Stuart	Facteur Xa
Facteur XI	Facteur Rosenthal, Antécédent de la thromboplastine plasmatique	Facteur XIa
Facteur XII	Facteur Hagemann	Facteur XIIa
Facteur XIII	Fibrin Stabilizing Facteur (FSF)	Facteur XIIIa

II.3.4. Traitement des maladies thrombotiques

Le traitement pharmacologique est primordial pour limiter les dommages des thromboses artérielles et veineuses. L'objectif de ce traitement est la récanalisation du vaisseau occlus et éviter une réocclusion précoce. Actuellement, il existe trois classes d'agents pharmacologiques anti-thrombotiques utilisables, les antiagrégants, les anticoagulants, et les fibrinolytiques

II.3.4.1. Les antiagrégants

Les antiagrégants (aspirine, ticagrelor, clopidogrel...) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles (**AUBRY et HALNA DU FRETAY, 2010**) mais les anticoagulants sont aussi recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (**HELFT et LEGER, 2009**).

II.3.4.2. Traitement fibrinolytiques

Le but du traitement fibrinolytique (streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogène...) est de lyser le thrombus artériel ou veineux. Ce traitement est associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant (**CROZIER et WOIMANT, 2007**).

II.3.4.3. Anticoagulants

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thrombo-embolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes. Deux classes d'anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (**BATTY et SMITH, 2013**).

a- Les héparines

Il existe deux types d'héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP). L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc. Le poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaires varient de 3000 à 5000 daltons. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombine III inactive notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombine III inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**BATTY et SMITH, 2013**).

b- Les anti vitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur stuart X, et le facteur antihémophilique B (le facteur IX). Elle intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité-N-terminale de la chaîne glycoprotéinique de chacun de ces facteurs. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires (**HELFT et LEGER, 2009**).

c- Les nouveaux anticoagulants

Des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories, les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux qui sont des inhibiteurs synthétiques indirects et sélectifs du facteur Xa et ils sont constitués de 5 unités saccharides capables de modifier la conformation en augmentant l'activité inhibitrice naturelle de l'antithrombine I III sur le facteur Xa. Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, et parmi lesquelles, le DX-9065a, l'hirudine, L'argatroban...etc. Le DX-9065a est un dérivé synthétique de l'acide propanoïque qui inhibe directement le facteur Xa libre et le facteur Xa lié dans le complexe prothrombinase, alors que l'hirudine est un peptide de 65 acides aminés extrait de la glande salivaire d'une espèce de ver (*Hirudo medicinalis*) et il inhibe directement et de façon irréversible la thrombine. L'argatrobane est un dérivé synthétique d'acide carboxylique qui inhibe directement la thrombine (**GIRARDEL et SAMAMA, 2006**).

Chapitre III.
Généralités sur l'espèce
Pergularia tomentosa

III.1. Description botanique de *Pergularia tomentosa*

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

- **Un latex** : blanc, corrosif qui peut endommager la peau.
- **La tige** : couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile, tomenteuse à l'état jeune;
- **Les feuilles** : Opposées, vert amande, ovales ou arrondies, en cœur à la base, caractérisée par l'absence des stipules et pétiole de 0,5 à 1,5cm de long;



Photo 01 : Feuille et fruits de *P. tomentosa* L

- **L'inflorescence** : En grappes abondantes au bout de longs pédoncules;
- **Les fruits**: Composés de deux follicules, portent de petites pointes;
- **Les fleurs** : bisexuées, régulières, parfumées ; 5-mères. Sépales et pétales plus ou moins soudés à la base. Corolle rotacée ou campanulacée, doublée d'une paracorolle à 5 pièces, en général d'origine staminale. Etamines 5 à anthères sessiles, en général adhérentes au stigmate, souvent déhiscentes en pollinies.
- **Les graines** : ovoïdes, aplaties, de 7-9 mm environ 6 mm, bords pales, à poils courts denses, munies d'une touffe de poils à une extrémité, d'environ 3 cm de long (SCHMELZER et GURIB-FAKIM, 2013)
- **Période de végétation**: Floraison en printemps (CHEHMA, 2006).

III.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).



Photo 02 : *Pergularia tomentosa* L.

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*.

Étymologie :

- Pergularia vient du latin "Pergula" qui signifie «vigne» en raison de la capacité de la plante à s'accrocher à ce que l'environnement; pergola a la même origine.
- Tomentosa signifie poilu: la plante est couverte de petits poils qui lui donnent sa couleur verdâtre.

Pergularia tomentosa L. possède de nombreux noms folkloriques :

- ❖ **Arabe** : En Algérie (MAIZA *et al.*, 1993), en Egypte et en Arabie Saoudite, il est connu sous le nom Ghalaka (AL-SAID *et al.*, 1988), et Ghoulga, demya, leben el hamir et Kalga (CHEHMA, 2006).
- ❖ **Targui** : tashkat, dellakal, tellakh, sellaha.
- ❖ **Français** : pergulaire
- ❖ **Anglais** : pergularia.

III.3. 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.

III.4. 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).

III.5. 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 V : 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, et al., (2003)	
	Partie aérienne	Décoction	Hypoglycémiant	KEMASSI et al., (2014).	
Tassili N'ajjer	Racine	Usage interne	Les Frissons, bronchite, constipation,	HAMMICHE et MAIZA, (2006).	
	Partie aérienne		Décoction et usage interne		Helminthiases Abortive
			Décoction et usage externe		Maladies de la peau : dermatose, allergie et dépilatoire
Mauritanie	/	/	Morsures venimeuses, tuberculose, maux de dents	HMEYADA, (2009).	
Afrique du Nord	/	/	Avortement	SCHMELZER et GURIB-FAKIM, (2013)	
Sahara central	/	/	La tuberculose et les hémorroïdes		
Côte d'Ivoire	feuille	Jus	Collyre, les maux de tête.		
Milieu rural	/	/	Tannerie		

III.6. Les travaux antérieurs

III.6.1. Composition biochimique du *Pergularia tomentosa*

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

III.6.1.1. Métabolites primaires

Tableau VI : 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

III.6.1.2. Métabolites secondaires

Pergularia tomentosa est connue 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).

a- Cardénolides

Toutes les parties de la plante sont des sources riches en hétérosides cardénolides, avec l'uzariénine, la coroglaucigénine et le glucose avec le digitoxose comme sucres,

Les racines contiennent des hétérosides (le ghalakinoside, la calactine) et des dérivés ; les feuilles et le latex contiennent du ghalakinoside, de la pergularine, de la 16 α -acétoxyalotropine, de la calactine et de la coroglaucigénine (HIFNAWY *et al.*, 2014).

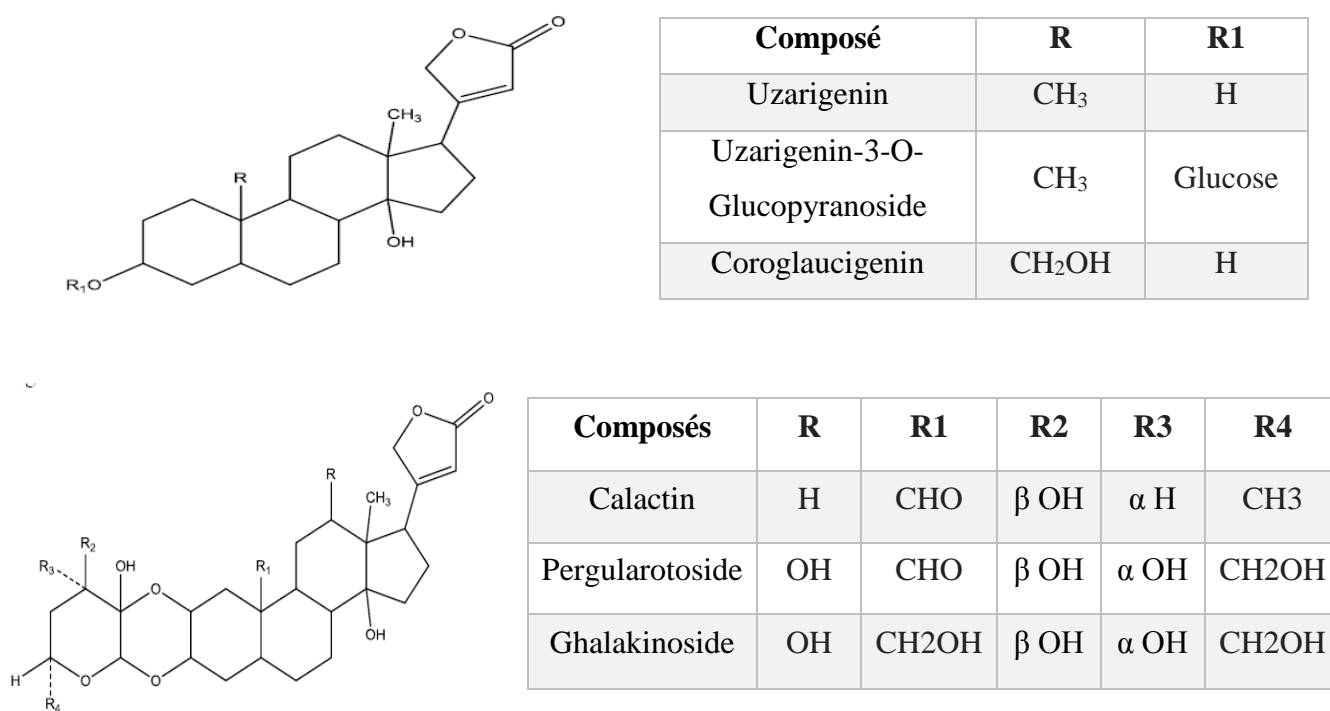
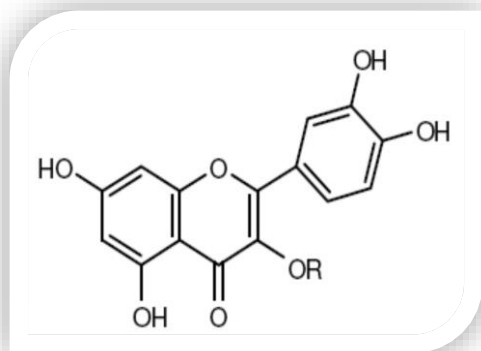


Figure 04 : Structure des cardénolides isolés à partir de *Pergularia tomentosa*

b- Flavonols

Les extraits des tiges de *Pergularia daemia* et *Pergularia tomentosa* ont donné les mêmes flavanols glycosides, y compris les 3-O-galactoside et 3-O-glucosides de quercétine et kaempférol, et malonylhexosides de quercétine, kaempférol et Isorhamnetin. Cependant, ces composés sont présents dans des concentrations et proportions différentes dans les deux espèces, de sorte que dans *P. daemia*, les glycosides de kaempférol étaient présents en plus grandes quantités, tandis que dans *P. tomentosa* il y avait une plus forte teneur en glycosides de quercétine (HENEIDAK *et al.*, 2006).

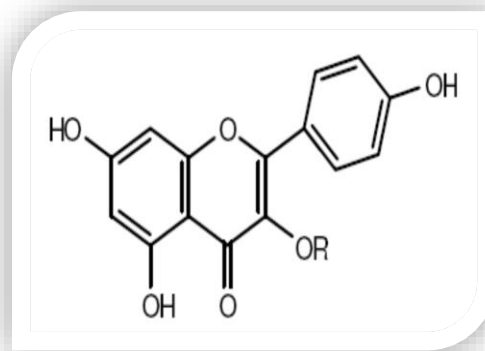


Quercetine (R = H)

Quercetin-3-O-Glucoside (R = Glu)

Quercetin-3-O-galactoside (R = Gala)

Quercetin malonylhexosides

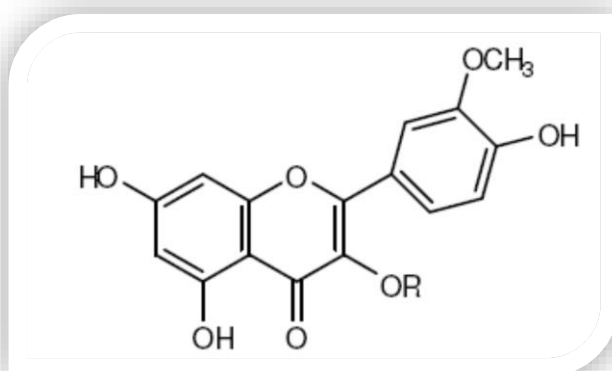


Kaempférol (R = H)

Astragalin (R = Glu)

Trifolin (R = Gala)

Kaempférol malonylhexosides



Malonylhexosides Isorhamnetine

Figure 05 : Structure des flavonols isolés à partir de *Pergularia tomentosa*

c- Les triterpènes

Les triterpènes ont été isolés à partir de *Pergularia tomentosa* L. récolté de la région de Ghardaïa en avril 2008. Il s'agit de l'acide oléique, (9Z, 12Z) - acide octadécadiénoïque, α -amyrine, le 3-acétyl taraxastérol, le 3-taraxastérol, 16- α -hydroxy taraxastérol-3-acétate, l'acide 3-épi-micromérique, et le (9Z, 12Z) glucoside de l'acide octadécadiénoïque. pergularine A, pergularine B. (BABAAMER *et al.*, 2012). Le β -sitostérol glucoside a été également signalé (GOHAR *et al.*, 2000).

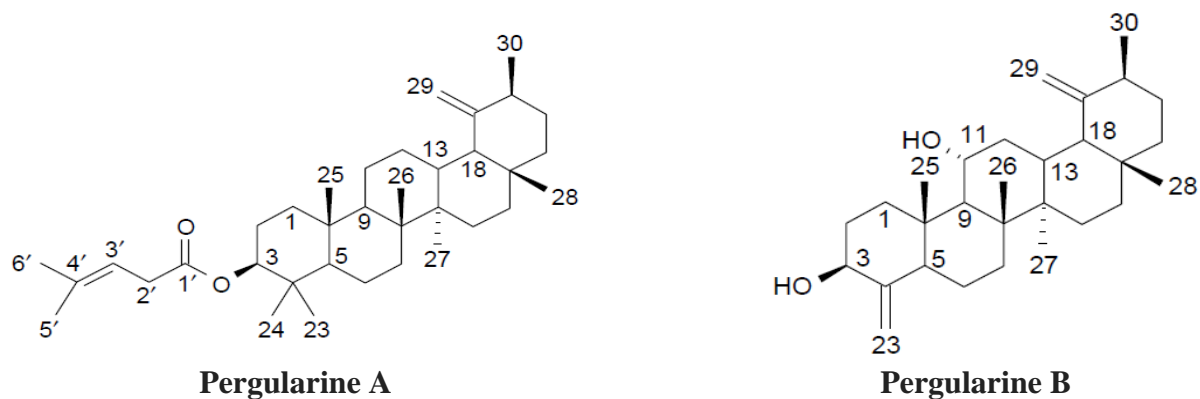


Figure 06 : Structure des quelques triterpènes isolés à partir de *Pergularia tomentosa*

III.6.1.3. La composition minérale

Tableau VII: 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

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).

III.6.2. Activités biologiques et thérapeutiques du *Pergularia tomentosa*

III.6.2.1. 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.

III.6.2.2. Anti tumorale

Les effets inhibiteurs de ghalakinoside sur les taux d'acide urique, Ca^{2+} , GGT, ALP et la LDH sont en faveur de son potentiel anti-tumoral (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).

III.6.2.3. Antidermatophytique

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).

III.6.2.4. 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 moluscicides 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).

III.6.2.5. 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**).

III.6.2.6. 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 ces 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 02 :

Expérimentale

Chapitre I.

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

La plante étudiée *Pergularia tomentosa* L., a été récoltée durant le mois d'Aout 2014 dans quatre stations différentes au Sahara septentrional et a été identifiée par EDDOUD A. (botaniste université d'Ouargla).

Les paramètres géographiques de ces stations sont représentés dans le tableau VIII et la figure 07.

Tableau VIII : Caractéristiques géographiques des stations de récolte (tutiempo.net)

Sites	Commune (wilaya)	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Précipitations (mm)	Température (°C)	
A	Méguibra (El-Oued)	63	34°15'31" Nord	6° 0' 52" Est	2012	23,62	22,9
					2013	32,27	22,7
					2014	26,67	23,3
B	Negrine (Tébessa)	351	34°29'08" Nord	7°31'14" Est	2012	346,7	17,0
					2013	/	/
					2014	282,9	17,3
C	Mansoura (Ghardaïa)	700	31°58'46" Nord	3° 44' 46" Est	2012	39,89	22,9
					2013	62,21	22,6
D	Metlili (Ghardaïa)	495	32°16' 22" Nord	3° 37' 39" Est	2014	35,29	23,3

- **Altitude** : par rapport au niveau de la mer par (m).
- **Précipitations** : total de précipitation annuelle de pluie (mm).
- **Température (°C)** = moyenne de température annuelle = (moyenne de température maximale annuelle + moyenne de température minimale annuel)/2.

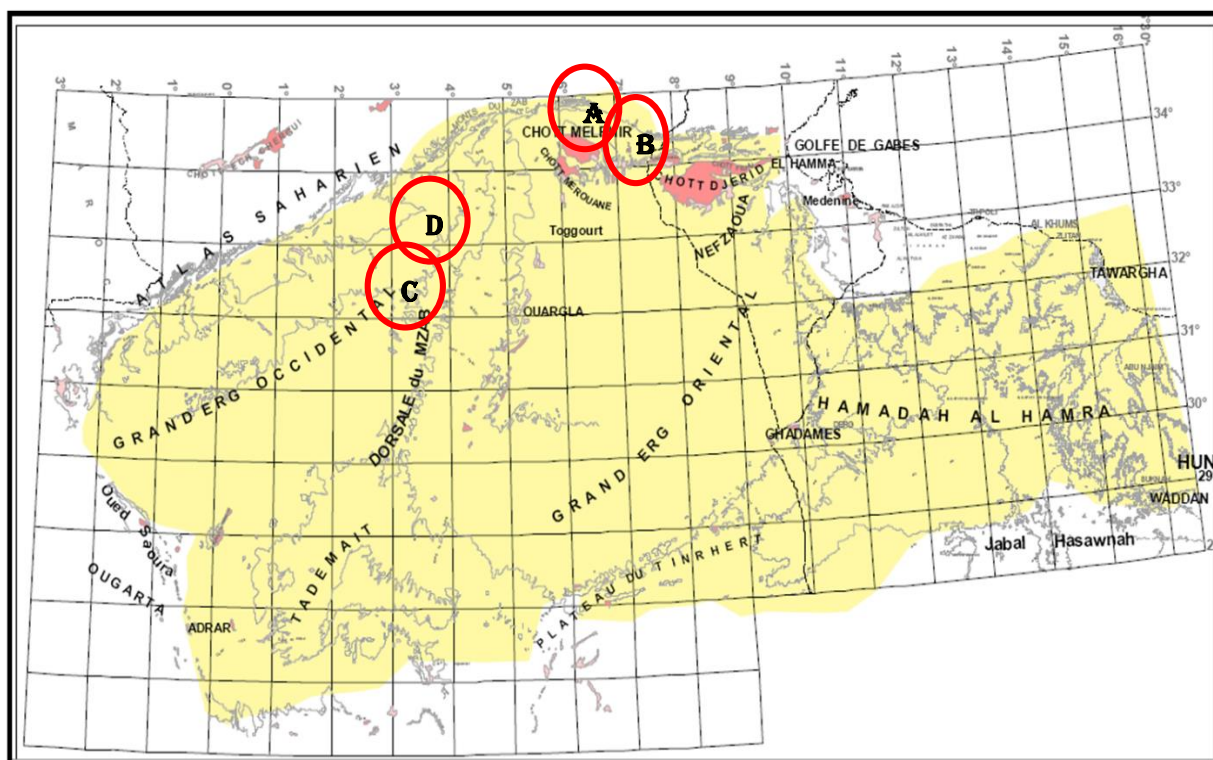


Figure 07 : Carte géographique du Sahara septentrional

Les différents organes du matériel végétal (racines, tiges, et feuilles) ont été séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant 15 jours. Une fois séchées les trois parties de la plante ont été réduites en poudre puis soumises à l'extraction.

II. Tests phytochimiques

La solution qui a servi pour les tests de détection des groupes chimiques a été menée sur les extraits aqueux des poudres végétales obtenues par décoction. Cette préparation a été préférée pour être le plus proche possible des conditions d'utilisation de *P. tomentosa* en médecine traditionnelle. Les réactions de caractérisation qualitative basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ont été effectuées.

II.1. Saponosides

La mise en évidence de saponosides a été effectuée par agitation manuelle du tube à essais contenant 2,5 ml de l'extrait aqueux dans le sens de la longueur du tube pendant 1 minute puis laisser au repos. L'apparition d'une colonne de mousse persistante, d'au moins 1 cm de hauteur pendant 15 minutes indique la présence de saponosides (BRUNETON, 2009).

II.2. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 (à 5%). L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins.

II.3. Flavonoïdes : (Réaction de Shibata)

A 5 ml de l'extrait aqueux, on ajoute 5 ml d'alcool chlorhydrique (4 ml EtOH et 1 ml d'HCl concentré), environ 0,5 g de copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration rose, orangée ou rouge violacé est produite lorsqu'il y a des flavonoïdes (flavonols, flavones, flavonones) (LOCK *et al.*, 2006).

II.4. Alcaloïdes

A 1 ml de chaque extrait, 5ml d'HCl 1% sont ajoutés. Chaque mélange est chauffé au bain marie, puis divisé en deux volumes égaux. Les 2 volumes sont traités séparément par les réactifs de :

- ✓ BOUCHARDAT (réactif iodo-ioduré) qui donne une précipitation brun rougeâtre.
- ✓ DRAGENDORFF (réactif à l'iodobismutate de potassium) qui donne une précipitation jaune blanche (MAJOB *et al.*, 2003).

II.5. Cardénolides

La détection des cardénolides glycosides se fait par l'ajout de 2 ml d'acide acétique glacial et une goutte de solution de FeCl_3 à 5 ml de chaque extrait mélangé avec 1 ml de H_2SO_4 concentré. La présence de l'anneau brun sur l'interface est caractéristique de sucres désoxy des glycosides cardiaques (BRUNETON, 1999).

II.6. Stérols

A un volume de 5 ml d'extrait, 2 gouttes d'anhydride acétique ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) et 1 goutte d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont ajoutés. La couleur mauve ou violette indique la présence des stérols (KABLAN *et al.*, 2008).

II.7. Sucres réducteurs

On ajoute 1 ml de liqueur Fehling à 5 ml d'extrait, puis on chauffe les tubes contenant les mélanges au bain marie à 40°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique.

II.8. Quinones libres

Quelques gouttes de soude (NaOH 1%) à sont ajoutées à 5 ml d'extrait. La coloration virant au jaune, rouge ou violet indique la présence de quinones libres (OLOYEDE, 2005).

II.9. Terpénoïdes

À 5 ml d'extrait, sont ajoutés 2 ml de chloroforme et 3 ml d'H₂SO₄. Le test positif est indiqué par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface (KABLAN *et al.*, 2008).

II.10. Anthraquinones

Un volume de 5 ml de NH₄OH à 10% est mélangé avec 10 ml d'extrait, en maintenant l'agitation. La coloration violette indique la présence des anthraquinones (OLOYEDE, 2005).

II.11. Huiles essentielles

L'huile essentielle est préparée par hydrodistillation en utilisant l'appareil de Clevenger. Le principe de cette méthode est basé sur un entraînement des constituants volatils de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielle après décantation (FIGUEREDO, 2007).

Une masse végétale qui représente une proportion d'environ 40% est complètement immergée dans l'eau (proportion de 60%), le tout est ensuite porté à ébullition pendant 4h.



Photo 03 : Montage d'extraction des huiles essentielles à partir des feuilles de *Pergularia tomentosa* par Clevenger

III. Extraction des composés phénoliques

Dans notre étude l'extraction est réalisée selon les méthodes de **DIOUF *et al.*, (2009)**. En utilisant deux méthodes d'extraction différentes : l'une par macération et l'autre assistée aux ultrasons. La macération dans le solvant est un procédé classique très ancien. Elle s'apparente à l'infusion, elle a donc été utilisée comme méthode de référence. La méthode assistée aux ultrasons a été développée plus récemment et a l'avantage d'être beaucoup plus rapide.

III.1. Macération

Une masse de 30 g de poudre des feuilles de *Pergularia tomentosa* provenant de chacune des quatre sites de récolte est mise à macérer dans 300 ml d'éthanol (95%) dans un erlenmeyer en verre de 500 ml fermé par un bouchon de caoutchouc recouvert d'un papier d'aluminium. L'aluminium évite à l'éthanol d'entrer en contact avec le caoutchouc, ce qui éviterait les contaminations possibles provenant du caoutchouc. Les erlenmeyers ont aussi été entièrement recouverts de papier d'aluminium pour éviter la dégradation de molécules photosensibles. Après 24 heures, les mélanges ont été séparés par filtration. Les extraits ont par la suite été évaporés à sec à l'aide l'évaporateur rotatif (BUCHI R.210) à une température d'environ 45°C. Une pesée à ce stade permet un calcul du rendement en extraits.

III.2. Extractions avec des solvants de polarité croissante

Après reprise par de l'eau bouillante, la solution est mise au repos pendant une nuit puis filtrée (élimination des quelques pigments chlorophylliens). On effectue l'extraction liquide-liquide en utilisant successivement des solvants de polarité croissante :

- 1) Ether de pétrole (pour éliminer les pigments et la chlorophylle),
- 2) Acétate de l'éthyle de polarité moyenne, c'est un solvant qui entraîne les mono-o-glycosides et les aglycones.
- 3) n-butanol de polarité forte, ce solvant va entraîner essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-o-glycosides et les C-glycosides.

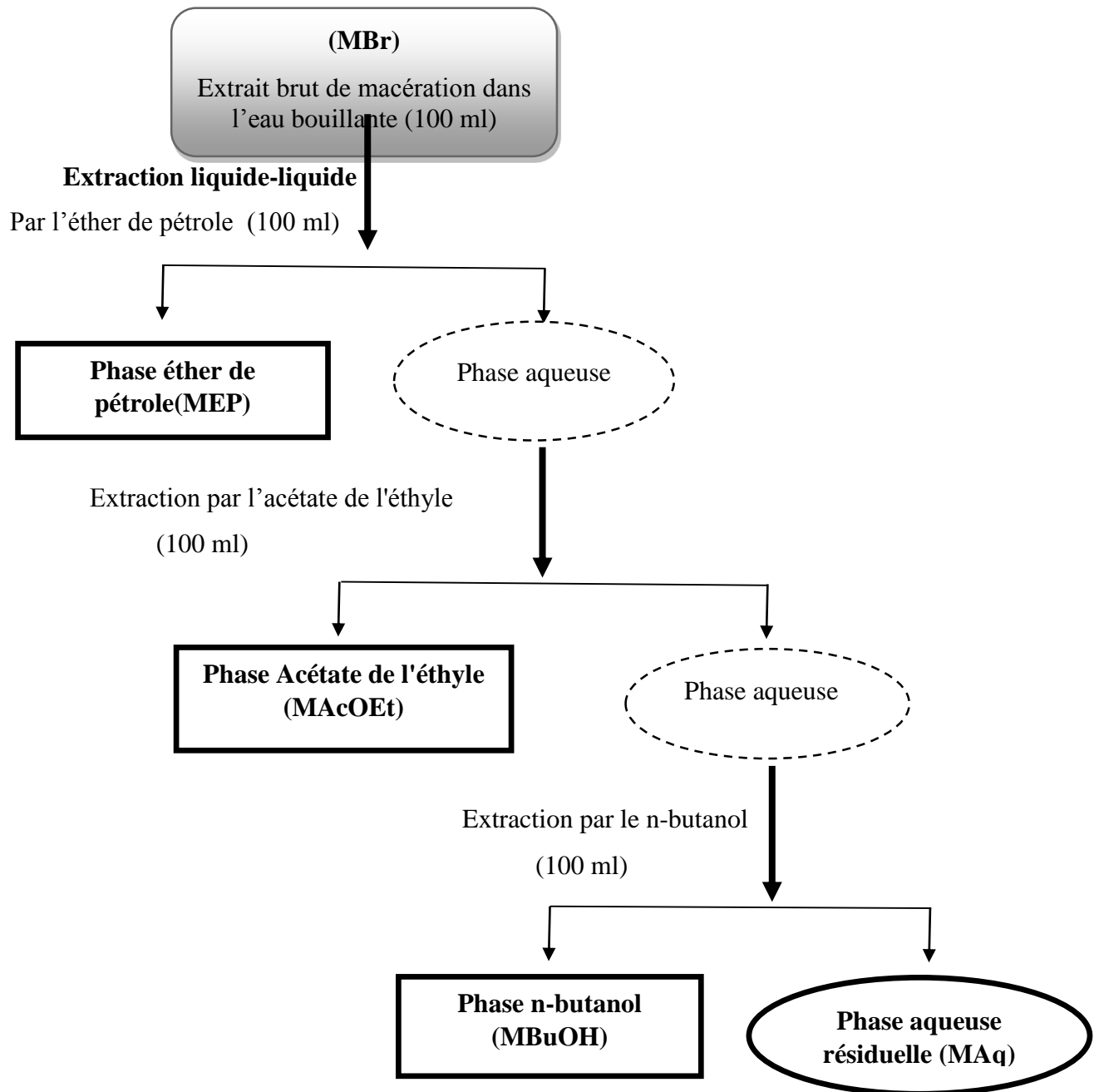


Schéma 01 : Protocole d'extraction des polyphénols (MERGHEM *et al.*, 1995)

III.3. Extraction assistée aux ultrasons (US)

Le ratio poudres végétales/éthanol pour l'extraction assistée aux ultrasons est le même que pour la macération, de manière à faciliter la comparaison entre les deux méthodes. Les drogues ont été ici placées dans un erlenmeyer de 500 ml, lui-même placé dans un bain thermostaté à 30°C pour compenser les hausses de températures engendrées par la haute agitation moléculaire générée par les ultrasons. Un générateur d'ultrasons (J.P. SELECTA université d'El-oued) de 720 W, pendant 30 min. Le mélange poudres végétales-extraits-solvants résultant a par la suite été traité exactement de la même manière que le mélange obtenu par macération pour arriver au final à une solution d'extraits dans 100 ml d'eau distillée (ST-PIERRE, 2012).

La série d'extraction permet d'obtenir cinq fractions ; l'extrait brut éthanolique de macération (MBr), l'extrait brut éthanolique de l'ultrason (USBr), la fraction d'éther de pétrole (MEP), la fraction d'acétate d'éthyle (MAcOEt), la fraction du n-butanol (MBuOH), et la fraction aqueuse (MAq) résiduelle. Les extraits sont conservés jusqu'à leur utilisation.

III.4. Calcul des rendements en extraits secs

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

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

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

IV. Analyses quantitatives

IV.1. Dosage de polyphénols totaux

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu (**WONG *et al.*, 2006**). Ce dosage repose sur le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés (**BOIZOT ET CHARPENTIER, 2006**).

100 µL de chaque extrait sont ajoutés à 2 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois, après 10 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium (75g/L) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2 heures d'incubation. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique (0–1,2 mg/ml) et sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

IV.2. Dosage de flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (**BAHORUN *et al.*, 1996**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *Pergularia tomentosa*. 1 ml de chaque échantillon et du standard avec les dilutions convenables sont ajoutés à 1 ml d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Les teneurs en flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine (0-0,05 mg/ml), et sont exprimées en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g).

IV.3. Dosage de tanins condensés

Le dosage des tanins condensés dans les extraits de *Pergularia tomentosa* est effectué selon la méthode de **SCHOFIELD *et al.*, (2001)**. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe la lumière à 500 nm.

A 400 µL de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3 ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500 nm. Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la catéchine (0-0,5 mg/ml), et sont exprimées en milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg ECT/g).

V. Analyses qualitatives

V.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée pour la séparation et parfois l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu phénolique de chaque extrait.

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silica gel 60 F-254, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur des feuilles d'aluminium, ce qui constitue la phase stationnaire. Sur les plaques commercialisées, on a déposé 10 µL de chaque extrait (10 mg/ml dans le méthanol) et ensuite introduits dans des cuves conventionnelles en verre préalablement saturée par la phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Dans notre cas, trois systèmes de solvants ont été utilisés (DIALLO *et al.*, 2004)

- Acétate d'éthyle/Acide acétique glacial/acide formique/Eau (100:11:11:26)
- Butanol/acide acétique/eau (12:3:5)
- Dichlorométhane /méthanol (90:10)

Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées sous lampe UV à 254 nm et 366 nm, pulvérisées par un mélange vanilline sulfurique ou $AlCl_3$, puis séchées à 110°C pendant 5 minutes à fin de révéler les spots obtenus.

V.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).

L'analyse est réalisée par sur un chromatographe (SHIMADZU SPD-10A) au niveau du laboratoire de *Valorisation et technologie des Ressources Sahariennes* (VTRS), Université Hamma Lakhdar d'EL Oued.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- 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 ;
- La phase mobile est un mélange de deux phases dont la composition est précisée dans le **tableau IX** :
 - ✓ **A** = Eau acidifié (acide acétique 0,2%)
 - ✓ **B** = Acétonitrile

Tableau IX : Gradient d'éluion CLHP pour l'analyse des polyphénols

Temps (min)	A (%)	B (%)
0,01	10	90
0,02	10	90
6,00	14	86
16,00	17	83
23,00	19	81
28,00	23	77
30,00	10	90
50,00	10	90

VI. Tests des activités biologiques

VI.1. Activité antioxydante

VI.1.1. Test de piégeage du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH• (diphénylpicrylhydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par **MANSOURI *et al.* (2005)**. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicrylhydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants (**SANCHEZ-MORENO, 2002**).

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 μ L des solutions d'extraits ou standard (quercétine, vitamine C) sont ajoutés à 1,95ml de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

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

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

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

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire **ARP (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995)** :

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50}$$

VI.1.2. Test de FRAP

La méthode FRAP développée par BENZIE et STRAIN (1996) correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)₂] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer.

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît, ce qui permet de la quantifier par spectrophotométrie UV-Vis.

On prépare le réactif de FRAP par les mélanges suivants :

1. Tampon acétate 300 mmol/L pH 3,6 (3,1g sodium acétate x 3 H₂O and 16 ml acide acétique glacial pour un litre de solution tampon).
2. 10 mmol/L de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) dans 40 mmol/l de HCl.
3. 20 mmol/L FeCl₃-3 H₂O dans l'eau distillée.

Réactif de FRAP = 25 mL de Tampon acétate (pH 3,6) + 2,5 mL TPTZ + 2,5 mL FeCl₃-3H₂O

150 µL de chaque extrait à 10 mg/ml dans le méthanol et 2850 µL de la solution du FRAP fraîchement préparée sont mis dans des tubes à essai, la lecture est réalisée après 30 min à 593 nm contre le blanc.

La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique des différentes concentrations dans le méthanol (0,1-1mg/ml) est utilisée pour calculer le potentiel d'antioxydant.

VI.2. Activité antimicrobienne

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie « E.H.S. BEN NACER BACHIR EL OUED ».

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatman n°3 de 6 mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés dans différentes solutions (10 mg/ml) des extraits dissous dans le DMSO (dimethylsulfoxyde) pour les extraits organiques, et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux (Un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négatif). Ces disques sont ensuite déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0,5 McFarland. Nous avons utilisé pour les souches bactériennes le milieu Muller Hinton et le milieu Saboroud pour la levure. A la fin de la durée d'incubation (18-24h) pour les souches bactériennes et 48h pour la levure à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (CHOI *et al.*, 2006).

Tableau X : Les souches microbiennes testées

Espèce microbienne	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli</i>	Bacilles à gram négatif	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille pyocyanique à gram négatif	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à Gram positif	ATCC 25983
<i>Candida albicans</i>	levure (Commensal et saprophyte)	isolées de patients hospitalisés laboratoire EL MORCHED

On a utilisé six antibiotiques différents comme références. Il s'agit de la gentamicine (GE), l'amoxicilline (AMX), l'ofloxacine (OF), la pénicilline (P), la nitroxaline (NO) et la cefalexine (CN). Ce choix a été fait en fonction de la disponibilité.

VI.3. Activité anticoagulante *in vitro*

L'activité anticoagulante des extraits de *Pergularia tomentosa* a été évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests globaux chronométriques ; le temps du chéphaline-kaolin (TCK) et le temps de Quick (TQ).

Pour l'évaluation de l'activité anticoagulante on a utilisés les produits suivants : La thromboplastine (BIO-TP), le tampon de reconstitution de la thromboplastine et la céphaline kaolin (BIO-CK) ont été fournis du Biolabo de France, l'héparine ou la Fraxiparine (une héparine de 2850 UI, constitue une solution injectable dans des seringues pré-remplies à usage thérapeutique) achetée de la pharmacie.

Le pool plasmatique pauvre en plaquette est un mélange de plasmas déplaquettés de 6 jeunes adultes comme volontaires sains non traités , dont les TCK et les TQ sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang (1 : 9, v/v). Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma standard obtenu est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation (ATHUKORALA *et al.*, 2007).

VI-3.1. Temps de Quick ou taux de prothrombine (TP)

Le test de Temps de Quick (TQ) permet une exploration de la voie extrinsèque de la coagulation. Le TQ converti en "taux de prothrombine" (TP) permet d'évaluer l'activité des facteurs du complexe prothrombinique en référence à un plasma normal à 100%.

Cet examen consiste à mesurer le temps que met à se former un caillot de fibrine à 37°C lorsqu'on ajoute dans le plasma un excès de thromboplastine. Normalement le caillot se forme en 12 à 13 secondes ce qui représente le temps de Quick. Le TQ explore les facteurs de la voie exogène de la coagulation: facteur VII, facteur X, facteur V, facteur II, fibrinogène (CAQUET, 2004).

Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

10 µL des extraits préparés dans le DMSO avec une concentration de 10 mg/ml sont additionnées à 90µL du plasma standard qui est ensuite incubé à 37°C durant 15 minutes. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µL de thromboplastine préincubé à 37°C pendant 15 minutes, et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré automatiquement à l'aide du coagulomètre.

VI.3.2. Temps de céphaline Kaolin (TCK)

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène (intrinsèque) de la coagulation (CAQUET, 2004).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C d'un plasma déplaquetés et citraté mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant (CAQUET, 2004).

Un temps de coagulation allongé en présence des extraits par rapport à celui du contrôle négatif indique que ces extraits exercent une activité anticoagulante vis-à-vis de cette voie de coagulation.

La procédure suivie dans la réalisation de ce test est celle pratiquée par ATHUKORALA et ses collaborateurs (2007). Le mélange 90 µL plasma et de 10 µL d'extrait (10 mg/ml dans DMSO) ou de l'héparine comme standard, est incubé à 37°C à 15 minutes, puis on ajoute 100 µL du réactif de céphaline, on laisse le mélange 3 minutes, suivi d'une addition de 100 µL de CaCl₂ pour une reclassification du plasma. Ainsi le temps d'incubation est mesuré à l'aide d'un coagulomètre de type Biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s).

VII. Analyses statistiques

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel Excel 2013. Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n= 3).

La différence entre les extraits et les contrôles et la détermination des taux de signification sont effectués par le test ANOVA suivi du test Tukey par logiciel R for Windows GUI front-end.

Chapitre II.

Résultats et discussions

I. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante *Pergularia tomentosa* ont permis de détecter les différentes classes de composés existant dans les trois parties étudiées (feuilles, tiges et racines) par des réactions qualitatives de caractérisation. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau XI.

Tableau XI : Screening chimique de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites du Sahara septentrional

	Site A (Méguibra)			Site B (Negrine)			Site C (Mansoura)			Site D (Metlili)		
	Feuille	Tige	Racine	Feuille	Tige	Racine	Feuille	Tige	Racine	Feuille	Tige	Racine
SAP	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
TAN	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
FLA	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
ALC	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
CAR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. RED	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
QUI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ANTH.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HE	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

- : absence, + : présence, SAP : Saponosides, TAN : Tanins, FLA : Flavonoïdes, ALC : Alcaloïdes, CAR : Cardénolides, STE : Stérols, S. RED : Sucres réducteurs, QUI : Quinones libres, TER : Terpénoïdes, ANTH. : Anthraquinones, HE : Huiles essentielles

Les résultats des tests phytochimiques ont révélé la présence de flavonoïdes cardénolides, quinones libres et terpénoïdes dans tous les organes de l'espèce *P.tomentosa*.

Les parties aériennes se sont montrées riches en divers familles de métabolites secondaires, tandis que la partie souterraine semble ne contenir que des traces de ces métabolites et l'absence totale des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes. Notons que des résultats similaires ont été obtenus sur la même espèce récoltée à Sokoto (Nigeria) selon HASSAN *et al.*, (2007).

L'absence de certains composés (Stérols et Anthraquinones) dans la plante pourrait s'expliquer par leur faible solubilité dans l'eau.

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

Bien qu'il y ait des différences entre les quatre sites d'étude nous n'avons remarqué aucune différence dans les résultats des tests de caractérisations chimiques. Ceci est dû soit à la limite de détection de ces tests préliminaires ou au fait que les différents échantillons présentent probablement des compositions identiques.

II. Extraction des composés phénoliques

Les extractions ont été faites dans un solvant vert, accessible et universel : l'éthanol. Bien qu'étant un solvant organique, il possède une grande polarité qui lui permet d'extraire autant les molécules polaires, comme les polyphénols, que non-polaires, comme les triterpènes ou les phytostérols. Sa polarité est de 1,69 Debye (A titre indicatif l'eau a une polarité de 1,854 Debye) et il se retrouve sous forme liquide entre -114,1 et 78,2°C, ce qui permet son utilisation dans diverses conditions. Il est préparé à grand volume à partir de la biomasse agricole par un procédé de fermentation peu polluant et peu coûteux, ce qui est important pour une mise à l'échelle éventuelle des procédés d'extraction (**ST-PIERRE, 2012**).

Deux méthodes d'extractions par solvant ont été privilégiées : l'extraction par macération simple et une macération assistée aux ultrasons. Les rendements d'extraction sont illustrés dans la figure 8. Les deux méthodes d'extraction ont abouti à des résultats similaires, mais la méthode utilisant des ultrasons est plus rapide (**ST-PIERRE, 2012**).

Nous constatons que le site B présente un rendement de 3,58 %, inférieur à celui des plantes issues des autres sites d'études.

Les fractionnements des extraits bruts par solvants, de polarité croissante, sont regroupés dans le tableau XII

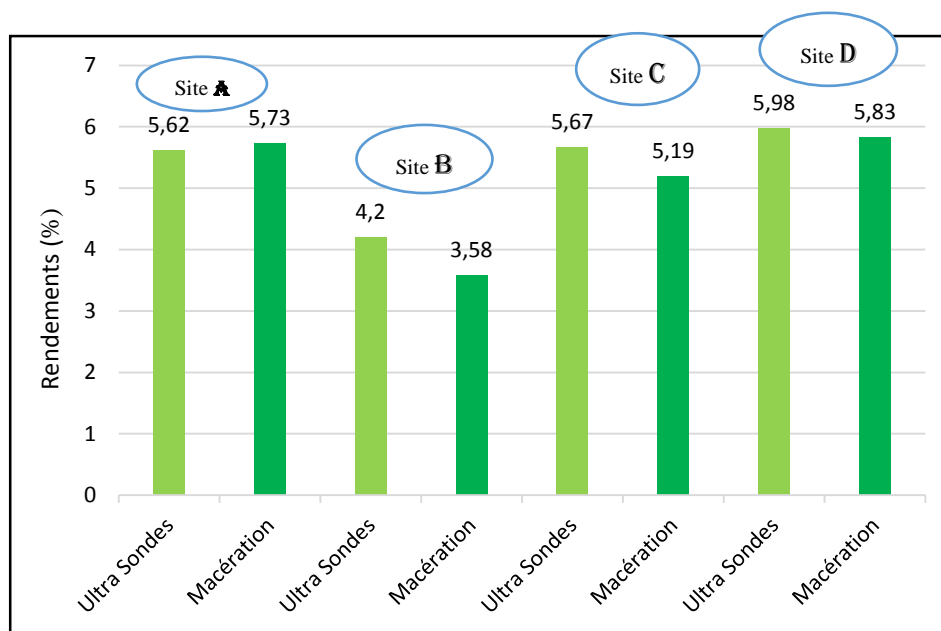


Figure 08 : Rendements d'extraits bruts des feuilles de *Pergularia tomentosa* issues des quatre zones d'études

Tableau XII : Rendements des fractions des feuilles de *Pergularia tomentosa*.

Fractions	Rendements (%)	Fractions	Rendements (%)
MEP A	0,03	MBuOH A	1,85
MEP B	0,04	MBuOH B	1,16
MEP C	0,04	MBuOH C	1,5
MEP D	0,07	MBuOH D	1,16
MAcOEt A	0,3	MAq A	3,51
MAcOEt B	0,26	MAq B	2,6
MAcOEt C	0,31	MAq C	2,73
MAcOEt D	0,38	MAq D	2,64

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante, permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dont la température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant, et affecte aussi leur quantification (HAGERMANN *et al.*, 2000).

III. Analyse quantitative

III.1. Dosage de polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de **WONG *et al.*, (2006)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g). Cette teneur est calculée en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Figure 09).

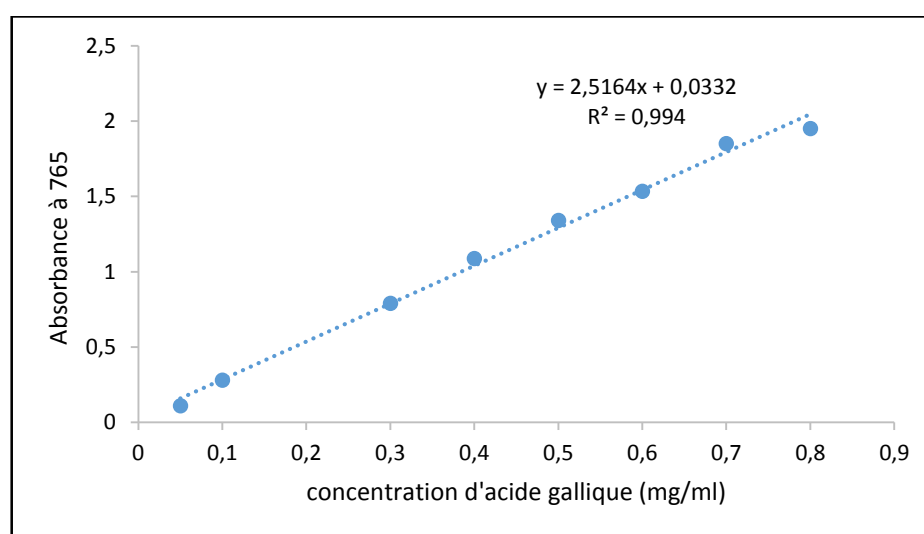


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

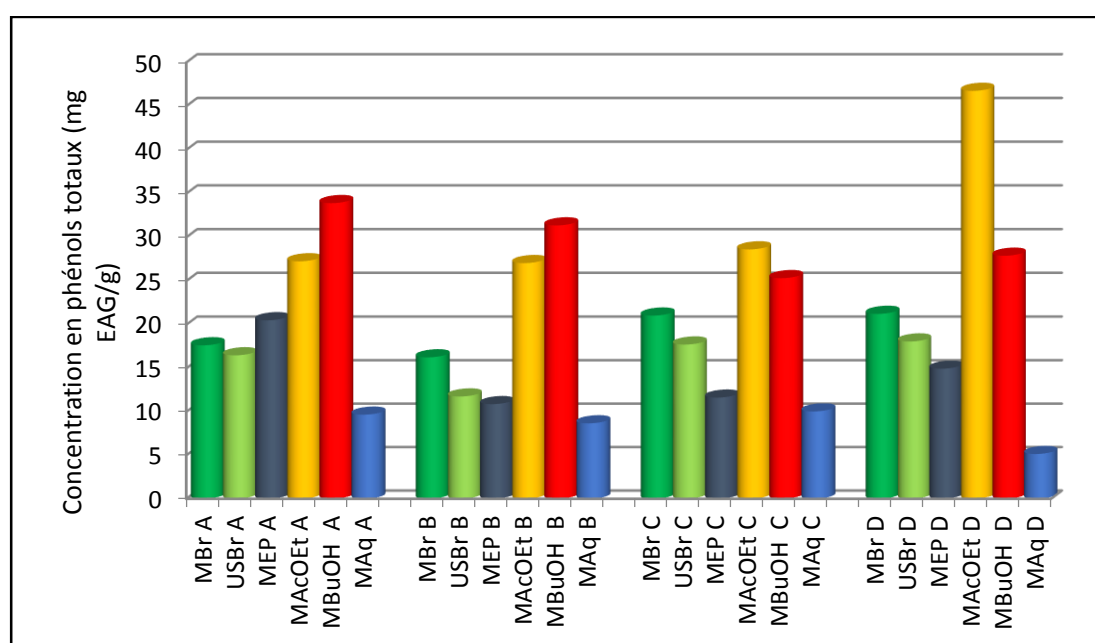


Figure 10 : Teneurs en phénols totaux

L'histogramme illustré par la figure 10 montre que les teneurs en polyphénols varient considérablement entre les extraits des différents sites étudiés. Ces résultats montrent que les fractions d'acétate d'éthyle et celles de butanol sont les extraits les plus riches en polyphénols, où la teneur la plus élevée est constatée dans la fraction d'acétate d'éthyle du site D (Metlili), elle est de l'ordre de $46,75 \pm 0,07$ mg EAG/g suivi par la fraction butanolique du site A (Méguibra) avec une teneur de $33,91 \pm 0,11$ mg GAE/g. Notons aussi que les teneurs en polyphénols des extraits bruts sont voisines pour les deux méthodes d'extraction par ultrasons et par macération simple. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par **AL JABRI (2013)** et **HENEIDAK *et al.*, (2006)**.

Ces observations laissent penser que les quatre sites présenteraient des compositions polyphénoliques différentes en quantité et, peut-être aussi, en nature. Néanmoins, le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu, implique que toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, sont dosées, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols (**FUKUSHIMA *et al.*, 2009**).

La quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (**EBRAHIMZADEH *et al.*, 2008**), la variété, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (**PARK et CHA, 2003**) et la durée de sa conservation (**ÖZGÜVEN et TANSI, 1998**).

III.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **BAHORUN *et al.*, (1996)**. La teneur en flavonoïdes des différentes fractions de la plante est exprimée en mg équivalent de rutine (ER) par gramme d'extrait (Figure 11).

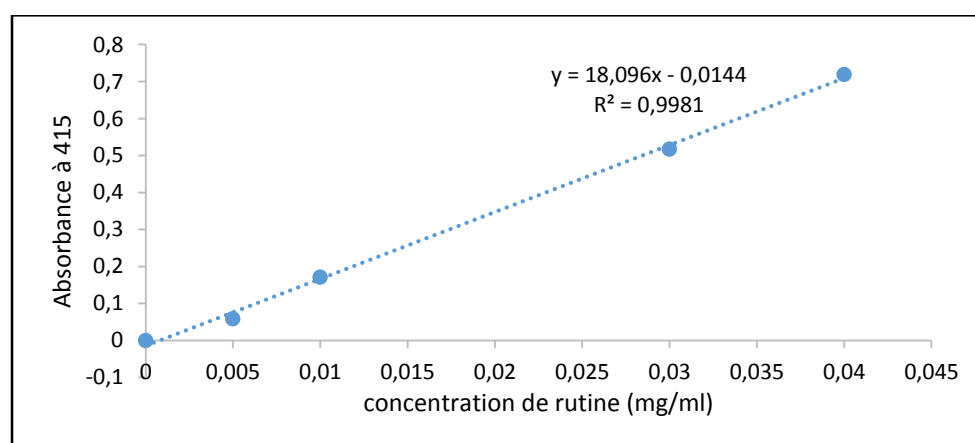


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de rutine pour le dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes (figure 12), font apparaitre que les fractions butanoliques et les extraits éthanoliques bruts sont les plus riches. La teneur la plus élevée est constatée dans la fraction butanolique B (Negrine) $54,48 \pm 0,3$ mg ER/g.

Nos résultats sont quasiment équivalents à ceux obtenus par **RACHED (2009)**.

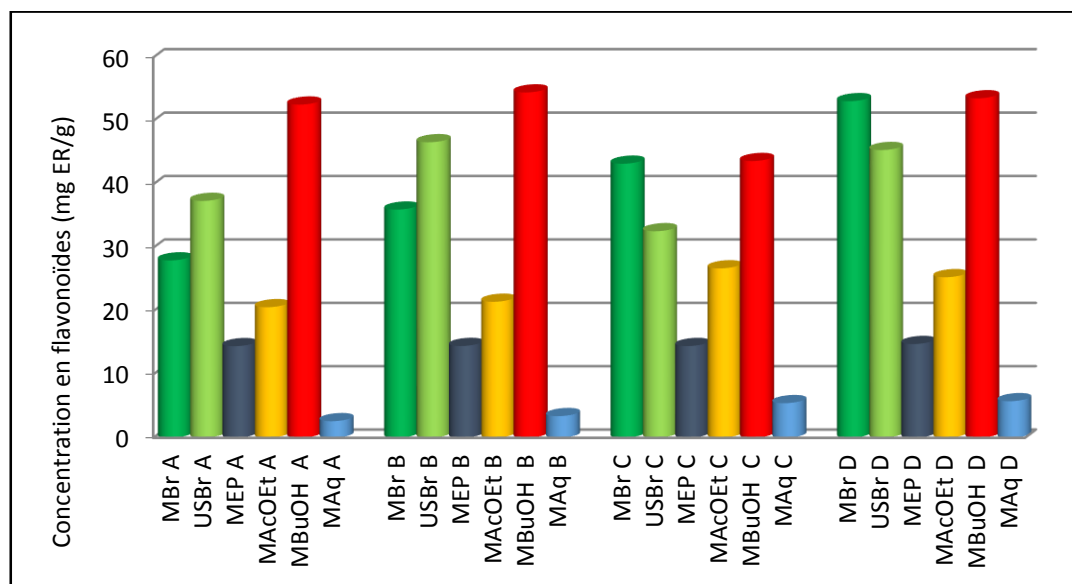


Figure 12 : Teneurs en flavonoïdes

III.3. Dosage de tanins condensés

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par **SCHOFIELD *et al.*, (2001)**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g).

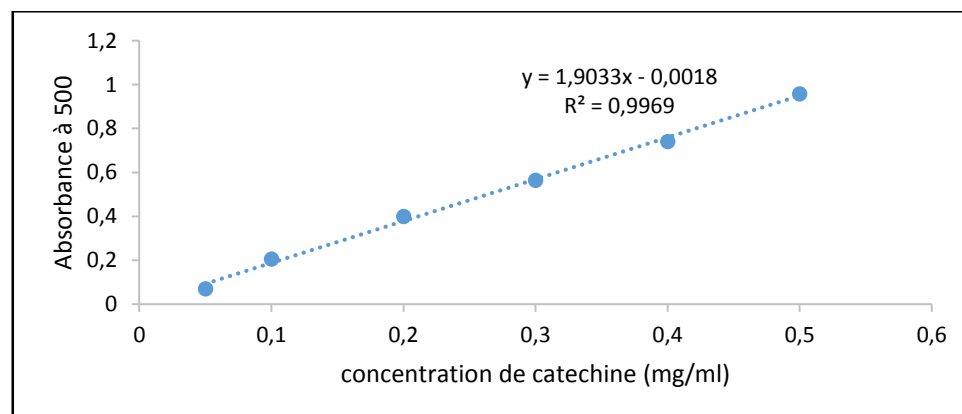


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.

Ces dosages révèlent que les extraits éthanoliques bruts renferment les plus importantes teneurs en tanins condensés. Leur concentration a atteint $61,06 \pm 0,22$ mg EC/g dans l'extrait brut obtenu par macération de la plante issue du site A (Méguibra), alors qu'elle était inférieure à 10 mg EC/g dans les autres fractions.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **BOUHAMDI (2012)** sur la même espèce. La teneur en tanins condensés était de 2,1 mg/100g de matière sèche dans cette étude.

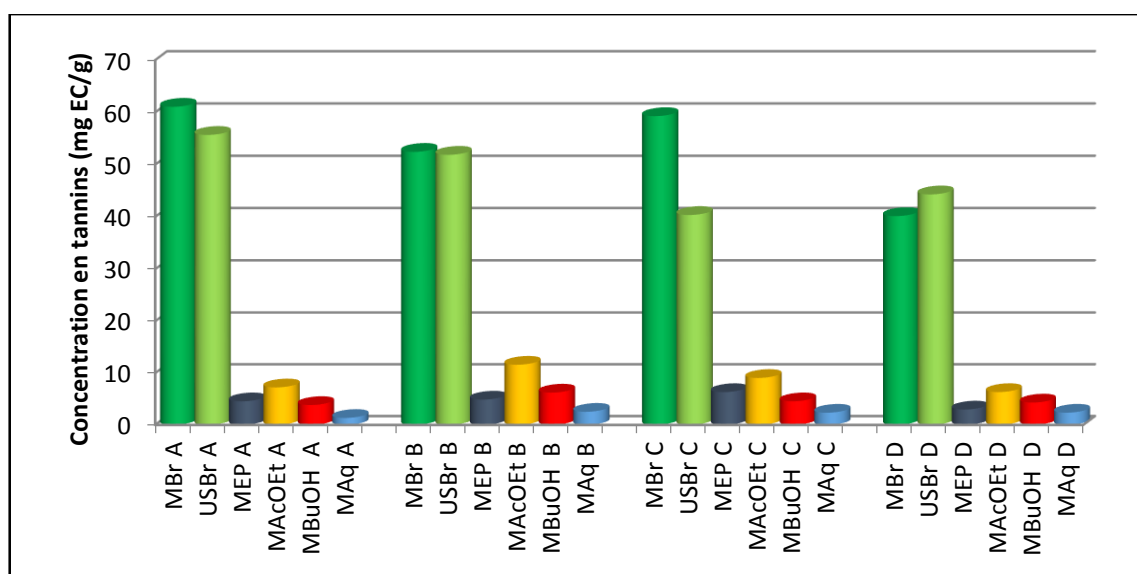


Figure 14 : Teneurs en tanins condensés

III.4. Analyse statistique

Suite aux dosages des différents composés phénoliques dans les extraits des feuilles des sites choisis, une analyse de la variance (Anova) a été réalisée par le logiciel R. Cette analyse a montré que la différence entre les quatre sites étudiés est très hautement significative pour tous les paramètres: polyphénols totaux ($P < 0,001$), flavonoïdes ($P < 0,001$) et tanins ($P < 0,001$).

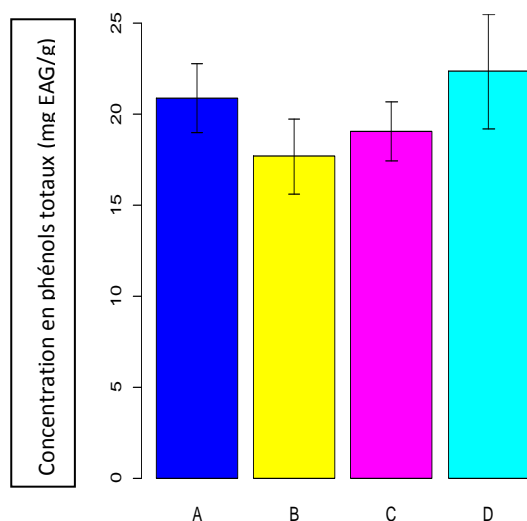


Figure 15 : Effet des sites sur les teneurs en polyphénols totaux

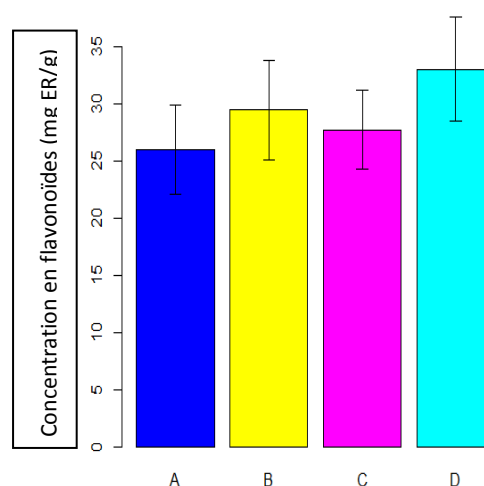


Figure 16 : Effet des sites sur les teneurs en flavonoïdes

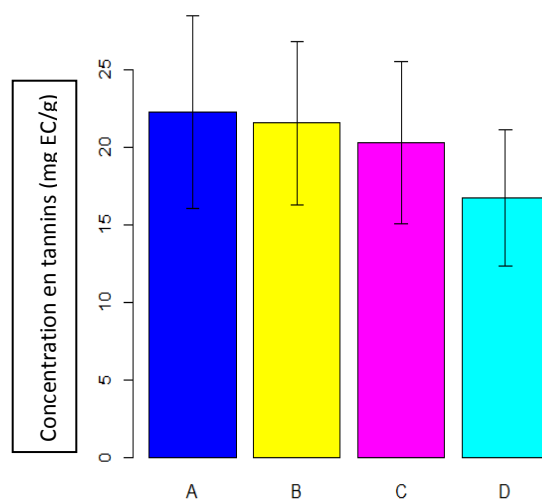


Figure 17 : Effet des sites sur les teneurs en tannins condensés

MAISUTHISAKUL *et al.*, (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits éthanoliques de 28 plantes est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. De même dans notre étude, nous avons trouvé que la teneur des polyphénols totaux des extraits du Pergulaire s'est corrélée avec la teneur des flavonoïdes de 44,3 %. Mais on a trouvé un pourcentage de corrélation très faible avec la teneur des tanins de 13 % (**voir l'annexe : matrice de corrélation**).

Par ailleurs, nous avons observé que les techniques d'extraction utilisées n'ont pas influencé la quantité des polyphénols dans les extraits récupérés à partir des feuilles de la plante étudiée.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la différence quantitative quant aux polyphénols des feuilles de la *P. tomentosa* pourrait être due aux conditions environnementales et géographiques.

A l'issue de ces résultats de la caractérisation quantitative, la *Pergularia tomentosa* à travers ces constituants en polyphénols, flavonoïdes et en tannins, constitue une source prometteuse en composés bioactives bénéfiques à la santé humaine.

IV. Analyse qualitative

IV.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du *Pergularia tomentosa*, une analyse par chromatographie sur couche mince a été réalisée.

Les systèmes de migration utilisés sont :

- ✓ Acétate d'éthyle/Acide acétique glacial/acide formique/Eau (100:11:11:26) pour les extraits bruts éthanoliques, fractions Acétate d'éthyle et les fractions butanoliques.
- ✓ Butanol/acide acétique/eau (12:3:5) pour les fractions Aqueuse résiduelle.
- ✓ Dichlorométhane /méthanol (90:10) pour les fractions d'éther de pétrole.

Les tableaux XIII à XVII représentent les différentes valeurs des facteurs de rétention R_f et les couleurs caractéristiques des composés séparés à partir des feuilles de *Pergularia tomentosa* sous les différentes conditions opératoires.

Tableau XIII : Résultats de CCM des extraits bruts éthanoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Phase mobile : Acétate d'éthyle/Acide acétique glacial/acide formique/Eau (100:11:11:26)				
R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Vanilline sulfurique	AlCl ₃ à 366 nm
0,06	-	-	Verdâtre	-
0,16	-	-	Brun	-
0,22	-	-	Violet	-
0,26	-	-	Violet	-
0,3	-	-	Vert	-
0,34	-	-	Vert	-
0,41	-	-	Violet	-
0,46	-	-	Brun	-
0,52	-	-	Violet	-
0,62	Jaune	Bleu	Jaune	Jaunâtre
0,67	Jaune	Vert clair	Jaune	-
0,7	Jaune	Vert clair	Jaune	Jaunâtre
0,77	-	-	Mauve	Jaunâtre
0,85	-	-	Mauve	-
0,97	Vert	-	Mauve	-

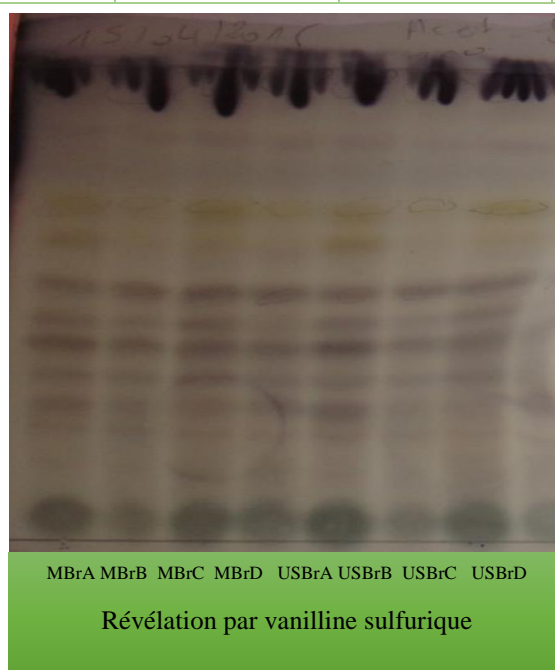


Figure 18 : Chromatogramme des extraits éthanoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Tableau XIV : Résultats de CCM des fractions d'acétate d'éthyle des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Phase mobile : Acétate d'éthyle/Acide acétique glacial/acide formique/Eau (100:11:11:26)				
R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Vanilline sulfurique	AlCl ₃ à 366 nm
0,05	-	-	Vert	-
0,4	-	-	Verdâtre	-
0,43	-	-	-	-
0,52	-	-	-	-
0,56	Brune	Jaune	Jaune foncé	Bleu
0,62	Brune	Jaune	Jaune foncé	Bleu
0,67	Violet foncé	Jaune	Jaune foncé	Jaunâtre
0,71	-	-	Violet	bleu
0,76	-	-	Jaune	Jaunâtre
0,81	-	-	Brune	Jaunâtre
0,91	-	-	Brune	Bleu
0,97	-	-	Brune	Bleu

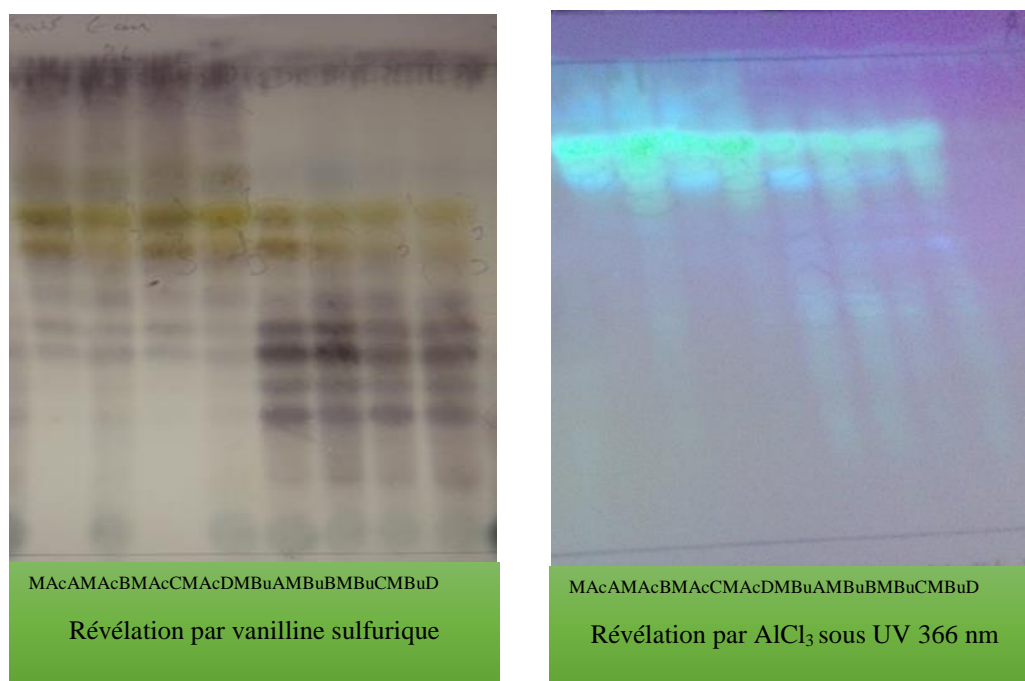


Figure 19 : Chromatogramme des fractions d'acétate d'éthyle et butanoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Tableau XV : Résultats de CCM des fractions butanoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Phase mobile : Acétate d'éthyle/Acide acétique glacial/acide formique/Eau (100:11:11:26)				
R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Vanilline sulfurique	AlCl ₃ à 366 nm
0,05	Brune	-	Verdâtre	-
0,16	Brune	-	Marron	-
0,2	Brune	-	Marron	-
0,22	Brune	-	Brune	-
0,27	Brune	-	Violet	-
0,33	Brune	-	Verdâtre	-
0,4	Brune	-	Violet foncé	Verdâtre
0,43	Brune	-	Violet foncé	Verdâtre
0,46	Brune	-	Mauve	Bleu
0,52	Brune	-	Mauve	Bleu
0,56	Violet	Jaune	Jaune	Bleu
0,62	Violet	Jaune	Jaune	Bleu
0,67	Violet	Jaune	Jaune	Jaune
0,71	Brune	-	Brune	Jaune
0,76	Brune	-	-	Jaune
0,97	Brune	-	-	-

Tableau XVI : Résultats de CCM des fractions aqueuses résiduelles des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Phase mobile : Butanol/acide acétique/eau (12:3:5)				
R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Vanilline sulfurique	AlCl ₃ à 366 nm
,27	Marron	-	Vert	-
0,37	Brune	-	Verdâtre	-
0,41	-	-	Brune	Verdâtre
0,5	Brune	Bleu	Rouge	Bleu
0,56	Brune	Bleu	Bleu	Bleu
0,68	Brune	-	-	Bleu
0,82	-	-	-	Bleu
0,93	-	-	Vert	-

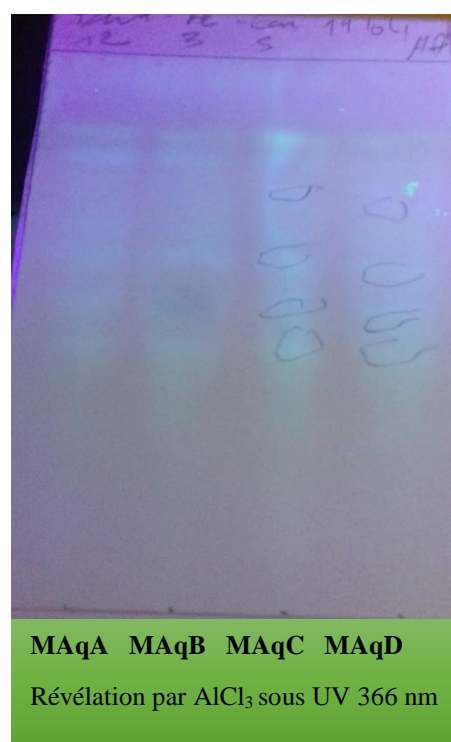
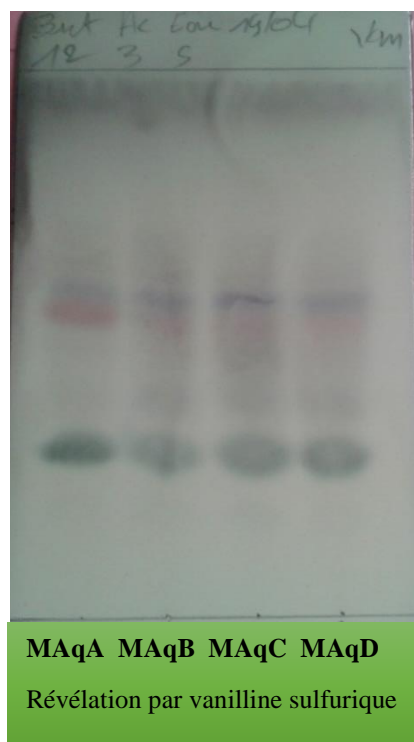


Figure 20 : Chromatographie sur gel de silice des fractions Aqueuse résiduelle des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Tableau XVII : Résultats de CCM des fractions éther de pétrole des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Phase mobile : Dichlorométhane/Méthanol (90:10)			
R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Vanilline sulfurique
0,12	Marron	Vert	Vert
0,18	-	-	Vert
0,31	-	-	Jaune
0,35	-	-	Brune
0,5	Brune	-	Brune
0,76	Brune	Verdâtre	Vert

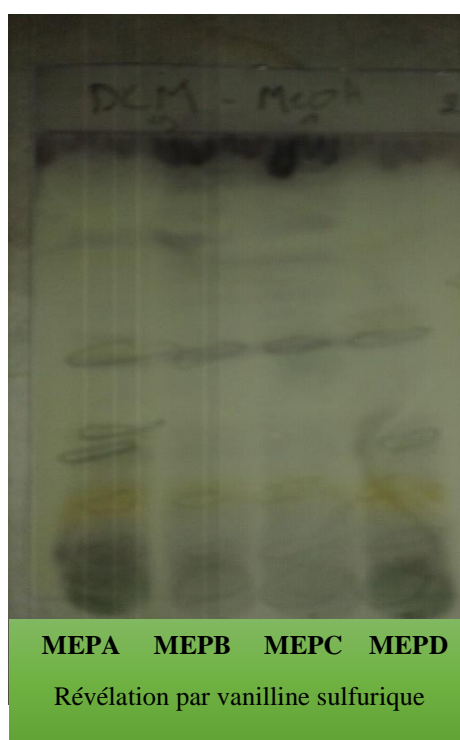


Figure 21 : Chromatogramme des fractions éther de pétrole des feuilles de *Pergularia tomentosa*

Les résultats de l'analyse chromatographique ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes. Les extraits éthanoliques bruts (macération ou ultrasons) semblent avoir des composés en commun avec des profils similaires, mais avec des concentrations différentes selon l'intensité des taches obtenues.

Après révélation, trois taches jaunes apparaissent pour les extraits bruts éthanoliques, fractions d'acétate d'éthyle et les fractions butanoliques, elles sont visibles sous les révélateurs (vanilline sulfurique, UV 254 nm et UV 366 nm). Mais on note un seul spot jaune pour les fractions éther de pétrole.

Le comportement des spots obtenus sous UV avant et après révélation (**WAGNER et BLADT, 1996**) confirme la richesse et la diversité des composés phénoliques en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques dans les extraits des feuilles du *Pergularia tomentosa*.

La technique de macération assisté aux ultrasons a donné des résultats très similaires à la macération simple, tant en termes de concentrations de l'extrait que de la composition.

Des travaux antérieurs sur la même plante (**HENEIDAK et al., 2006**) ont montré que les flavonoïdes sont sous forme d'aglycones flavoniques combinés avec des glycosides. Les molécules obtenues sont essentiellement les flavonols de type : isorhamnétine, kaempférol, quercétine et leurs dérivés glycosidiques.

Nous pouvons donc conclure que l'analyse qualitative des extraits de *Pergularia tomentosa* par la chromatographie sur couche mince a révélé une même composition pour les quatre sites. Ces extraits contiennent un nombre considérable de constituants visibles sur les profils chromatographiques et qui peuvent être identifiés par les techniques spectroscopiques non disponibles dans notre travail.

IV.2. Analyse par chromatographie C.L.H.P

La Figure 33 représente un exemple de chromatogramme de l'extrait butanolique de site A (Méguibra) obtenu par CLHP

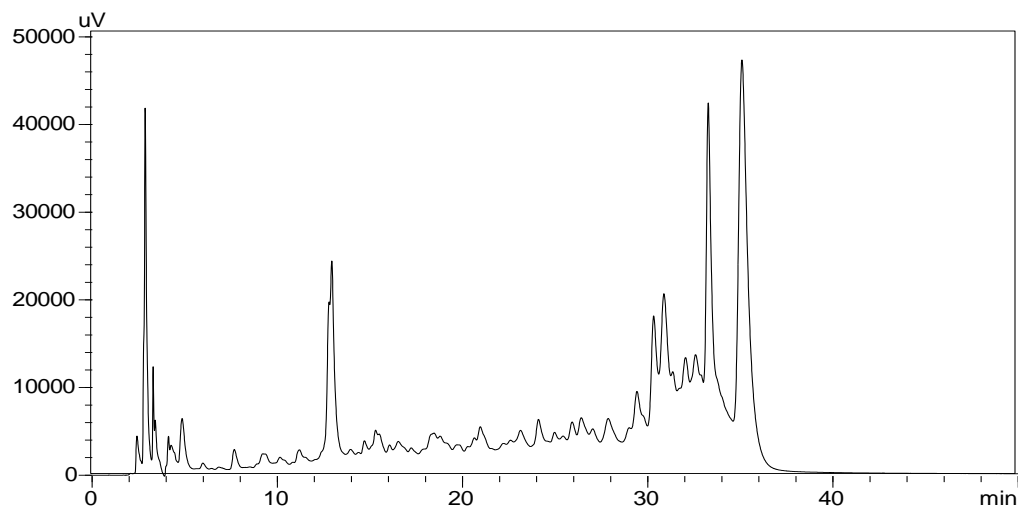


Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait butanolique des feuilles du site A obtenu par CLHP.

Un profil identique est montré par les quatre sites (figure 23)

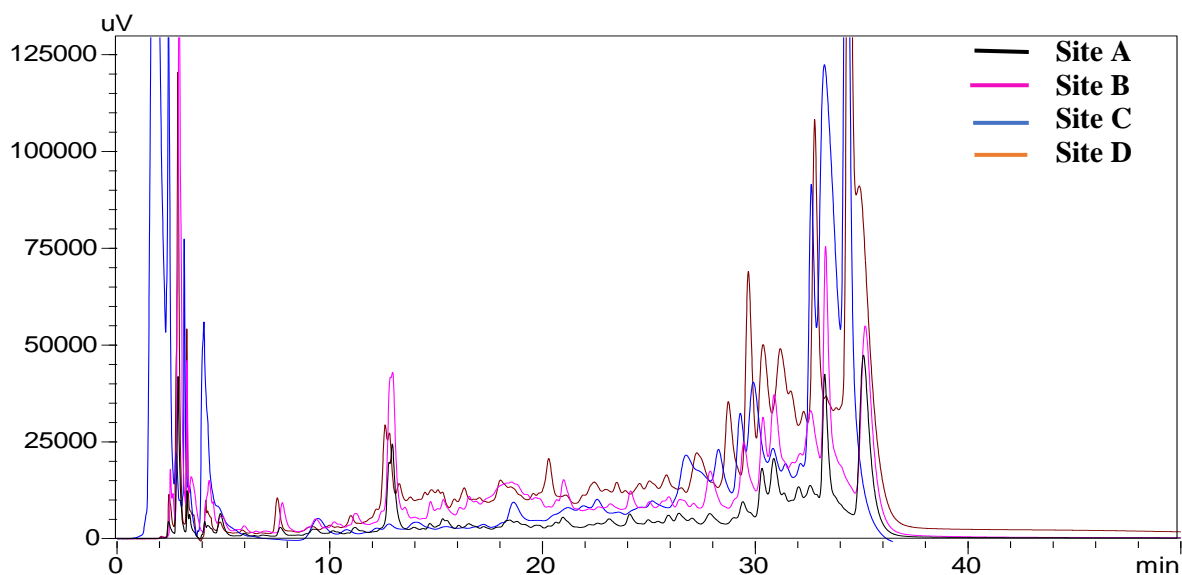


Figure 23 : Chromatogramme des extraits butanoliques de différents sites obtenu par CLHP.

Une tentative a été faite pour séparer les constituants de l'extrait butanolique du *P. tomentosa* par CHLP **Figure 23**. On voit clairement que la séparation n'est pas satisfaisante et nécessite une optimisation des conditions opératoires l'améliorer et qui fera l'objet d'un travail ultérieur.

Malgré les différences géographiques des sites étudiées, nous constatons que les feuilles du *P. tomentosa* ont les mêmes profils phénoliques. Cela montre qu'il n'y a pas de différence qualitative significative entre les plantes de ces quatre régions.

5-Evaluation biologique

V.1. Activité antioxydante

V.1.1. Test de piégeage du radical DPPH

Dans ce test les antioxydants réduits décolorent le radical DPPH, en le transformant en un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine. L'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants à donner l'hydrogène (ARDESTANI et YAZDANPARAST, 2007).

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

Un autre paramètre exprimant la puissance antiradicalaire a été calculé à partir du premier paramètre noté : "ARP" (pouvoir antiradicalaire, égale à 1/IC50). Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

Tableau XVIII : Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH

Extraits	IC50 (mg/mL)	ARP	Extraits	IC50 (mg/mL)	ARP
MBr A	9,81 ± 0,06	0,101	MAcOEt A	5,74 ± 0,02	0,175
MBr B	7,59 ± 0,04	0,132	MAcOEt B	5,08 ± 0,008	0,2
MBr C	7,57 ± 0,04	0,133	MAcOEt C	5,45 ± 0,02	0,184
MBr D	7,34 ± 0,03	0,135	MAcOEt D	5,07 ± 0,04	0,196
USBr A	8,58 ± 0,09	0,11	MBuOH A	3,84 ± 0,04	0,26
USBr B	7,99 ± 0,06	0,126	MBuOH B	2,51 ± 0,03	0,394
USBr C	8,49 ± 0,05	0,118	MBuOH C	5,19 ± 0,02	0,19
USBr D	8,65 ± 0,02	0,116	MBuOH D	2,94 ± 0,03	0,34
MEP A	11,54 ± 0,05	0,086	MAq A	8,12 ± 0,03	0,123
MEP B	11,6 ± 0,23	0,087	MAq B	9,63 ± 0,01	0,103
MEP C	10,38 ± 0,11	0,095	MAq C	9,45 ± 0,02	0,105
MEP D	13,26 ± 0,09	0,075	MAq D	8,41 ± 0,004	0,118
Acide ascorbique	0,079 ± 0,0008	12,5			
quercétine	0,061 ± 0,0004	16,66			

A des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés, la quercétine et l'acide ascorbique (**Figure 24**), ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC₅₀ de l'ordre de $0,061 \pm 0,0004$ mg/mL et $0,079 \pm 0,0008$ mg/mL et des APR de l'ordre de 16,66 et 12,5 respectivement. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Parmi les extraits de *Pergularia tomentosa*, l'extrait butanolique B (Negrine) représente l'extrait le plus actif, avec une IC₅₀ de l'ordre $2,51 \pm 0,03$ mg/mL et un APR de 0,394 suivi par l'extrait butanolique D (Metlili) avec une IC₅₀ $2,94 \pm 0,03$ mg/mL et un APR de 0,34.

Par contre les extraits apolaires d'éther de pétrole de Metlili montrent une très faible activité antiradicalaire, dont l'IC₅₀ : $13,26 \pm 0,09$ mg/mL et l'APR : 0,075.

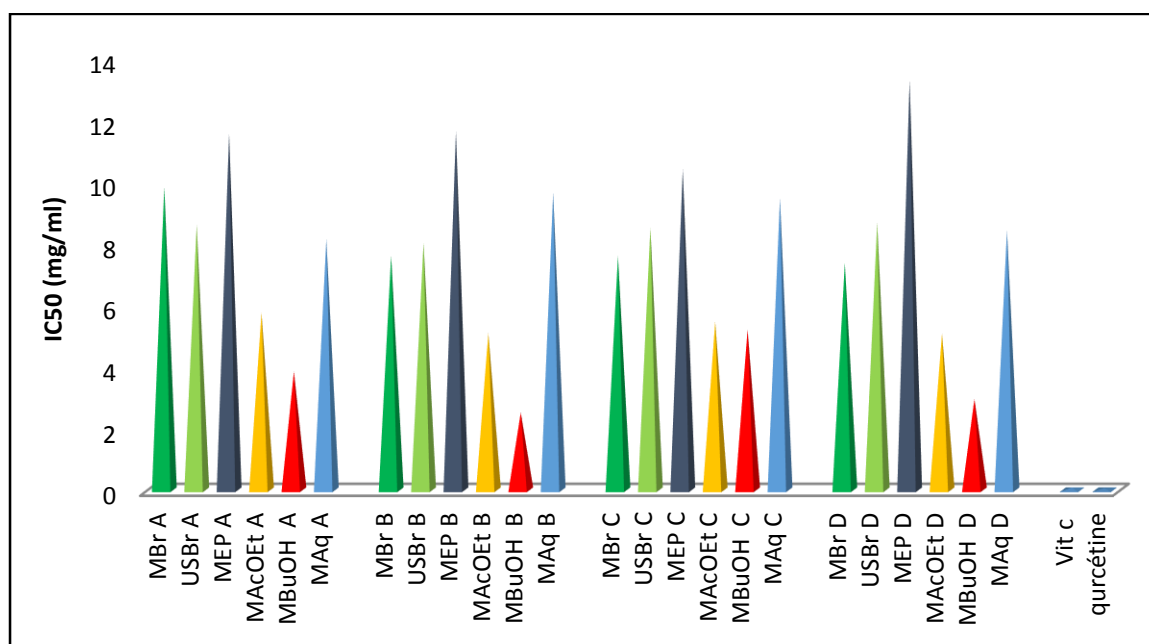


Figure 24 : Histogramme des résultats de concentrations inhibitrices 50 % de DPPH des différents extraits.

Nous notons que toutes les valeurs obtenues par nos extraits sont moins importantes que celles de la quercétine et de l'acide ascorbique.

Une analyse de variances Anova a été faite dans le but de comparer entre les quatre sites de récoltes de la plante (Figure 25) et les six solvants d'extraction utilisés (Figure 26). Cette analyse montre une différence très hautement significative dans tous les cas et les capacités de piégeage du radical sont classées par ordre décroissant :

- Pour les sites : **A** (Méguibra) > **C** (Mansoura) > **D** (Metlili) > **B** (Negrine).
- Pour les solvants : Butanol > Acétate d'éthyle > Ethanol (macération) > Ethanol (ultrasons) > phase Aqueuse résiduelle > Ether de pétrole.

La détermination des coefficients de corrélation entre les IC_{50} et le contenu en polyphénols et en flavonoïdes a montré l'existence d'une corrélation négative significative qui est de -0,692 et -0,594 respectivement, mais celle-ci n'est pas significative dans le cas des tanins avec une valeur de 0,119 (tableau 44). Pour les deux cas, les valeurs d' IC_{50} diminuent avec l'augmentation du contenu de polyphénols et de flavonoïdes, ce qui se traduit par des activités antioxydantes très élevées dans les extraits riches en polyphénols. Ces résultats corroborent les résultats déjà mentionnés auparavant dans la littérature (**WONG *et al.*, 2006 ; ARAB *et al.*, 2014**).

On peut dire que nos extraits présentent une activité antioxydante et que la capacité de piéger le radical libre DPPH est puissante avec les extraits polaires et modeste avec les extraits apolaires.

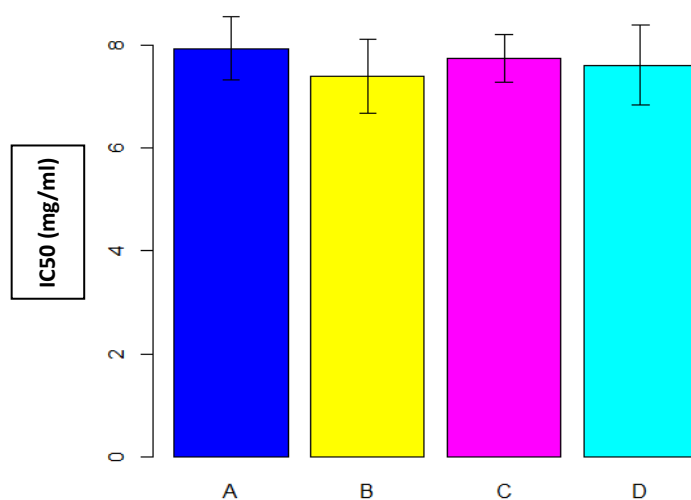


Figure 25 : Effet des sites sur l'activité antioxydante (test DPPH)

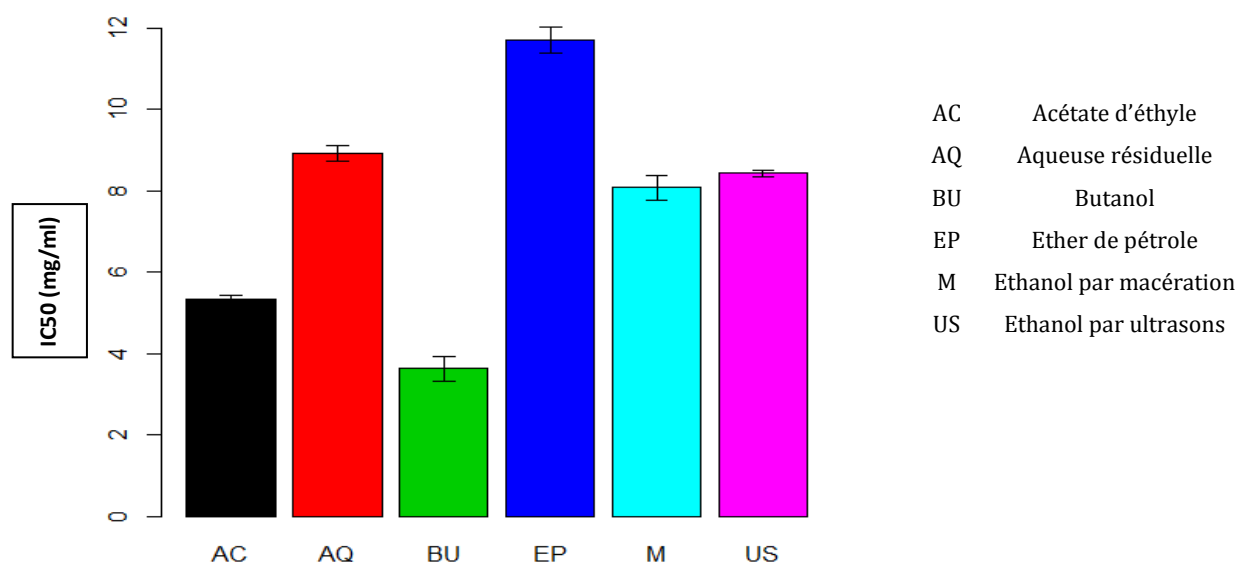


Figure 26 : Effet des solvants sur l'activité antioxydante (test DPPH)

V.1.2. Test de FRAP

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de chaque site. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de l'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g).

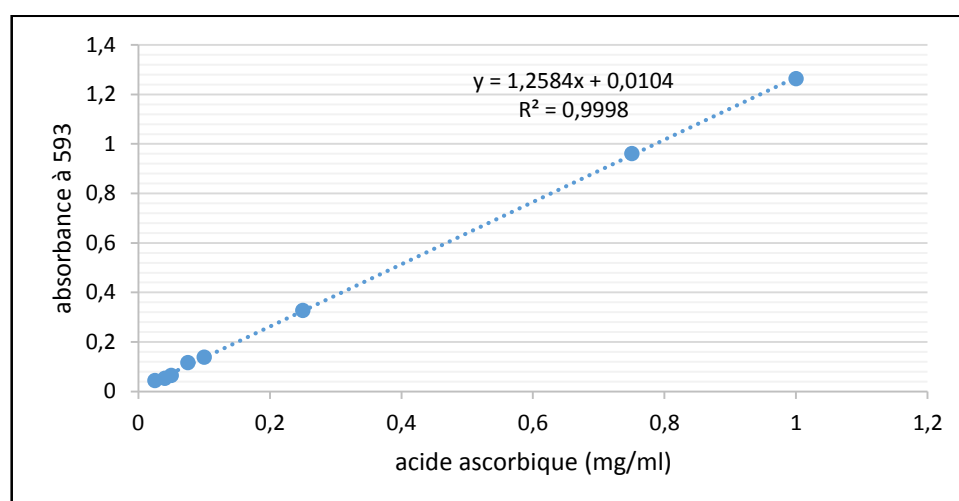


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP

Tableau XIX : Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test FRAP

Extraits	l'activité antioxydante (mg EAA/g)	Extraits	l'activité antioxydante (mg EAA/g)
MBr A	44,44 ± 0,02	MAcOEt A	92,91 ± 1,46
MBr B	39,76 ± 0,27	MAcOEt B	95,18 ± 0,36
MBr C	75,8 ± 0,8	MAcOEt C	96,78 ± 0,45
MBr D	48,01 ± 1,68	MAcOEt D	97,41 ± 0,19
USBr A	59,21 ± 0,34	MBuOH A	96,99 ± 0,48
USBr B	42,36 ± 2,08	MBuOH B	104,45 ± 0,32
USBr C	103,77 ± 0,54	MBuOH C	115,56 ± 0,28
USBr D	36,33 ± 0,91	MBuOH D	140 ± 0
MEP A	39,46 ± 0,16	MAq A	37,70 ± 0,25
MEP B	27,92 ± 0,04	MAq B	31,75 ± 0,36
MEP C	34,37 ± 0,88	MAq C	38,4 ± 0,08
MEP D	48,71 ± 0,45	MAq D	33,11 ± 0,64

Les résultats du test de FRAP mentionnés sur le tableau XIX indiquent que la fraction butanolique du site D possède l'effet antioxydant le plus important de l'ordre 140 mg EAA/g et la fraction éther de pétrole B exerce le moins important, à une valeur égale à 27,92 ± 0,04 mg EAA/g.

L'analyse de la variance à deux facteurs, site et solvants, suivi par test Tukey, multiples comparaisons des moyennes (95% family-wise confidence level), a montré une différence très hautement significative avec $Pr (>F) : 0$ entre les quatre sites et les six solvants étudiés. Les valeurs les plus importantes ont été enregistrées :

- Pour les sites sont **C** (Mansoura) > **D** (Metlili) > **A** (Méguibra) > **B** (Negrine).
- Pour les solvants sont Butanol > Acétate d'éthyle > Ethanol (ultrasons) > Ethanol (macération) > Ether de pétrole > Aqueuse résiduelle.

Ce qui peut être expliqué par le fait qu'elles ne contiennent pas la même quantité de composés phénoliques.

La teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits s'est corrélé significativement 76,1% et 52,6% (matrice de corrélation) respectivement avec leurs activités antioxydantes.

La corrélation entre le FRAP et les concentrations IC50 du pouvoir antioxydant est de l'ordre de 80.3% montrant que les différentes techniques sont complémentaires.

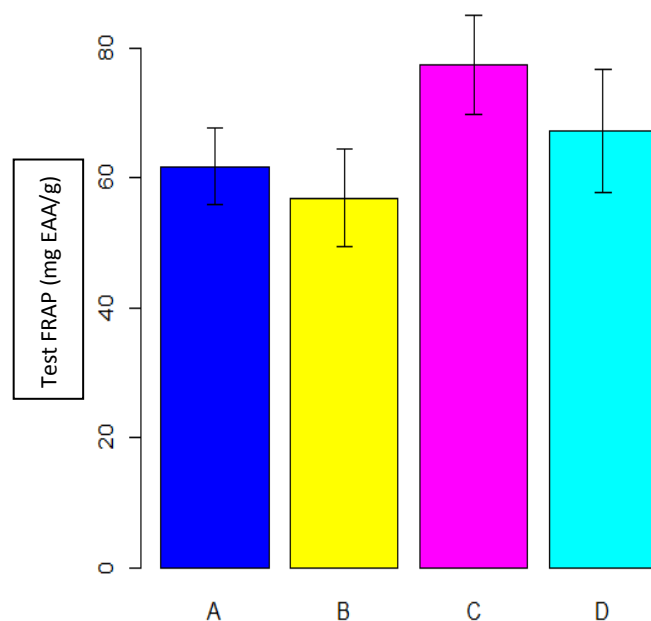


Figure 28 : Effet des sites sur l'activité antioxydante par le test FRAP

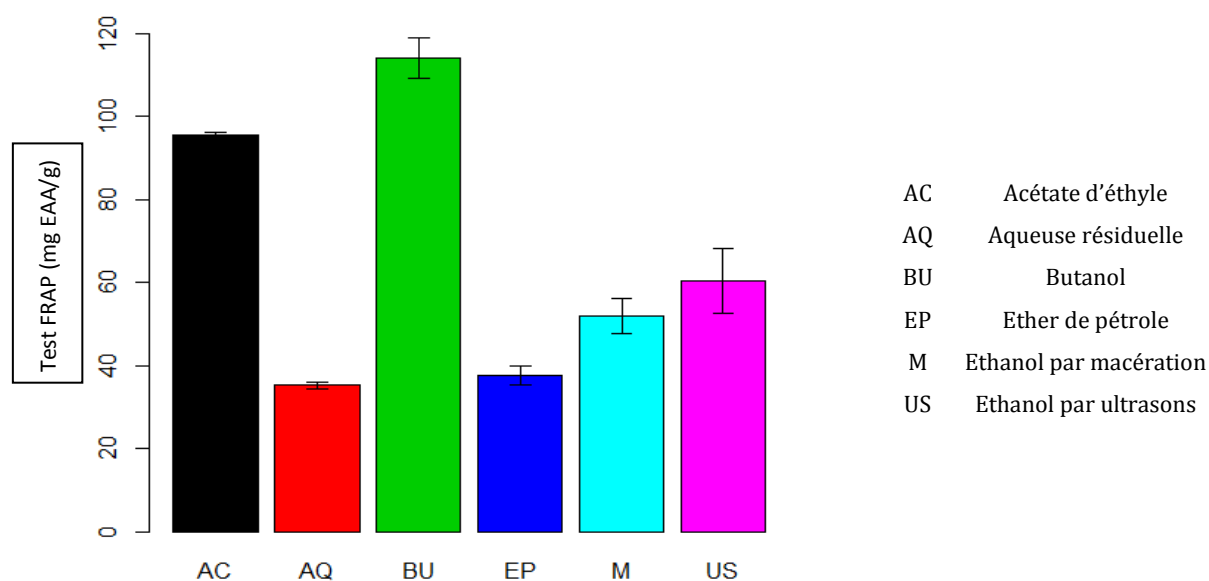


Figure 29 : Effet des solvants sur l'activité antioxydante par le test FRAP

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 travaux mené par **ELAYARAJA *et al.*, (2015)** sur l'extrait méthanolique de *Pergularia extensa* a montré une activité antioxydante plus importante que l'acide ascorbique.

Nous constatons que cette activité diffère selon le test utilisé. En effet, **MICHEL (2011)** montre que les conditions d'extraction peuvent influencer sur la capacité antioxydante des extraits. Ainsi, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (**FALLEH *et al.*, 2008**). Ce qui peut expliquer cette variation au niveau des résultats obtenus.

Sur la base des données précédentes, il est possible que l'activité antioxydante, puissante d'extraits polaires, soit due à la présence de substances ayant des groupes hydroxyles libres. Dans ce contexte, les flavonoïdes possèdent une structure idéale pour le balayage des radicaux libres, car ils présentent un certain nombre de groupes hydroxyles agissant comme hydrogène-donateurs (**USMANI *et al.*, 2013**).

A travers la recherche bibliographique il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**HEIM *et al.*, 2002**) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**TORRES DE PINEDO *et al.*, 2007**).

En conclusion, grâce à ses propriétés antioxydantes, notre plante contribue à la protection contre les effets nocifs des radicaux libres, justifiant ainsi son utilisation traditionnelle contre le cancer et les maladies de la peau.

La complexité de l'extrait brut ne nous a pas permis de faire une analyse efficiente des différents composés. Des études postérieures, permettant une purification des composés (fractionnement), devront être réalisées afin de confirmer les premiers résultats obtenus et d'approfondir les élucidations structurales initiées, au moyen d'autres techniques analytiques (LC-MS, RMN) et d'autres tests, pour aboutir enfin à l'identification des molécules bioactives présentes dans cette plante.

V.2. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *Pergularia tomentosa* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure.

L'activité antimicrobienne 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 de quatre germes pathogènes qui sont : *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *C. albicans*.

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

Les souches testées ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards utilisés : Amoxicilline, Ofloxacine, Nitroxaline, Gentamicine, Cefalexine et Pénicilline.

D'après le tableau XX, *Escherichia coli* est sensible à la Gentamicine, l'Ofloxacine, la Nitroxaline et la Cefalexine avec des diamètres de zones d'inhibition de 25, 23, 15 et 13,5 mm respectivement, alors qu'elle est résistante à l'Amoxicilline et la Pénicilline.

Pseudomonas aeruginosa est plus ou moins sensible aux différents antibiotiques sauf l'Amoxicilline.

Staphylococcus aureus est résistante à l'amoxicilline, la Cefalexine et la Pénicilline, alors qu'elle a montré une certaine sensibilité vis-à-vis de la Gentamicine, l'ofloxacine, la nitroxaline avec 24, 23 et 15 mm des diamètres de zones d'inhibition respectivement.

Mais *Candida albicans* est une levure résistante aux différents antibiotiques testés sauf la nitroxaline avec des zones d'inhibition de 34 ± 2 mm.

Tableau XXVI Les résultats des tests d'activité antimicrobienne des extraits

Extraits	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	Extraits	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
MBr A	12,5 ± 0,5	12,5 ± 0,5	16 ± 1	11 ± 1	MAcOEt A	17,5 ± 0,5	14 ± 1	19 ± 3	12 ± 0,5
MBr B	14,5 ± 0,5	13,5 ± 0,5	18 ± 1	10 ± 1	MAcOEt B	18 ± 1	15 ± 2	18 ± 1	8,5 ± 0,5
MBr C	17 ± 1	16 ± 1	18 ± 1	11,5 ± 0,5	MAcOEt C	14 ± 0	16,5 ± 0,5	19,5 ± 0,5	8 ± 0,5
MBr D	19 ± 1	17 ± 0	17 ± 1	11 ± 1	MAcOEt D	16 ± 2	20 ± 2	17 ± 1	7,5 ± 0,5
USBr A	20,5 ± 1,5	13 ± 1	18 ± 2	11 ± 1	MBuOH A	16 ± 1	11 ± 1	10 ± 0	8 ± 0,5
USBr B	18 ± 1	12,5 ± 0,5	18 ± 1	13,5 ± 2	MBuOH B	15 ± 0	10 ± 1	11 ± 0	8 ± 0,5
USBr C	22 ± 2	17,5 ± 1,5	15 ± 1	13 ± 1	MBuOH C	16,5 ± 1,5	15 ± 1	12 ± 1	8 ± 0,5
USBr D	20 ± 1	16 ± 1	17 ± 2	12 ± 0,5	MBuOH D	18,5 ± 1,5	15 ± 1	11,5 ± 0,5	9 ± 0,5
MEP A	17,5 ± 1,5	14,5 ± 0,5	12 ± 1	9 ± 0,5	MAq A	10 ± 1	8 ± 0	0	14 ± 1
MEP B	16 ± 1	12 ± 1	15,5 ± 0,5	10,5 ± 1	MAq B	8 ± 0,5	8,5 ± 0,5	0	12 ± 0,5
MEP C	15 ± 0	15 ± 1	16 ± 3	10 ± 1	MAq C	11,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5	0	11,5 ± 0,5
MEP D	14 ± 1	14,5 ± 0,5	13 ± 1	11,5 ± 0,5	MAq D	8 ± 1	9 ± 1	0	12 ± 0,5
Amoxicilline	0	10 ± 0	0	0	Gentamicine	25 ± 1	25 ± 1	24 ± 2	0
Ofloxacine	23 ± 1	21 ± 1	23 ± 2	0	Cefalexine	13,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	0	0
Nitroxaline	15 ± 1	19,5 ± 0,5	15 ± 1	34 ± 2	Pénicilline	0	0	0	0

Nous pouvons confirmer l'effet antimicrobien des feuilles de *Pergularia tomentosa* sur les différentes souches examinés. Cette efficacité est probablement due à la présence des polyphénols, flavonoïdes et les tanins qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antimicrobiens (**XIA et al., 2011**).

Notons que la plus grande zone d'inhibition (22 mm) a été mesurée contre *E. coli*, suivie d'une zone d'environ 20 mm contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Une zone d'inhibition de 14 mm a été observée contre *C. albicans*.

Nous remarquons que l'extrait d'acétate d'éthyle exerce un effet remarquable sur l'ensemble des souches. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette plante contient des composants antibactériens actifs extractibles par ce solvant.

Il a été rapporté par **ĆETKOVIC et al., (2007)** que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Satureja montana* présente une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* par rapport à l'extrait au n-butanol.

Nos travaux confirment l'ensemble des résultats de **DANGOGGO et al., (2002) et al., JABRI (2013)**, qui montrent une activité antibactérienne significative par tous les extraits des feuilles du *Pergularia tomentosa*.

Statistiquement, on n'observe pas une différence significative du pouvoir antimicrobien entre les quatre sites étudiés. D'après **AL JABRI (2013)** qui suggère que l'effet antimicrobien est en inhérence aux espèces végétales et ne dépendent pas de manière significative du temps et du lieu de la collecte de l'échantillon.

Il apparaît que *Staphylococcus aureus* (gram positive) est la bactérie la plus sensible par rapport aux autres souches (gram négative) ; ceci peut être attribué à la différence structurale entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives (**DAVID et SUDARSANAM, 2013**).

On peut conclure que les composants biologiquement actifs des feuilles de *P. tomentosa* pourraient représenter une nouvelle source antimicrobienne à exploiter en médecine moderne. Néanmoins, comme cela a été signalé auparavant, d'autres études sont nécessaires pour isoler et caractériser les principes bioactifs et ainsi contribuer au développement de nouveaux médicaments antimicrobiens.

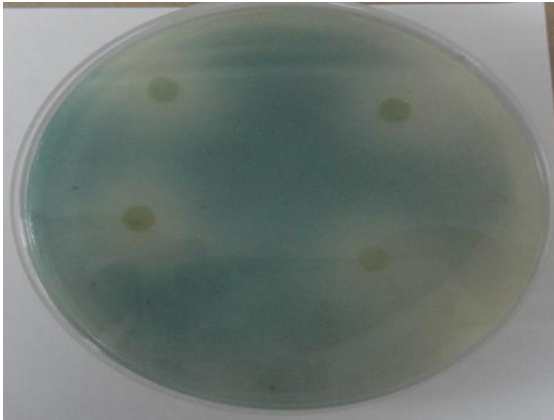


Photo 4: Activité des extraits bruts par macération des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*

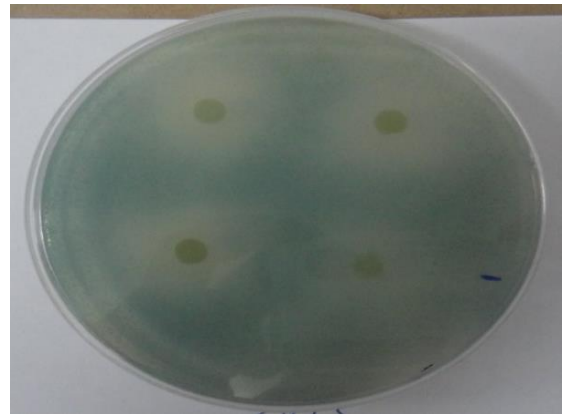


Photo 5 : Activité des extraits bruts aux ultrasons des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*

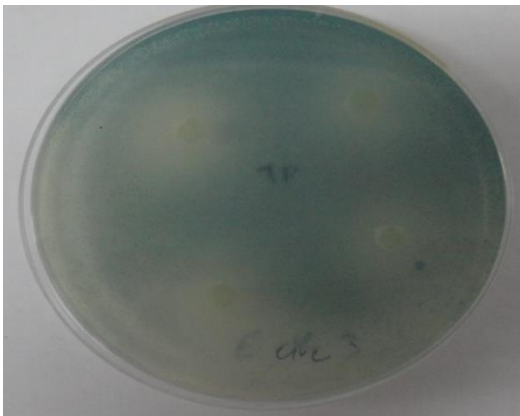


Photo 6 : Activité des fractions butanoliques des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*

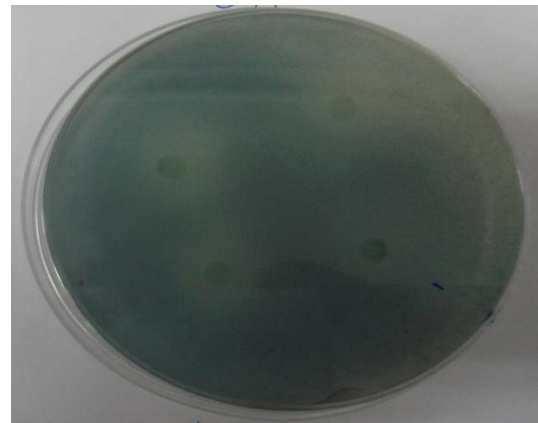


Photo 7 : Activité des fractions acétate d'éthyle des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*



Photo 8 : Activité des fractions butanoliques des feuilles du *P. tomentosa* sur *Candida albicans*

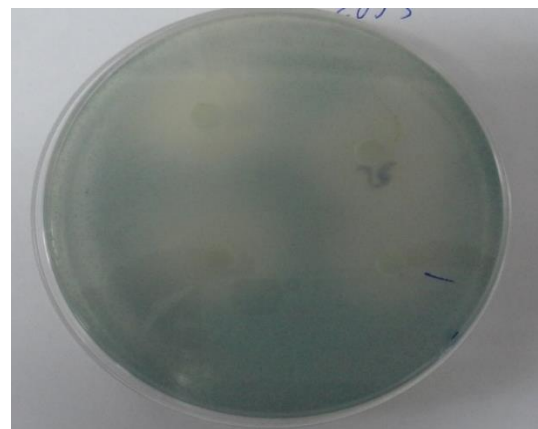


Photo 9 : Activité des fractions aqueuses résiduelles des feuilles du *P. tomentosa* sur *Escherichia coli*

V.3. Activité anticoagulante *in vitro*

Le pouvoir anticoagulant des extraits des feuilles du *Pergularia tomentosa* a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement.

Le test TCK est activée par le contact entre le facteur XII et la surface électronégative de l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vivo*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquent l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (facteur II) (GEROTZIAFAST, 2007).

Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif où l'échantillon est remplacé par le DMSO traduit une activité anticoagulante du matériel testé.

Les résultats mentionnés dans le tableau XXI et l'analyse statistique, montrent que la différence n'est pas significative avec le contrôle négatif. Les temps de TCK sont entre $29,93 \pm 2,8$ s à $49 \pm 1,82$ s pour les extraits et le temps de contrôle négatif est $41,4 \pm 2,47$ s. Alors que le temps de contrôle positif (héparine) est supérieur à 300 s.

Le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui permet d'explorer globalement la voie exogène de la coagulation où le facteur tissulaire est le déclencheur de cette voie (TRIPODI, 2009). Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (CAQUET, 2004) et un allongement par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation.

Pas de différence significative entre les extraits et le contrôle négatif, le temps de TQ est entre $12,43 \pm 1,91$ à $19,93 \pm 1,24$ (s) pour les extraits et le temps de contrôle négatif est $21,1 \pm 3,33$ (s). Alors que le temps de contrôle positif (héparine) est 173 ± 2 (s).

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits des feuilles du *Pergularia tomentosa* établie par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que ces extraits n'exercent pas une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation.

Selon SAKTHIPRIYA et VIDHYA (2015) *Pergularia deamia* présente une bonne activité anticoagulante qui peut être la présence des tanins, des alcaloïdes, des saponines et d'autres composés actifs. Récemment la découverte des plantes médicinales ayant une activité thrombotique est rare (RAHMAN *et al.*, 2013), parmi lesquelles : les huiles essentielles de

Nigella sativa famille des Renonculacées (LEMAOUI, 2011) et extraits de polyphénols d'olive *Olea europaea* famille des Oleaceae (MANALLAH, 2012). L'attribution exacte de l'activité biologique à un composé, ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs :

- Concentration et l'interaction synergique avec d'autres composants (ALMELA *et al.*, 2006) ;
- Périodes de récolte (CELIKTAS *et al.*, 2007) ;
- Méthodes d'extraction (KOSAR *et al.*, 2005).

Tableau XXI : Résultats d'activité anticoagulante des feuilles du *Pergularia tomentosa*

Extraits	TCK (s)	TQ (s)	INR	TP(%)	Extraits	TCK (s)	TQ (s)	INR	TP(%)
MBr A	48,63 ±1,81	19,3 ± 1,8	2,0	41,5	MAcOEt A	45,56 ± 1,36	17,1 ± 1,73	1,6	52,7
MBr B	44,26 ±0,11	16,43 ±1,55	1,5	56,5	MAcOEt B	40,06 ±3,6	17,8 ±1,06	1,7	49,4
MBr C	46,43 ±5,43	18,86 ±1,77	1,9	43,8	MAcOEt C	38,06 ±1,90	17,46 ±1,77	1,7	49,4
MBr D	48,4 ± 2,52	19,5 ±1,26	2,0	41,5	MAcOEt D	40,9 ±1,91	16,63 ±1,82	1,6	52,7
USBr A	49 ± 1,82	17,73 ±0,97	1,7	49,4	MBuOH A	40,36 ±6,47	16,76 ±1,44	1,6	52,7
USBr B	46,33 ±0,68	19,73 ±1,28	2,1	39,4	MBuOH B	42,56 ±4,34	17,73 ±2,82	1,7	49,4
USBr C	44,46 ±1,72	19,93 ±1,24	2,1	39,4	MBuOH C	40,7 ±3,19	18,5 ±2,73	1,9	43,8
USBr D	41,7 ± 2,46	18 ±1,66	1,8	46,5	MBuOH D	39,4 ±2,40	13,56 ±1,84	1,2	79,6
MEP A	39,93 ±0,82	17,53 ±1,44	1,7	49,4	MAq A	31,53 ±2,33	13,46±1,844	1,2	79,6
MEP B	41,4 ± 0,93	18,2 ±0,53	1,8	46,5	MAq B	29,93 ±2,80	12,43 ±1,91	1,0	100
MEP C	41,2 ±1	18,86 ±0,91	1,9	43,8	MAq C	33,6 ±2,14	13,63 ±2,02	1,2	79,6
MEP D	43,3 ±2,8	19,6 ±0,6	2,0	41,5	MAq D	30,3 ±4,06	17,1 ±1,73	1,6	52,7
contrôle négatif	41,4 ± 2,47	21,1 ±3,33	2,4	35,8					
contrôle positif	>300	173 ±2	>7,6	<13,5					
Plasma	28,66 ±0,70	12,53±1,35	1,0	100					

Conclusion

Le screening phytochimique a mis en évidence divers métabolites secondaires dans les trois parties de la plante investie dans notre travail : Tanins, saponosides, terpènes, alcaloïdes, stérols, flavonoïdes et polyphénols. Les feuilles se sont avérées être les plus riches en ces métabolites secondaires. Ainsi, notre étude s'est orientée sur cette partie de la plante.

Les feuilles de *Pergularia tomentosa* ont été soumises à deux méthodes d'extraction des composés phénoliques, l'une par macération et l'autre assistée aux ultrasons. L'extrait obtenu par macération a été soumis à des fractionnements par des solvants de polarité croissante.

La teneur en composés phénoliques des plantes estimées par la méthode de Folin-Ciocalteu est comprise entre $46,57 \pm 0,07$ et $5,15 \pm 0,07$ mg EAG/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ a révélé que l'extrait butanolique du site de Negrine est le plus riche avec un teneur de $54,48 \pm 0,3$ mg ER/g d'extrait. L'estimation de la quantité de tanins condensés montre que l'extrait brut de Méguibra est le plus riche, elle est de l'ordre de $61,06 \pm 0,22$ mg EC/g d'extrait.

Les résultats obtenus dans l'analyse quantitative des composés phénoliques fait apparaître que les feuilles de cette plante peuvent être considérées comme une source éventuelle de cette classe de métabolites secondaires. La variation de la teneur des composés phénoliques entre les différents sites est très hautement significative, ceci est probablement dû à l'influence des conditions géographiques entre autres.

En outre, l'analyse qualitative des différents extraits par chromatographie sur couche mince et liquide à haute performance, nous a conduit à des profils phénoliques semblables pour les extraits des différents sites étudiés.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH, a révélé une réponse antioxydante considérable. Les résultats varient significativement d'un site à un autre. L'effet antioxydant diminue dans l'ordre C (Mansoura) > D (Metlili) > A (Méguibra) > B (Negrine).

L'aptitude antioxydante, des extraits de feuilles, présente une bonne corrélation avec les teneurs en polyphénols totaux, et à un degré moindre avec les teneurs en flavonoïdes mais avec une plus faible corrélation avec les teneurs en tanins condensés.

L'activité antimicrobienne des extraits végétaux sur des microorganismes pathogènes s'est avérée importante, vu que cette plante a révélé une activité remarquable sur les quatre souches testées *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*.

Notons par ailleurs que l'analyse statistique de ces résultats a montré que l'effet antimicrobien, ne présente pas de différence significative entre les quatre sites.

L'étude du pouvoir anticoagulant des extraits des feuilles de *Pergularia tomentosa* a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement, démontre que ces extraits n'exercent pas une activité anticoagulante importante pour les deux voies de coagulation.

Comme les résultats obtenus *in vitro*, dans ce travail, ne constituent qu'une première étape dans la recherche des substances, de source naturelle, biologiquement actives, nous pouvons émettre certaines perspectives à envisager dans cet axe de recherche et compléter ainsi notre projet, il s'agit de :

- l'étude phytochimique: isolation, caractérisation, et identification de métabolites secondaires de *Pergularia tomentosa* L. en utilisant des techniques d'identification plus performantes (chromatographies couplées à des techniques spectroscopiques telles que la masse et la RMN).
- la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) et fongicide (CMF), des extraits de cette plante.
- La réalisation des tests biologiques *in vivo* afin de mettre en évidence certains principes actifs.

Références bibliographiques

- 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.
- AJJAN R. et GRANT P.J., 2006**-Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*. 186 : 240–259.
- AL JABRI Sharifa, 2013**- Chemical and Bio-analytical Studies on *Pergularia tomentosa* and Species from the *Mentha Genus*. Thèse doctorat. Université de Leicester. 244 p.
- AL-BANDAK G. et OREOPOULOU V., 2007**-Antioxidant properties and composition of *Majorana syriaca* extracts. *European Journal of Lipid science and technology*. 109 (3) : 247-255.
- ALMELA L., SANCHEZ-MUNOZ B., FERNANDEZ-LOPEZ J.A., ROCA M.J. et RABE V., 2006**-Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J. Chromatography A*. 1120 : 221-229.
- AL-QURA'N Saleh, 2005**-Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon*. 46(2) : 119-129.
- 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.
- ANTOLOVICH M., PRENZLER P., ROBARDS K. et RYAN D., 2000**-Sample préparation in the détermination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*. 125 : 989-1009.
- ANTONOT E. et MARCHAL R., 1998**-Chromatographie (stage MAFPEN), édition Lycée Louis Vincent. pp : 26-28.
- ARAB K., BOUCHENAK O. et YAHIAOUI K., 2014**-Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *Journal of Fundamentals Applied Sciences*. 6(1) : 79-93.
- ARDESTANI A. et YAZDANPARAST R., 2007**-Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*. 104 : 21-29.

- ATHUKORALA Y., LEE K.W., KIM S.K. et JEON Y.J., 2007**-Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98 : 1711–1716.
- AUBRY P. et HALNA DU FRETAY X., 2010**-Traitements antithrombotiques du syndrome coronarien aigu avec sus-décalage ST. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 59 : 335-343.
- BABAAMER Z., ABU ZARGA M., GHAZI AL-ABDALLAT N. et SAKHRI L., 2014**-Isolation of Cardenolide glycosides from *Pergularia tomentosa*. L and their Antioxidant activities. *Annales des Sciences et Technologie*. 6(2) : 122-128.
- BABAAMER Z.Y., SAKHRI L., AL-JABER H.I., AL-QUDAH M.A. and ABU ZARGA M.H., 2012**-Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria, *Journal of Asian Natural Products Research*. Vol. 14, No. 12 : 1137–1143.
- BAHORUN T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKX M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J. C. et PINKAS M., 1996**-Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal of Arzneimittel-Forschung*. 46 : 1086-1089.
- BATTY P. et SMITH G., 2013**-Anticoagulation. *Surgery*. 31(5) : 195-199.
- BEAUDEUX J.L., DELATTRE J., THEROND P., BONNEFONT-ROUSSELOT D., LEGRAND D. et PEYNET J., 2006**-Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno analyse & Biologie spécialisée*. 21 : 144-150.
- 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.
- BENAVENTE-GARCIA O. et CASTILLO J., 2008**-Update on use and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15) : 6185-6205.
- BENZIE I. et STRAIN F.F., 1996**-The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxydant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1) : 70-76.
- BERGOGNE-BEREZIN E. et DELLAMONICA P., 1995**-Antibiothérapie en pratique clinique. Ed. Masson, Paris. 486p.
- BERRADA N., 2013**-L'athérombose : la maladie et les avancées thérapeutiques des vingt dernières années. Thèse de docteur en pharmacie, université d'Angers, France. 151p.

- BIJAK M., ZIEWIECKI R., SALUK J., PONCZEK M., PAWLACZYK I., KROTKIEWSKI H., WACHOWICZ B. et NOWAK P., 2014**-Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Medicinal chemistry research*. 23 : 2324–2337.
- BOIZOT N. et CHARPENTIER J.P., 2006**-Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, Le Cahier des Techniques de l'INRA, pp : 79-82.
- BOUHAMDİ A., 2012**-Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. de la région d'Adrar. Mémoire master en biochimie appliquée. Université Tlemcen. 56 pp.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E. et BERSSET C., 1995**-Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*. 28 : 25-30.
- BRUNETON J., 1999**-Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Edition : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120p.
- BRUNETON J., 2009**-Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Edition Lavoisier. Paris. 1234p.
- BUDIC-LETOC I., LOVRIC T., PEZO I. et KLUJUZURIC J.G., 2005**-Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*. 43(1) : 47-53.
- Caquet R., 2004**-250 examens de laboratoire : prescription et interprétation. 9ème Ed., Masson Paris. pp : 388-389.
- CELIKİTAS O.Y., HAMES KOCABAS E.E., BEDİR E., VARDAR SUKAN F., OZEK T. et BASER K.H.C., 2007**-Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100 : 553-559.
- ĆETKOVIC G.S., ĆANADANOVIĆ-BRUNET J., DJILAS S.M., TUMBAS V.T., MARKOV S.L. et CETKOVIĆ D.D., 2007**-Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. *Int. J. Mol. Sci*. 8(10) : 1013-1027.
- CHEHMA A., 2006**-Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 140 p.

- CHENG S.S., LIU J.Y., CHANG E.H. et CHANG S.T., 2008**-Antifungal activity of cinnam aldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. 99 (11) : 5145-5149.
- CHOI Y.M., NOH D.O., CHO S.Y., SUH H.J., KIM K.M. et KIM J.M., 2006**-Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*. 39 : 756-761.
- COLVIN B.T., 2004**-Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis*. 87(1) : 43-46.
- CONFORTI F., SOSA S., MARRELLI M., MENICHINI F., STATTI G. A., UZUNOV D., TUBARO A. ET LOGGIA R. D., 2008**-In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 116(1) : 144-151.
- COWAN M.M., 1999**-Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4) : 564-582.
- CROZIER A., JAGANATH I.B. et CLIFFORD M.N., 2009**-Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26(8) : 1001-1043.
- CROZIER S. et WOIMANT F., 2007**-Infarctus cérébral grave: quelle prise en charge ? Acute management of severe ischemic stroke. *Réanimation*. 16 : 441- 451.
- CUSHNIE T.P.T. et LAMB A.J., 2005**-Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5) : 343-356.
- D'ALESSANDRO L.G., DIMITROV K., VAUCHEL P. et NIKOV I., 2014**-Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black choke berry) wastes. *Chemical engineering research and design*. 92 : 1818–1826.
- DAGLIA M., 2012**-Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2) : 174-181.
- DANGOGGO S.M., FARUQ U.Z. et HASSAN L.G., 2002**-Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of *Pergularia tomentosa*. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 4 No. 2 : 8-11.
- D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R., GIOVANNINI C. et MASELLA R., 2007**-Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4) : 348-361.
- DAVID B.C. et SUDARSANAM G., 2013**-Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). *Journal of Acute Disease*; 222-225.

- DELORME J. et ROBERT A., 1997**-Mycologie médicale. Ed. DÉCARIE, Mont-Royal Québec. 184p.
- DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY K. et MAÏGA A., 2004**-Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R. Chimie*. 7 : 1073–1080.
- DIOUF P.N., STEVANOVIC T. et BOUTIN Y., 2009**-The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*. 30 : 297-303.
- DWORKIN M.M. et FALKOW S., 2006**-Proteobacteria: Gamma subclass. Ed. Springer, New York. 1248p.
- EBERLIN T., 1997**-Les infections microbiennes. Tome 1 Agents infectieux. Université NATHAN, Paris. 128p.
- EBRAHIMZADEH M.A., POURMMORAD F. et HAFEZI S., 2008**-Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. *Turkish journal of biology*. 32 : 43-49.
- ELAYARAJA A., MUTHUPANDI S., RADHAKRISHNAN M. et ABDUL RAHAMAN S., 2015**-*In vitro* antioxidant and Antibacterial Activity of Plant Extracts of *Pergularia extensa* Chiov. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. Volume 7, Issue 3, Article 20.
- ESCRIBANO-BAILON et SANTOS-BUELGA., 2003**-Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry. Cambridge. 383p.
- FALLEH H., KSOURI R., CHAIEB K., KARRAY-BOURAOUI N., TRABELSI N., BOULAABA M. et ABDELLY C., 2008**-Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies*. 331 : 372-379.
- FAVIER A., 2006**-Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 (6) : 390-396.
- FELLOUS A., 2003**-la station d'élevage de la Gazelle dorcas (*Gazelle dorcas*) dans le sud-ouest algérien. *II^{ème} Séminaire Antilopes Sahelo Saharienne*, 1-5 mai 2003, Agence Nationale pour la Conservation de la Nature, Agadir Maroc. 7p.
- FIGUEREDO G., 2012**-Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse doctorat université blaise pascal France. p : 20.

- FIORUCCI S., 2006**-Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice. 211p.
- FRANÇOIS Ramade, 2008**-Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité. Edition *Dunod*, Paris. 726p.
- FUKAI K., ISHIGAMI T. et HARA Y., 1991**-Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55 : 1895-1897.
- FUKUSHIMA Y., OHIE T., YONEKAWA Y., YONEMOTO K., AIZAWA H., MORI Y., WATANABE M., TAKEUCHI M., HASEGAWA M., TAGUCHI C. et KONDO K., 2009**-Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4) : 1253-1259.
- GEROTZIAFAST G.T., 2007**-Le test de génération de thrombine un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Hémostase*. 24 : 37-43.
- GHEDADBA N., HAMBABA L., AYACHI A., ABERKANE M.C., BOUSSELSA H. et OUELD-MOKHTAR S.M., 2015**-Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. 13(2) : 118-129.
- GIRARDEL J.M. et SAMAMA C.M., 2006**-Les nouveaux antithrombotiques : une thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir New anticoagulant agents: the present and the future. *Réanimation*. (15) : 117-123.
- GOHAR A.A., EL-OLEMY M.M., ABDEL-SATTAR E., EL-SAID M. et NIWA M., 2000**-Cardenolides and β -Sitosterol Glucoside From *Pergularia Tomentosa*. L. *Naturel product Science*. 6(3) : 142-146.
- GRIGORAŞ C.G., 2012**-valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse de doctorat de l'université d'Orléans et de l'université « vasile alecsandri » de bacău. pp : 103-105.
- HAGERMAN A.E., MULLER-HARVEY I. et MAKKAR H.P.S., 2000**-Quantification of tannins in tree foliage. *Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. Vienna. 26 p.
- HALLGAS B., PATONAY T., KISS-SZIKSZAI A., DOBOS Z., HOLLOSY F., EROS D., ORFI L., KÉRI G. et IDEI M., 2004**-Comparison of measured and calculated lipophilicity of substituted auronés and related compounds. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 801(2) : 229-235.

- HAMMICHE V. et MAIZA K., 2006**-Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 105 : 358–367.
- HAMMICHE V., MERAD R. et AZZOUZ M., 2013**-Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen, Springer-Verlag France, Paris. 300p.
- 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.
- HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R. et BOBILYA D.J., 2002**-Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 13 : 572–584.
- HELFT G. et LEGER P., 2009**-Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques What's new on antithrombotics ? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 58 : 230–235.
- HEMWIMON S., PAVASANT P. et SHOTIPRUK A., 2007**-Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Séparation and Purification Technology*. 54 : 44-50.
- HENEIDAK S., GRAYER R.J., KITE G.C. et SIMMONDS M.S.J., 2006**-Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae), *Biochemical Systematics and Ecology*. 34 : 575-584.
- HIFNAWY M.S., EL-SHANAWANY M.A., KHALIFA M.M., YOUSSEF A.K., et DESOUKEY S.Y., 2014**-Cardiotonic activity of *Pergularia tomentosa* different extracts, fractions and isolated compounds, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Volume 9, Issue 1 : 54-60.
- HMEYADA A., 2009**-Contribution à l'étude des plantes médicinales de Mauritanie. *Ann. Univ. Lomé (Togo)*, Tome XVII. pp. 9-27.
- 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 Land Snails, *International Journal of Pest Management*. 45 : 211–213.
- JENSEN R., 2002**-Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review*. 16(8) : 1-6.
- KABLAN B.J., ADIKO M. et ABROGUA D.P., 2008**-Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtamies en côte d'Ivoire. *Pharmacognosie*. 6 : 282-288.

- KAN Y., GOKBULUT A., KARTAL M., KONUKLUGIL B. et YILMAZ G., 2007-**Development and Validation of a LC Method for the Analysis of Phenolic Acids in Turkish *Salvia* Species. *Chromatographia*. 66(1) : 147-152.
- KAPER J.B., NATARO J.P., et MOBLEY H.L. 2004-**Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2(2) : 123-140.
- KEMASSI A., DAREM S., CHERIF R., BOUAL Z., SADINE S. E., AGGOUNE M. S., OULD EL HADJ-KHELIL A. et OULD ELHADJ M. D., 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.
- KHAN M.T.H., ATHER A., THOMPSON K.D. et GAMBARI R., 2005-**Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. 67(2) : 107-119.
- KOSAR M., DORMAN H.J.D. et HILTUNEN R., 2005-**Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem*. 91 : 525-533.
- KÜHNAU J., 1976-**The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Rev. Nutr. Diet*. 24 : 117-191.
- LACUT K., DELUC A., LE MOIGNE E. et MOTTIER D., 2008-**Existe-t-il un lien entre la maladie artérielle athéromateuse et la maladie veineuse thromboembolique?, *Médecine thérapeutique*. 14(1) : 32-36.
- LEMAOUI A., 2011-**Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L Algérienne. Mémoire de Magister. Université de Sétif. 100p.
- LEONI Jérôme, 2001-**Physiopathologie de l'athérosclérose-Mécanismes et prévention de l'athéromatose. Thèse de Docteur en Pharmacie, université de Franche-Comté. France. 123p.
- LEOPOLD A.J. et LOSCALZO J., 2009-**Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 47 : 1673–1706.
- LHULLIER A., 2007-**Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse. 171p.

LOCK O., CABELLO I. et DOROTEO V.H., 2006-Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*. 20 : 6-11.

MACHEIX J.J., FLEURIET A. et SARNI-MANCHADO P., 2006-Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, *Lavoisier*, pp. 1-28.

MAISUTHISAKUL P., PASUK S. et RITTHIRUANGDEJ P., 2008-Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food Composition and Analysis*. 21(3) : 229-240.

MAIZA K., BRAC DE LA PERRIERE R.A. et HAMMICHE V., 1993-Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. *Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique*. Actes du 2^e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg. pp : 196-171.

MAJOB F., KAMALINEJAB M., GHADERI N. et VAHIDIPOUR H.R., 2003-Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of pharmaceutical Research*. 2(2) : 77-82.

MANALLAH A., 2012-Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Magister. Université de Sétif. 122p.

MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. et KEFALAS P., 2005-Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry*. 89 : 411-420.

MARTIN S. et ANDRIANTSITOHAINA R., 2002-Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 : 304-315.

MERGHEM R., JAY M., VIRICEL M.R., BAYET C., et VOIRIN B., 1995-Five 8-C-enzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiata). *Phytochemistry*. 38 : 637-640.

MERKEN H.M. et BEECHER G.R., 2000-Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48(3) : 577-599.

MICHEL T., 2011-Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse doctorat Université Orléans. 261p.

- MOURE A., CRUZ J. M., FRANCO D., MANUEL DOMINGUEZ J., SINEIRO J., DOMINGUEZ H., NUNEZ M. J. et CARLOS PARAJO J., 2001**-Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2) : 145-171.
- NASSIRI-ASL M. et HOSSEINZADEH H., 2009**-Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*. 23(9) : 1197-1204.
- NEUZINGER H.D., 1996**-African Ethnobotany: Poisons and Drugs: Chemistry, Pharmacology, Toxicology, Edition: *HAPMAN ET HALL*, Germany. pp. 246-248.
- NOLLET L.M.L. et TOLDRA F., 2013**-Food Analysis by HPLC, Third Edition, CRC Press. *Taylor & Francis Group*, London. 1063p.
- OLOYEDE O.I., 2005**-Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of nutrition*. 4 : 379-381.
- OULD EL HADJ M.D., HADJ-MAHAMMED M. et ZABEIROU H., 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 et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, augmentée. Edition: CNRS, Paris. 662p.
- ÖZGÜVEN M. et TANSI S., 1998**-Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish journal of agriculture and forestry*. 22 : 537-542.
- PANAIVA L., 2006**-Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter. pp. 2-24.
- 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.
- PERCIVAL S., CHALMERS R., EMBREY M., HUNTER P., SELLWOOD J. et WYN-JONES P., 2004**-Microbiology of waterborne diseases. Edition: Elsevier Academic Press, Amsterdam. 480p.
- PERONNY S., 2005**-La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat. Muséum national d'histoire naturelle, France. 151p.
- PIACENTE S., MASULLO M., DE NÈVE 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.

- PINCEMAIL J., CILLARD J., NEVE J. et DEFRAIGNE J.O., 2014**-Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma : une revue critique. *Annales de biologie clinique*. 72(4) : 413-421.
- PINELO M., LAURIE V.F. et WATERHOUSE A.L., 2006**-A Simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 : 2839-2844.
- POUX M., COGNET P. et GOURDON C. 2010**-Génie des procédés durables, du concept à la concrétisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris.
- QUIDEAU S., DEFFIEUX D., DOUAT-CASASSUS C. ET POUYSEGU L., 2011**-Plant polyphenols : Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*. 50(3) : 586-621.
- RACHED W., 2009**-Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Mémoire de magister en biochimie végétale appliquée. Université d'Oran Es-Sénia. 118p.
- RAHMAN M.A., SULTANA R., BIN EMRAN T., ISLAM M.S., RAHMAN M.A., CHAKMA J.S., RASHID H.U. et HASAN C.M., 2013**-Effects of organic extracts of six Bangladeshi plants on *in vitro* thrombolysis and cytotoxicity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 30(13) : 13-25.
- REZAIRE A., 2012**-Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse doctorat Université des Antilles et de la Guyane. 208p.
- ROUESSAC F., ROUESSAC A. et CRUCHE D., 2004**-Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition; *Dunod*, Paris. 457p.
- SAKTHIPRIYA P. et VIDHYA R., 2015**-Phytochemical and in-vitro thrombolytic activity of *Pergularia deamia* (forsk.) stem. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(5) : 1325-1337.
- SANCHEZ-MORENO C., 2002**-Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems; *International Journal of Food Science and Technology*. 8 : 121-137.
- SARTORI-THIEL A., 2003**-Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. Thèse de doctorat en Sciences et agronomie. Chimie, Avignon . 177p.
- 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.

- SCHOFIELD P., MBUGUA D.M. et PELL A.N., 2001**-Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91 : 21-40.
- SCHULZ E., ANTER E. et KEANEY J.P., 2004**-Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem.* 11 : 1093-1104.
- SHEDED M.G., PULFORDB 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.
- SPIGNO G. et DE FAVERI D.M., 2007**-Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering.* 78 : 793-801.
- ST-PIERRE F., 2012**-caractérisation physico-chimique de bois et d'écorces de *Betula alleghaniensis* et *Acer saccharum* de différentes vigueurs. Mémoire du grade de Maître ès sciences, Université Laval. 76p.
- TORRES DE PINEDO A., PEN ALVER P. et MORALES J.C., 2007**-Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relation ship. *Food Chemistry.* 103 : 55-61.
- TRIPODI A., 2009**-Tests of Coagulation in Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 13 : 55-61.
- TSAO R., 2010**-Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2 : 1231-1246.
- UDENIGWE C.C., RAMPRASATH V.R., ALUKO R.E. et JONES P.J.H., 2008**-Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews.* 66(8) : 445-454.
- ULANOWSKA K., MAJCHRZYK A., MOSKOT M., JAKÓBKIEWICZ-BANECKA J. et WĘGRZYN G., 2007**-Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia.* 62 : 132-135.
- USMANI S., ARSHAD H. et FAROOQUI A.H.A., 2013**-Determination of infochemicals, phytochemical screening and evaluation of antioxidant potential of *Digera muricata*. *Der Pharmacia Lettre.* 5(2) : 3-4.
- VAN DELDEN C. et IGLEWSKI B.H., 1998**-Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases.* 4 : 551-560.
- VOGLER E.A. et SIEDLECKI C.A., 2009**-Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials.* 30 : 1857–1869.

WAGNER H. et BLADT S., 1996-Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas (2nd Ed). *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg. pp : 258-261.

WONG C.C., LI H.B., CHENG K.W. et CHEN F., 2006-A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97 : 705-711.

XIA E.Q., DENG G.F., GUO Y. J. et LI H.B., 2011-Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences.* 11(2) : 622-646.

YAKUBU R., MUSA JIBRIL F., LUKMAN A. et SHEIKH F., 2015-Trends for Antioxidant Power of Phytochemicals from *Pergularia tomentosa* L. (Asclepiadacea) Whole Plant. *Scholars Academic Journal of Pharmacy.* 4(2) : 74-80.

Références électroniques

<http://fr.tutiempo.net/climat/algerie.html>

OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2012-Les 10 principales causes de mortalité dans le monde. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/. © OMS 2015.

OMS, 2014-Premier Rapport de l'OMS sur la Résistance aux Antibiotiques: Une Menace Grave d'Ampleur Mondiale (www.who.int).

Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional)

Le présent travail a pour objectif l'étude d'une des plantes d'intérêt médicinal dans le Sahara septentrional algérien, en l'occurrence *Pergularia tomentosa* provenant de quatre sites différents. Les échantillons choisis sont étudiés à travers leur contenant qualitatif et quantitatif en composés phénoliques, suivi d'une évaluation *in vitro* des activités antioxydante, antimicrobienne et anticoagulante de ces mêmes composés.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence divers métabolites secondaires dans les trois parties de la plante dont des tanins, des saponosides, des terpènes, des alcaloïdes, des stérols, des flavonoïdes et des polyphénols. Ils ont également montré que les feuilles sont les plus riches en ces métabolites secondaires.

La teneur en composés phénoliques, de nos plantes, est comprise entre $46,57 \pm 0,07$ et $5,15 \pm 0,07$ mg EAG/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes a révélé que l'extrait butanolique du site de Negrine est le plus riche avec $54,48 \pm 0,3$ mg ER/g d'extrait. L'estimation de la quantité de tanins condensés montre que l'extrait brut de Méguibra est le plus riche avec un ordre de $61,06 \pm 0,22$ mg EC/g d'extrait.

L'analyse qualitative des différents extraits par chromatographie, sur couche mince et liquide à haute performance (HPLC), a révélé leur richesse en composés phénoliques et a nous mené vers la réalisation des profils phénoliques qui se sont avérés similaires pour les différents sites étudiés.

L'évaluation de l'activité antioxydante, effectuée par deux méthodes (la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH), a révélé une réponse antioxydante considérable. Les résultats varient significativement d'un site à un autre. Cette activité présente une bonne corrélation avec les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré une activité intéressante sur les différentes souches testées. Tandis que l'étude de l'activité anticoagulante n'a montré aucun résultat significatif.

Mots clés: *Pergularia tomentosa*, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anticoagulante.

Contribution to the physico-chemical and biological characterization of *Pergularia tomentosa* extracts harvested from four different Saharan sites (northern Sahara)

The present work aims to study one of the medicinally interesting plants in the Algerian northern Sahara, in the circumstance *Pergularia tomentosa* from four different sites. The selected samples are studied through their qualitative and quantitative composition of phenolic compounds, followed by an *in vitro* evaluation of the antioxidant, antimicrobial and anticoagulant activities of these same compounds.

The phytochemical tests realized have highlighted various secondary metabolites in the three parts of the plant including tannins, saponins, terpenes, alkaloids, sterols, flavonoids and polyphenols. They also showed that the leaves are the richer in these secondary metabolites.

The content of phenolic compounds, in our plants, is between $46,57 \pm 0,07$ and $5,15 \pm 0,07$ mg EAG/g of extract. The dosage of flavonoids revealed butanolic extract that from the site of Negrine is the richest with $54,48 \pm 0,3$ mg ER/g of extract. The estimated amount of condensed tannins shows that the crude extract of Méguibra is the richest in an order of $61,06 \pm 0,22$ mg EC/g of extract.

The qualitative analysis of different extracts by chromatography, thin layer and high performance liquid (HPLC) revealed their richness in phenolic compounds and led us towards achieving phenolic profiles which were similar for the different studied sites.

The evaluation of the antioxidant activity, carried out by two methods (iron reduction and scavenging of the free radical DPPH) revealed a considerable antioxidant response. The results vary significantly from one site to another. This activity correlates well with the levels of total polyphenols and flavonoids.

The results of the antimicrobial activity showed interesting activity on the various strains tested. While the study of the anticoagulant activity showed no significant result.

Keywords: *Pergularia tomentosa*, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticoagulant activity.

المساهمة في تحديد المواصفات الفيزيوكيميائية والبيولوجية لمستخلصات *Pergularia tomentosa* مقتطفة من أربعة مواقع صحراوية مختلفة (الصحراء الشمالية)

يهدف هذا العمل إلى دراسة إحدى النباتات الطبية في الصحراء الشمالية الجزائرية و هي نبتة العلقة *Pergularia tomentosa* المقطوفة من أربع مواقع مختلفة. وتمت دراسة العينات المختارة من خلال المحتوى الكمي و النوعي للمركبات الفينولية، و تقييم نشاطها المضاد للأكسدة، و المضادة للميكروبات وكذا المضادة للتخثر.

وقد أبرزت تجارب الكيمياء النباتية تواجد مختلف المركبات الإيضع الثانوي في الأجزاء الثلاثة من النبتة : العفص، السابونينات، التربينات، القلويدات، السترول، الفلافونويدات والبوليفينولات. وأظهرت أيضا أن الأوراق هي الأكثر وفرة من هذه المركبات.

المحتوى الفينولي لأوراق هذه النباتات تتراوح بين $46,57 \pm 0,07$ و $5,15 \pm 0,07$ ملغ EAG/غرام من المستخلص. وأظهر التحليل الفلافونويدي أن مستخلص البينانول للنبتة لموقع 'نقرين' هو الأغنى، بكمية تقدر بـ $54,48 \pm 0,3$ ملغ ER/غرام من المستخلص. أما كمية العفص المكثف للمستخلص الخام لموقع 'المقبيرة' كان هو الأغنى بـ $61,06 \pm 0,22$ ملغ EC/غرام من المستخلص.

وكشف التحليل النوعي للمقتطفات بطريقة الكروماتوغرافيا CCM و CLHP ، ثرائها من المركبات الفينولية ، و أظهر التسجيل الكروماتوغرافي الفينولي ، تماثلا شكليا لمختلف المواقع المدروسة.

و تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين ، الأولى إرجاع الحديد ، والثانية احتباس الجذر الحر DPPH. وكشفت النتائج عن استجابة معتبرة ضد الأكسدة. كما تختلف النتائج بشكل كبير من موقع إلى آخر. وهذا النشاط لديه علاقة جيدة مع محتويات إجمالي البوليفينول والفلافونويدات.

نتائج النشاط المضاد للميكروبات أظهرت نشاطا هاما على مختلف السلالات التي تم اختبارها. في حين أن دراسة النشاط المضاد للتخثر لم يعط أي نتيجة تُذكر.

كلمات البحث: *Pergularia tomentosa* ، مركبات الفينول، الفلافونويدات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للتخثر.

Annexe

Matrice de corrélation

	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins	IC50 DPPH	mg EAA/g FRAP	TP	TCK	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Polyphénols totaux	1,000	0,443	-0,130	-0,692	0,761	0,273	0,306	-0,087	-0,040	-0,119	-0,056
Flavonoïdes	0,443	1,000	0,457	-0,594	0,526	0,555	0,617	0,305	0,113	0,094	-0,177
Tanins	-0,130	0,457	1,000	0,119	-0,177	0,479	0,703	0,332	0,307	0,358	0,017
IC50 DPPH	-0,692	-0,594	0,119	1,000	-0,803	0,051	-0,022	-0,086	0,039	0,022	0,108
mg EAA/g FRAP	0,761	0,526	-0,177	-0,803	1,000	0,251	0,163	-0,063	-0,182	-0,123	-0,148
TP	0,273	0,555	0,479	0,051	0,251	1,000	0,817	0,090	0,186	0,096	-0,151
TCK	0,306	0,617	0,703	-0,022	0,163	0,817	1,000	0,269	0,270	0,286	-0,103
<i>E. coli</i>	-0,087	0,305	0,332	-0,086	-0,063	0,090	0,269	1,000	0,688	0,738	-0,135
<i>P. aeruginosa</i>	-0,040	0,113	0,307	0,039	-0,182	0,186	0,270	0,688	1,000	0,777	-0,332
<i>S. aureus</i>	0,119	0,094	0,358	0,022	-0,123	0,096	0,286	0,738	0,777	1,000	-0,264
<i>C. albicans</i>	-0,056	-0,177	0,017	0,108	-0,148	-0,151	-0,103	-0,135	-0,332	-0,264	1,000