

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique**

**Université Kasdi Merbah-Ouargla**

**Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière**

**Département de Chimie**



**Mémoire**

**Présenté pour l'Obtention du diplôme de Master Académique**

**Spécialité: Chimie**

**Option: Chimie des produits naturels**

**Par: ABID Asma; TOUAHRIA Tatou**

**Thème:**

**Etude phytochimique et activité biologique d'une plante  
médicinale appartenant à la famille des Asclepiadaceae dans  
la région du sud d'algerie**

*Soutenu le: 11/06 / 2018*

**Devant le jury:**

<b>BOUZIANE Mebarka</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Présidente</b>
<b>SMARA Ouanissa</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>RAHMANI Zehour</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Rapportrice</b>

**Année universitaire: 2017/2018**

## *Dédicace*

*"Qui parle sème qui écoute récolte."*

*"Les grandes choses ne sont pas réalisées par la force mais par la persévérance."*

*"La plus grande difficulté de l'éducation, c'est de transformer les idées en expérience."*

*"George Santayana"*

*- A peine nous venons de terminer la rédaction de notre mémoire de master nous voudrions très vite le défier avec une immense joie, un grand honneur et un grand cœur chaleureux.*

*- A mon père: TOUAHRIA Hamou en signe de mon profondes et affectueuses reconnaissance pour leur amour sans mesure. Tous les sacrifices, les soutien, les tolérances et les encouragements qu'il a bien voulu consentir pour moi.*

*-Tous les mots restent faibles pour leur exprimer mon sentiments et qu'il accepte seulement ces signes en guise de témoignage.*

*-A tous ma familles paternelles et maternelles:*

*Ma grande mère: LAHBAKI Zohra, ma grand père: TOUAHRIA Taher, ma belle mère: TOUAHRIA Assiya, mes soeurs: Tinhinane et Fatima Zohra, mon frère: Mohamed Hassen Taher, à mes oncles, mes tantes et mes cousins*

*- En fin, à tous mes ames: Asma, Asma, Oumaima, Safa, Latifa et Oumaima, à mon collègues changeaient et reconnaissances.*

*"Le bébé qui apprend à marcher tombera plusieurs fois mais un jour, il marchera."*

*Chère encadreur Mlle Rahmani Zehour:*

*"C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre mémoire de master.*

*Veillez trouver, chère encadreur: Mlle Rahmani Zehour le témoignage de notre grande reconnaissance et notre profond respect .bon santé - heureux et joie dans ta vie.*

*Merci, Merci au fond de nos coeurs. "Mlle Rahmani Zehour -vous avez construit une maison qu'on peut pas la détruit et on ne la vend pas."*

# *TATOU*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mon très cher père MAHMOUD*

*A la plus chère au monde, ma mère NOURA*

*Qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite. J'espère qu'un jour je  
pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu  
leur prête bonheur et longue vie.*

*A mes sœurs ZINEB et MABROUKA*

*A mes frères ALI ; BACHIR et MOUHAMED*

*A mes belles sœurs : DJOHAINA ;*

*TATOU ; ASMA et LAILA*

*A ma grande mère Khadra*

*A mes tantes et mes oncles*

*A toutes Les membres des familles ABID et DIDA*

*A tous mes amis et collègues et surtout*

*OUMAYMA ; SAFA ; IMANE ; MOUNA ; NOUSAIBA et CHAIMA.*

*A toute personne qui me connaît*

***ASMA***

## *Remerciements*

*A l'issue de ce travail, nous remercions en premier lieu le bon dieu de nous avoir donné la force, la patience et le courage de le mener en terme. Ce travail a été réalisé au laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (VPRS) de l'université Kasdi Merbah Ouargla (Algérie), sous la direction de Dr. RAHMANI Zehour.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement RAHMANI Zehour qui nous a permis de bénéficier de son encadrement: Les conseils qu'il nous a prodigué la patience, la confiance, qu'il nous a témoigné ont été déterminants dans la réalisation de notre mémoire.*

*A cette même occasion je tiens à remercier les enseignantes: Dr. SMARA Ouanissa et Dr. BOUZIANE Mebarka pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.*

*Nous aimerons également exprimer notre gratitude à tous nos professeurs de graduation de l'université de Ouargla, un grand merci pour vous nos professeurs: DENDOUGUI Houcine, HADJADJ Mohamed, SAIDI Mokhtar. Nous remercions beaucoup BELFAR Mohamed Lakhdar, DEKMOUCHE Messouda, BELGUIDOUM Mehdi nos collègues dans le laboratoire de VPRS surtout BELFAR Assia, BENSASSI Chaima, RAHMANI Zineb, DJEMOAI Djamilia et RAACHE Ali, aussi, les techniciens de laboratoire pédagogique: Hanane, Asma, Anissa, Ramdhane que dieu les bénisse*

*En fin, nous tenons à remercier tous ceux qui de près et de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*"Une bonne amie est difficile à trouver, difficile à perdre et impossible à l'oublier."*

## Sommaire:

Titre	Page
Dédicace.....	I
Remerciements.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des schémas.....	V
Liste Abréviations .....	vi
Sommaire.....	vii
Introduction générale.....	1
<b>Chapitre I: Partie théorique</b>	
I.1. Présentation de la région d'étude Vallée du M'Zab.....	3
I.2. La famille d'Asclepiadaceae.....	3
I.3. Position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	3
I.4. Appellation.....	4
a. Etymologie.....	4
b. Les noms traditionls de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	4
c. Description botanique de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	5
I. 5. Répartition géographique.....	6
I. 6. Usage traditionnel.....	6
I. 7. Usage Médicinal .....	7
I.8. Les travaux antérieurs.....	7
I.8.1. Les métabolites primaires.....	7
I.8.2. les métabolites secondaires.....	8
I.8.2.1. Etudes phytochimiques précédentes et principaux métabolites secondaires isolés.....	8
I. 8. 3. La composition minérale de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	12
I. 8. 4. Activités Pharmacologiques de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	12
I. 8. 4. 1. Toxicité.....	12
I. 8. 4. 2. Activité Antioxydante.....	13
I. 8. 4. 3. Activité Cardiotonique.....	13
I. 8. 4. 4. Activité Cytotoxique.....	13
I. 8. 4. 5. L'activité molluscicide.....	13
<b>Chapitre II: Matériels et méthodes</b>	
II. 1. Préparation des échantillons .....	14
II. 2. Screening phytochimiques.....	14
II. 2. 1. Test des flavonoïdes.....	14
II. 2. 2. Test de stéroïdes.....	14
II. 2. 3. Test des tanins.....	14
II. 2. 4. Test des saponines.....	14
II. 2. 5. Test des terpenoïdes .....	15
II. 2. 6. Test des composés réducteurs .....	15
II. 2. 7. Test des alcaloïdes .....	15
II. 2. 8. Test des protéines.....	16
II. 2. 9. Test des triterpènes.....	16
II. 2. 10. Test de quinone libre.....	16
II. 2. 11. Test des Cardénolides.....	16
II. 3. Extraction des composés phénoliques.....	16

II.4. Etude quantitative.....	18
II. 4. 2. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content).....	18
II. 4. 3. Dosage des flavonoïdes.....	19
II. 4. 4. Dosage des tanins condensé .....	19
II.5. Activité antioxydante.....	20
II.5.1. Test de piégeage du radical DPPH• .....	20
II.5.2. Teste de capacité antioxydante totale (TAC).....	21
II.6. Etude qualitative.....	21
II.6.1. Analyse par chromatographie sur couche mince: CCM .....	21
II.6.2 Techniques chromatographiques de séparation .. .....	25
II.6.2.1. Analyse par chromatographie papier bidimensionnel CP. . . . .	25
II.6.2.2. Analyse par chromatographie papier CP monodimensionnel.....	25
II.6.3. La chromatographie sur colonne.....	26
II.6.4. Spectres UV-Visible des flavonoïdes.....	28
II.6.4.1. Etude spectrales des flavonoïdes.....	28
II.6.4.2. Les séries spectrales.....	30
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>	
III.1. Tests phytochimiques .....	31
III.2. Extraction des composés phénoliques .....	32
III.3. Analyse quantitative.....	33
III.3.1. Dosage de polyphénols totaux .....	33
III.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	34
III.3.3. Dosage des tanins condensés.....	36
III.4. Activité antioxydante.....	38
III.4.1 Test de piégeage du radical DPPH•.....	38
III.4.2. Teste de capacité antioxydante totale (TAC).....	41
III.5. Corrélation.....	45
III.6. Analyse chromatographique par chromatographie sur couche mince (CCM analytique).....	46
III.7. La chromatographie sur papier.....	47
III.7.1. Les flavonoides isolés de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	50
III.7.1.1. Identification structurale des flavonoides isolés.....	52
III.8. Les composés isolés de <i>Pergularia tomentosa L.</i> par chromatographie colonne CC.....	56
Conclusion .....	58
Références.....	60

## Liste des figures :

N°	Figure	Page
<b>Chapitre I: Partie théorique</b>		
1	Fleurs, feuilles et les fruits de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	4
2	Les différents organes de <i>Pergularia tomentosa</i> L .....	5
3	Distribution de <i>Pergularia tomentosa</i> L. dans le monde.....	6
4	Structure des cardénolides isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	9
5	Structure des flavonols isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	10
6	Structure des Triterpenes isolés à partir de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	11
<b>Chapitre II: Matériels et méthodes</b>		
1	Protocole d'étude spectrale des flavonoïdes en présence des différents réactifs.....	29
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>		
1	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	33
2	Teneurs en polyphénols totaux.....	34
3	Courbe d'étalonnage la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	35
4	Teneurs en flavonoïdes totaux.....	35
5	Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	36
6	Teneurs en tanins condensés.....	37
7	Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extrait du <i>P. tomentosa</i> L.....	39
8	Courbes représentants le pouvoir réductrice de les extraits de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	43
9	Révélation sous une longueur d'onde de 365 nm et 254nm.....	46
10	Révélation par le réactif de vanilline sulfurique.....	47
11	Papier monodimensionnel Dans le système BWA.....	48
12	Papier monodimensionnel Dans système aqueuse.....	48
13	Papier bidimensionnel de la phase Acétate.....	49
14	Papier bidimensionnel de la phase butanol.....	49
15	Teste de concentration de la phase butanolique.....	50
16	Le résultat de produit N°2 après 6ème migration.....	51
17	Les couleurs des spots après la purification sur le séphdex.....	51
18	Plaques CCM des déférents fraction révéle par la vaniline sulfurique.....	56
19	Plaque sous la lampe UV $\lambda = 365$ , $\lambda = 254$ de fractions 18 et 19.....	56
20	Plaque sous la lampe UV $\lambda = 365$ , $\lambda = 254$ de fraction 20-21 et 22.....	57
21	Plaque sous la lampe des 4 produits des fraction E et F .....	57

## Liste des tableaux :

N°	Tableau	Page
<b>Chapitre I: Partie théorique</b>		
1	Composition en métabolites primaires des différentes parties de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	7
2	Composition minérale de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	12
<b>Chapitre II: matériel et méthode</b>		
1	La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes.....	23
2	La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.....	24
3	Fractionnement la fraction n-butanolique de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	27
4	Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs.....	30
<b>Chapitre III: résultat et discussion</b>		
1	Screening chimique de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	31
2	Rendement et couleur des extraits.....	32
3	Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH.....	40
4	Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC).....	44
5	Les résultats de la corrélation linéaire entre les valeurs de CI <sub>50</sub> avec les contenu en polyphénol totaux, flavonique et tannique.....	45
6	Les résultats de la corrélation linéaire entre les valeurs de AEAC avec les contenu en polyphénol totaux, flavonique et tannique.....	45
7	les résultats de papier monodimensionnel.....	48
8	Les différentes fractions obtenues de <i>Pergularia tomentosa L.</i> , leurs fluorescences sous UV à 365nm, ainsi que leurs Rf sur papier Whatman n°3	50
9	Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des chalcones en présence des différents réactifs	55

## Liste des schémas

N°	Schéma	Page
<b>Chapitre II: Matériels et méthodes</b>		
1	Protocole d'extraction des polyphénols.....	17
2	Principe de la réduction du réactif de Folin Ciocalteu.....	18
3	Réduction du radical libre DPPH'.....	20
4	Schéma de fractionnement de la fraction n-butanolique.....	27
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>		
1	Structure de Naringénine.....	48
2	Structure d'Asebotin.....	49

## Liste des abréviations:

<b>P. tomentosa:</b> Pergularia tomentosa	<b>CC :</b> Chromatographie sur Colonne
<b>OMS:</b> Organisation Mondiale de la Santé	<b>F :</b> Feuilles
<b>ppm:</b> Partie par million	<b>T :</b> Tiges
<b>TPC:</b> Contenu Phénolique Totaux	<b>pH :</b> Potentiel d'Hydrogène
<b>TF:</b> Contenu Flavonoïdique Totaux	<b>Mec:</b> Méthyl éthyl cétone
<b>TC:</b> Contenu Tanninique	<b>F3PA:</b> Fraction 3 de produit A
<b>EAG:</b> Equivalant Acid Galique	<b>F6PC:</b> Fraction 6 de produit C
<b>EQ :</b> Equivalant Quercétine	<b>BAW:</b> Butanol, Acide acétique, Water
<b>EC:</b> Equivalant Catéchine	
<b>DPPH:</b> Diphényl Picryl Hydrazyl	
<b>BHT:</b> 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène	
<b>BHA:</b> 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole	
<b>Abs:</b> Absorbance	
<b>CI<sub>50</sub> :</b> Concentration d'inhibition à 50%	
<b>TAC:</b> Capacité Antioxydante Totale	
<b>AEAC:</b> Acide ascorbique Equivalent Antioxydant Capacité	
<b>CCM:</b> Chromatographie sur Couche Mince	
<b>UV-Vis:</b> UltraViolet – Visible	
<b>Rf :</b> Rapport frontal (CCM)	
<b>CP:</b> Chromatographie sur Papier	

## *Introduction générale*

---

## Introduction générale

Les plantes médicinales, le mot est commun, l'adjectif est banal, leur juxtaposition introduit un concept pas toujours aisé à définir, une plante est dite médicinale lorsque " au moins une partie possède de propriétés médicamenteuse " [1].

L'utilisation des plantes sont très comme une source principale de nourriture, et avec le temps l'homme à découvert qu'il peut les utiliser comme médicaments et remèdes afin de soigner les différentes maladies.

L'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes brutes ou préparées s'est considérablement élargie. L'organisation mondiale de la santé (L'OMS) estime que 80% de la population africaine ont toujours recours à la médecine traditionnelle pour les soins sanitaires[2]. L'Algérie, pays connu par ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte, environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques [3].

Le médicament à base de plantes est un "complexe" de molécules, issu d'une ou plusieurs espèces végétales. La première étape de la découverte d'un nouveau médicament est la mise en évidence d'un « principe actif ».

Dans une logique de stratégie des études des plantes médicinales; la valorisation ne s'arrête pas uniquement au niveau des connaissances ethnopharmacologiques et biologiques des plantes, mais l'étude phytochimique est obligatoire pour cerner l'ensemble des informations nécessaire à la valorisation.

L'objectif de notre contribution à ce travail de recherche consiste à la valorisation de la flore de la région de sud-est algérien par la recherche de composés qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique. Pour cela, une plante de la famille *Asclépiadacée* à savoir *Pergularia tomentosa* fait l'objet de notre étude.

Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle est présentée les aspects botaniques et phytochimiques de la plante et leur utilisation traditionnel et médicinale ainsi que quelques études antérieures sur cette plante comme les activités biologiques (antioxydante, cytotoxique... etc).

Le deuxième volet de notre travail concerne la partie expérimentale (deuxième chapitre) qui renferme un screening chimique de nos extraits, l'extraction des deux parties de la plante, et l'estimation de la teneur de ces extraits en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés ainsi que l'activité antioxydante par des méthodes spectrophotométriques.

En outre, nous utiliserons les techniques de séparation de quelques métabolites secondaires par les méthodes chromatographiques.

Enfin le troisième chapitre concerne les résultats de l'étude phytochimique et des tests antioxydantes sur les extraits ainsi que l'étude de la relation entre le contenu phénolique, flavonoidique, l'activité antioxydante de différents extraits. À la fin de ce chapitre, nous décrirons l'identification des composés isolés.

Le present travail est achevé par une conclusion générale dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées.

## *Chapitre I: Partie théorique:*

---

La plante de présente travail est récoltée à la région de vallée du M'Zab exactement à Zelfana, Voici les caractéristiques de cette vallée :

### **I.1. Présentation de la région d'étude Vallée du M'Zab**

Elle est située dans la wilaya de Ghardaïa, à environ 600 km au sud de la capitale Alger, et s'intègre dans la partie septentrionale de la plateforme saharienne à 32° 30' de latitude Nord et à 3° 45' de longitude . Elle est Connue par l'architecture spécifique de ses Ksour (noyaux historiques), classés monuments et patrimoines mondiaux par l'UNESCO depuis 1982, ainsi que pour son traditionnel et ingénieux système de partage d'eau des crues pour l'irrigation des palmeraies. Ses principales agglomérations sont Berriane, Guerrara, Ghardaïa, Zelfana, Metlili, Hassi F'hel et El-Goléa. Le territoire de la wilaya abrite environ 309.740 habitants répartis sur 86.560 Km<sup>2</sup> de surface[4].

### **I.2. La famille de *Asclepiadaceae***

Dans le présent compte, *l'Asclepiadaceae* sont traité en tant que famille, qui selon Schumann(1895), Bruyns et Forster (1991) et Liede et Alber(1994) est subdivisé en 3 sous-familles : *Periplocoideae*, *Secamonoideae* et *Asclepiadoideae*.

Cette vue taxonomique conservatrice a été adoptée, puisque c'est le système encore largement accepté entre les scientifiques et les amateurs. Cependant, comme a déjà implicite par des études morphologiques antérieures, les progrès de la recherche moléculaire suggère d'inclure chacun des 3 sous-familles dans *l'Apocynaceae* et d'abandonner *l'Asclepiadaceae*. Ce concepta été formellement transformé en taxonomie par Endress et Bruyns (2000) [5].

Les familles Apocynaceae et Asclepiadaceae sont principalement pantropicales / plantes subtropicales avec latex abondant et généralement avec des feuilles opposées. Ils ont des fleurs sympétriques cinq-mères et sont principalement pollinisées par les insectes. Dans cette famille on trouve les composés chimiques tels que les alcaloïdes et les cardénolides [39].

### **I.3. Position systématique de *Pergularia tomentosa***

**Règne:** plantae

**Sous règne :** Tracheobionta

**Embranchement:** Spermatophyte

**Sous- embranchement:** Angiosperme

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Asteridae

**Ordre :** Gentianales

**Famille :** Asclepiadaceae

**Genre :** Pergularia

**Espèce :** *Pergularia tomentosa*



**Figure I.01:** Fleurs, feuilles et les fruits de *Pergularia tomentosa* [11].

#### **I.4. Appellation**

Cette espèce est connue sous le nom : *Pergularia tomentosa*, elle possède des dénominations synonymes : *Daemia tomentosa* (L.) Pomel, *Telosma tomentosa* (L.) M.R. Almeida Fl.Maharashtra, *Daemia cordata* (Forssk.) R.Br. ex Schult [11].

##### **a. Étymologie de *Pergularia tomentosa***

- *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 [7].

##### **b. Les noms traditionnels de *Pergularia tomentosa***

**Nom vernaculaire:** Kalga

**Arabe:** le ghoulga, demya, leben el hamir

**Targui:** tashkat, dellakal, tellakh, sellaha

**Français :** Pergulaire

**Anglais:** Pergularia

**En Nigéria :** fatakko, malaiduwa, bakambi, damargu rafi, sallenke

**EnMauritanie** umu éjlud [11].

**En Tunisia:** Bou Hliba [10].

**En Algérie:** Ghoulga, tellakh, sellaha

### c. Description botanique de *Pergularia tomentosa*

*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. Le latex est toxique pour les chameaux dans l'erg algérien et le Sahara [6].

**La tige** : couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile 'tomentose à l'état jeune'

**Les feuilles** : Opposées, verticillées, ovales ou arrondies, en cœur à la base, caractérisée par l'absence des stipules et pétiole de 0,5 à 1,5cm de long.

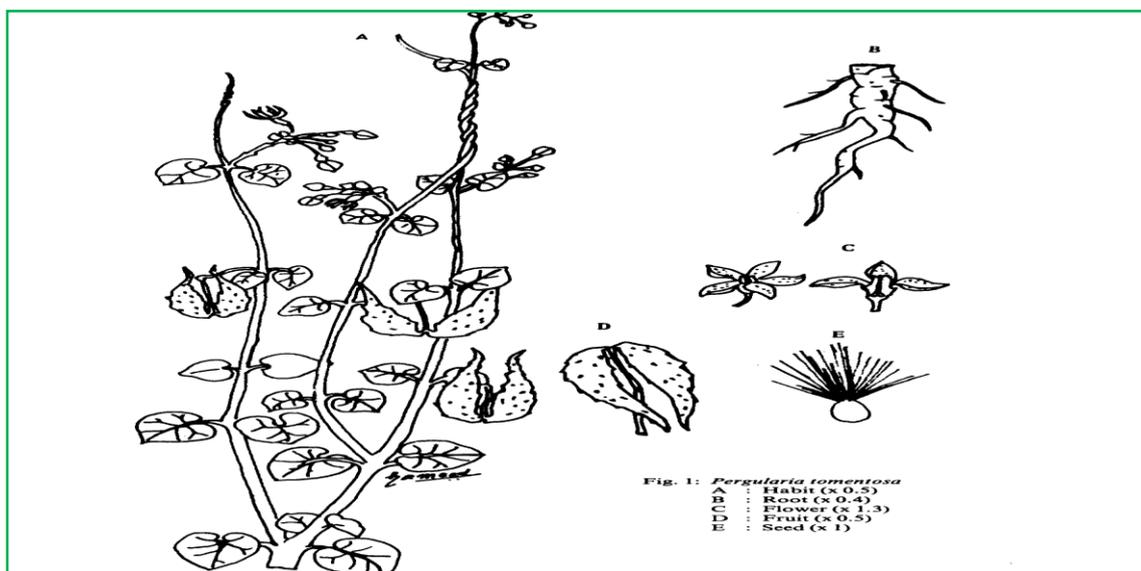
**L'inflorescence** : En grappes abondantes au bout de longs pédoncules

**Les fruits** : Composés de deux follicules, portent de petites pointes

**Les fleurs** : Bisexuées, régulières, parfumées ; 5-mères. Sépales et pétales plus ou moins soudés à la base. Corolle rotacée ou campanulacée, doublée d'une paracorolle à 5 pièces ' en général d'origine staminale. Etamines 5 à anthères sessiles, en général adhérentes au stigmate, souvent déhiscentes en pollinies .

**Les graines** : ovoïdes, aplaties, de 7-9 mm environ 6 mm, bords pales, à poils courts denses, munies d'une touffe de poils à une extrémité, d'environ 3 cm de long

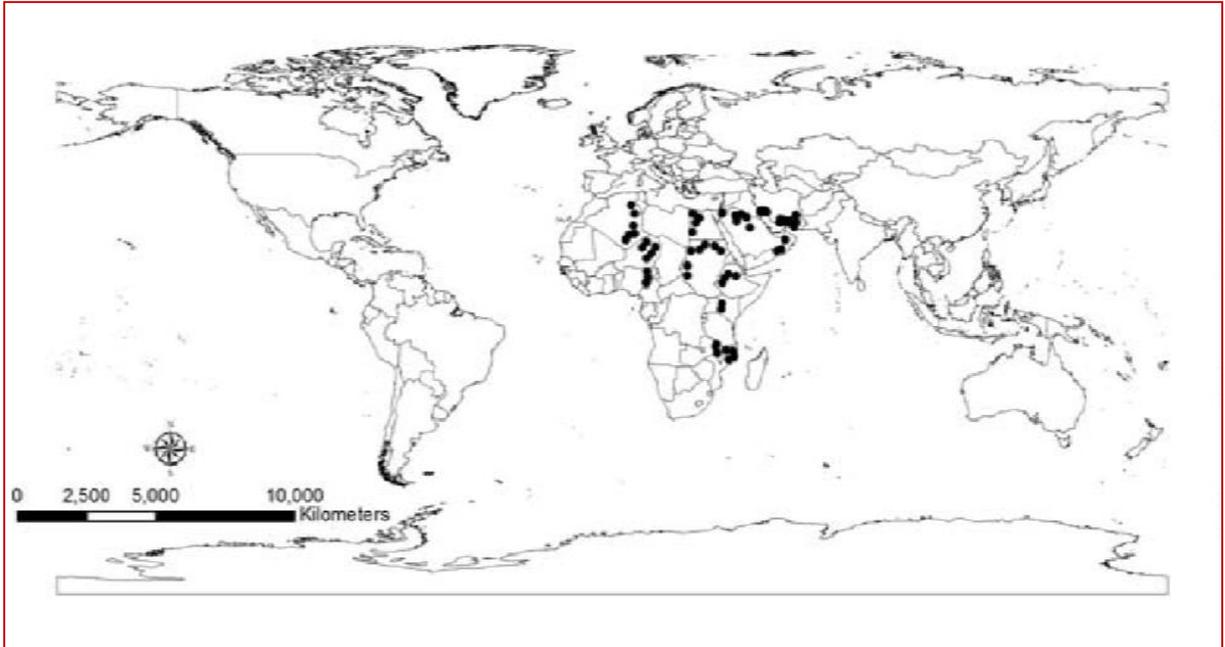
**Période de végétation** : Floraison en printemps [7].



**Figure I.02** : Les différents organes de *Pergularia tomentosa*L.

## I. 5. Répartition géographique :

Cette plante est largement distribuée dans l'Afrique (Soudan, Egypte, Ethiopie, Algérie, Niger et Kenya) et en Asie (Jordanie, Iran, Oman, Pakistan, Afghanistan, Arabie Saoudite)[8].



**Figure I.03:** Distribution de *Pergularia tomentosa* L. dans le monde.

## I. 6. Usage traditionnel

Cette plante est employée dans les remèdes traditionnels en tant qu'un antirhumatismal, laxatif, abortif et traitement des certains maladies de peau, asthme et bronchite. Cette plante également utilisée pour le traitement des frissons, des helminthiases, des allergies et de la constipation. Dans certains cas, on a signalé que le *Pergularia tomentosa* a été employé pour l'enlèvement de laine de la peau de certains animaux en particulier mouton [8].

En Egypte, la plante a été utilisée comme cataplasme, dépilatoire, laxatif, antihelminthique, et abortif. Le latex des tiges et des feuilles irrite la peau et les yeux et peut causer une inflammation [10].

Au Maroc, les feuilles sont appliquées sur les morsures de serpent et de scorpion.

En outre, il a été utilisé pour les tumeurs, les verrues et les maladies de la peau au Yémen [11].

En Algérie les feuilles et les fleurs sont utilisées comme traitement des angines, teigne, dermatose [12] et hypoglycémiant [4].

## I. 7. Usage Médicinal

Les parties les plus utilisables sont: Le latex, les feuilles et les racines qui sont généralement recueillies dans le printemps, sont préparés comme une infusion, décoction, poudre et mélangé avec d'autres plantes, et pris par voie orale ou utilisé à l'extérieur [11].

- Cette plante est utilisée pour le tannage, écrasée et étalée sur la peau. Elle fait tomber les poils rapidement. A cet effet on pile la plante et on étend la pâte ainsi obtenue sur la peau: après quelques heures de contact un simple grattage fait tomber très facilement les poils.
- En application, le lait contenu dans la plante fait sortir les épines de la peau.
- Cette plante est peu consommée à l'état vert parce qu'elle entraîne des intoxications
- L'augmentation de potassium alimentaire diminue la pression artérielle chez l'homme et réduit le risque d'accident vasculaire cérébral. Ainsi, le maintien d'un apport élevé en potassium peut être atteint en consommant les tiges et les racines de *P. tomentosa* [13].

## I.8. Les travaux antérieurs

L'étude phytochimique permet la détection des classes de composés existants dans les différents organes de la plante (racine, tige, pulpe, feuille, noyau).

Le métabolisme cellulaire est l'ensemble des réactions biochimiques qui permettent:

- ✓ le maintien de l'intégrité cellulaire (maintenance)
- ✓ et la multiplication cellulaire (croissance)

Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types: métabolites primaires et secondaires.

### I.8.1. Les métabolites primaires

Le métabolisme primaire regroupe toutes les voies de synthèse de composés indispensables à la croissance et au développement de la plante. Les métabolites primaires qui en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucres et polysaccharides...) [14].

**Tableau I.1:** Composition en métabolites primaires des différentes parties de *Pergularia Tomentosa* [13]

Organe végétal	Protéine %	Lipides (%)	Glucides (%)
Feuilles	6.39± 0.17	6.83 ± 0.76	53.27±1.75
Tiges	4.74±0.14	2.17± 0.76	56.92±1.27
Racines	3.35±0.48	2.76± 0.29	61.31±2.84

## **I.8.2. Les métabolites secondaires**

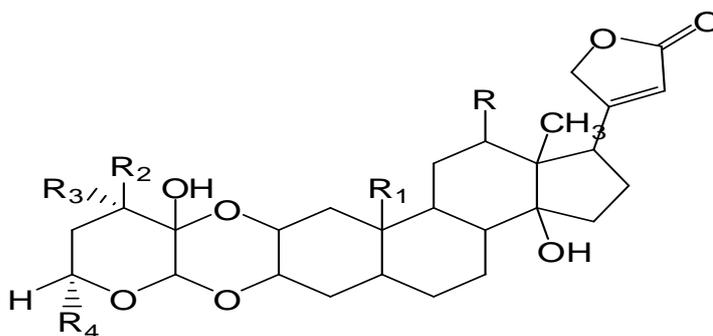
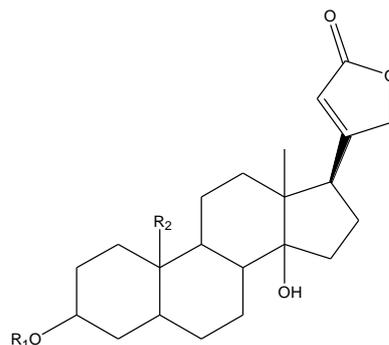
Le métabolisme secondaire regroupe les autres voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection contre les UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...) [14].

### **I.8.2.1. Etudes phytochimiques précédentes et principaux métabolites secondaires isolés**

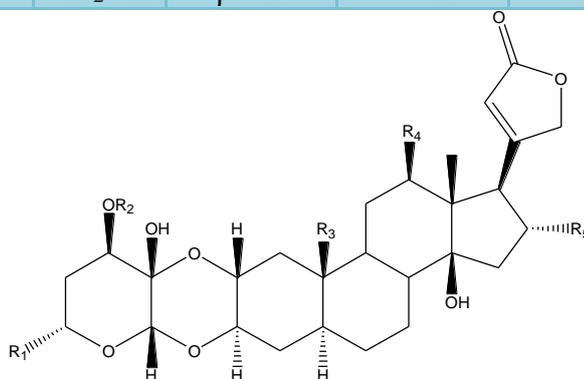
Vingt-cinq composés ont été isolés et identifiés de diverses parties du *P. tomentosa*. Les principaux métabolites secondaires ont été isolés dans cette espèce incluent les cardenolides, les cardenolides glycosidiques et les triterpènes de type taraxastérol. Un peu de ces composés ont été étudiés pour l'activité biologique [11], les structures identifiées sont résumées dans la figure I.4:

L'analyse phytochimique d'extrait de *Pergularia tomentosaa* a révélé la présence des glycosides cardiaques, glycosides de saponine, alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, stéroïdes anthraquinones et huile volatile [11].

Composé	R2	R1
Uzarigenin	CH <sub>3</sub>	H
Desglucouzarin	CH <sub>3</sub>	Glucose
Coroglaucigenin	OH	H

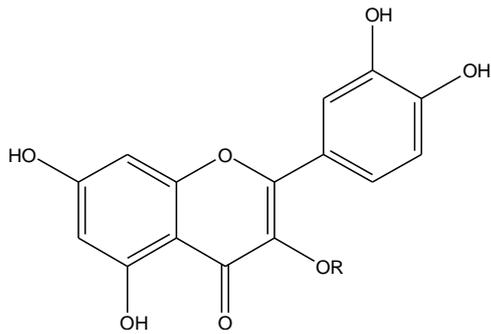


Composés	R	R1	R2	R3	R4
Calactin	H	CHO	$\beta$ OH	$\alpha$ H	CH <sub>3</sub>
Pergularotoside	OH	CHO	$\beta$ OH	$\alpha$ OH	CH <sub>2</sub> OH
Ghalakinoside	OH	CH <sub>2</sub> OH	$\beta$ OH	$\alpha$ OH	CH <sub>2</sub> OH



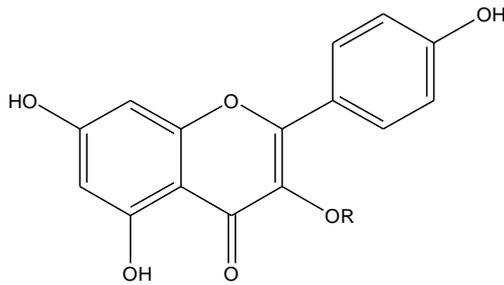
Composés	R1	R2	R3	R4	R5
3-O- $\alpha$ -D-glucopuranosylcalactin	Me	B-D-Glc	CHO	H	H
12dehydroxyghalakinoside	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>2</sub> OH	H	H
6- dehydroxyghalakinoside	Me	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H
Ghalakinoside	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H
Calactin	Me	H	CHO	H	H
6'-hydroxycalactin	CH <sub>2</sub> OH	H	CHO	H	H
6'-hydroxy-16Racetocalactin	CH <sub>2</sub> OH	H	CHO	H	OCOCH <sub>3</sub>
16R-hydroxycalactin	Me	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH
Pergularotiside	CH <sub>2</sub> OH	OH	CHO	OH	H
16 $\alpha$ -acetoxycaltropin	Me	H	CHO	H	OAc

**Figure I.04:** Structure des cardénolides isolés à partir de *Pergularia tomentosa* [7], [11].



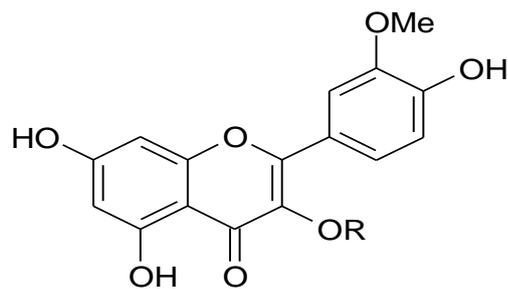
Quercetin malonylhexosides

Composés	R
Quercetine	H
Quercetin-3-O-Glucoside	Glucose
Quercetin-3-O-galactoside	Galactose



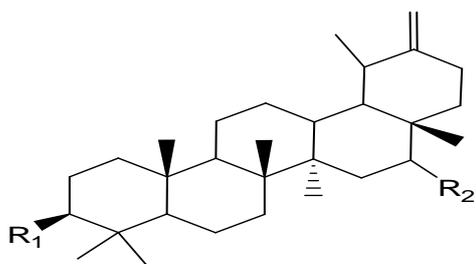
Kaempférol malonylhexosides

Composés	R
Kaempférol	H
Astragalin	Glucose
Trifolin	Galactose



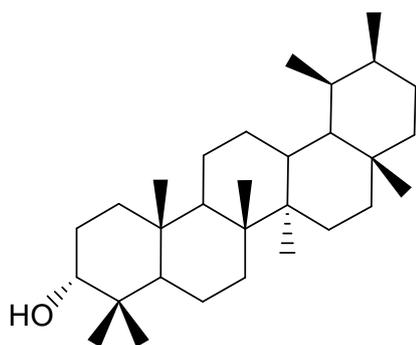
Malonylhexosides Isorhamnetine

**Figure I.05:** Structure des flavonols isolés à partir de *Pergularia tomentosa* [7].

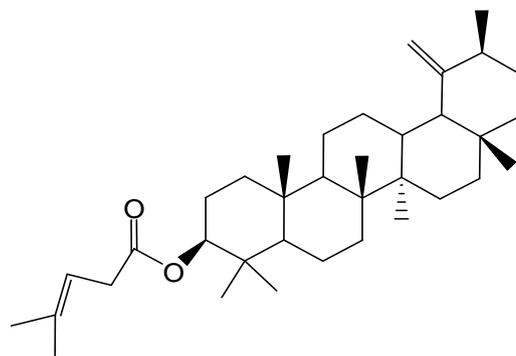


Composés	R1	R2
3-acetyltaraxasterol	OAc	H
3-taraxasterol	OH	H
Hydroxytaraxasterol-3-acetate	OAc	OH

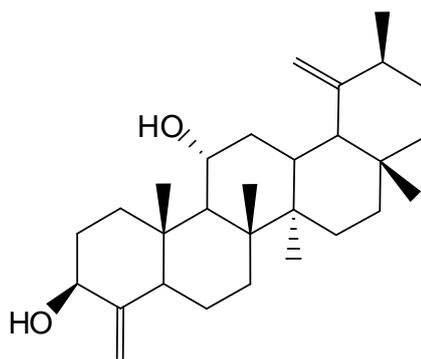
Taraxasterol



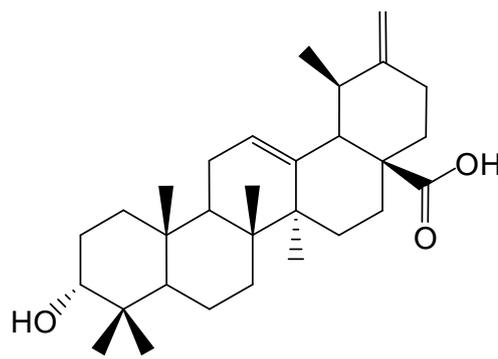
$\alpha$ -amyrin



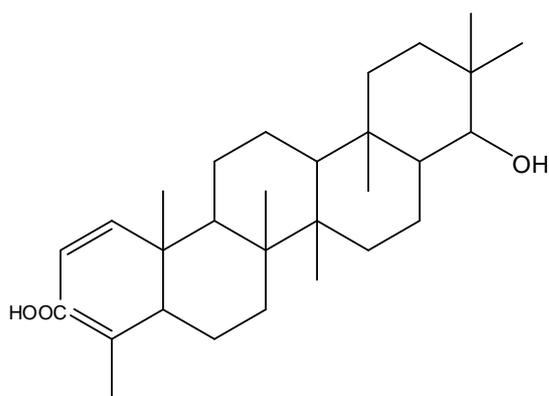
Pergularine A



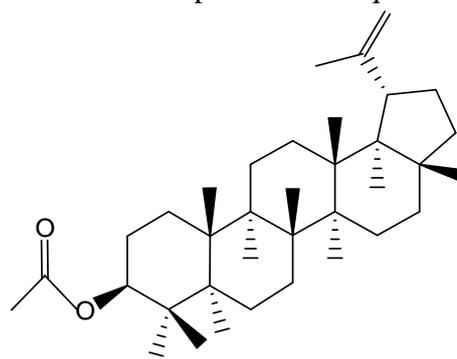
Pergularine B



Acide-3-epi-micromerique



Acide- $\alpha$ -hydroxy-3,4-secostict-4(23),1(2)-en-oique



Lupeol acetate

**Figure I.06:** Structure des Triterpenes isolés à partir de *Pergularia tomentosa* [11].

### I. 8. 3. La composition minérale de *Pergularia tomentosa*

Tableau I.2 : Composition minérale de *Pergularia tomentosa*

Organe Végétal	Phosphore (ppm)	Potassium (ppm)	Sodium (ppm)	Magnésium (%)	Calcium (%)
Feuilles [13]	1,85 ± 0,05	2,97 ± 0,210	4,13 ± 0,31	0,32 ± 0,06	0,25 ± 0,010
Racines [13]	7,07 ± 0,06	215,0 ± 10,00	2,03 ± 0,15	0,15 ± 0,030	0,16 ± 0,01
Tiges [13]	8,13 ± 0,06	167,30 ± 5,03	2,33 ± 0,15	0,25 ± 0,008	0,08 ± 0,003
Fruits [16]	/	384.8	56.2	77.29 ppm	477.6 ppm

La composition minérale de la plante montre une grande quantité de phosphore et de potassium dans les racines et les tiges. Des teneurs importantes de sodium, de magnésium et de calcium sont relevées dans les extraits des feuilles. Le magnésium est un micronutriment antioxydant et sa présence peut stimuler le système immunitaire et aider à éliminer les carences en Mg qui pourraient entraîner de graves troubles métaboliques. Cependant, il convient de noter que calcium en conjonction avec magnésium, chlore et les protéines sont impliqués dans la formation de l'os [13].

D'autre part, l'analyse par l'absorption atomique des fruits a montré la présence de potassium  $K^+$  et calcium  $Ca^{2+}$  en forte concentration (384,8 et 477,6 ppm respectivement). La présence importante de ces éléments peut contribuer à la toxicité de cette plante [16].

### I. 8. 4. Activités Pharmacologiques de *Pergularia tomentosa*

*Pergularia tomentosa*, une plante qui pousse sans être cultivé dans les régions méditerranéennes, est riche en différentes enzymes comme les polyphénols oxydases, la tyrosinase, la lipase, liopxygénase et L-asparginase. Il présente également des activités antioxydantes ainsi que l'activité antifongique contre *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* [17].

### **I. 6. 4. 1. Toxicité**

L'étude de la toxicité de cette plante montre que le composé ghalakinoside donne une toxicité la plus élevée suivie par la calactine avec la médiane des doses létales étant de 4,6 mg/kg et 5 mg / kg respectivement [11].

### **I. 8. 4. 2. Activité Antioxydante**

Les extraits méthanoliques et aqueux contenant de nombreux flavonoïdes exercent une activité antioxydante sur les radicaux DPPH•, les radicaux peroxy, les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène.

La méthode de piégeage de radical DPPH• a été utilisée pour détecter l'activité oxydante des racines, tiges, feuilles et extraits de fruits de *Pergularia tomentosa*. L'activité antioxydante la plus puissante a été détectée dans les extraits des feuilles et de fruits [11].

### **I. 8. 4. 3. Activité Cardiotonique**

Les extraits de cette plante ont montré cardiotonique activité. Hifnawy et *Coll.* ont rapporté que ghalakinoside a montré une augmentation de la force de contraction myocardique et la fréquence cardiaque a été affectée à des doses très élevées, ils ont également montré les changements dans la pression artérielle moyenne qui étaient réversible sauf à la dose létale de la calactine in vivo expériences sur des lapins [51].

### **I. 8. 4. 4. Activité Cytotoxique**

Huit glycosides cardénolides (6'-hydroxycalactin, 6'-hydroxy-16R-acetoxycalactin, 16R-hydroxycalactin, 3'-O-R-D-glucoopyranosylcalactin, 12-dehydroxyghalakinoside, 6-dehydroxyghalakinoside, ghalakinoside et calactin) ont été isolés à partir des racines de *Pergularia lomeniosa L.* pour étudier l'activité potentielle contre les cancers, ces composés testés in vitro ont montré l'inhibition de croissance de cellule de différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, et pour leur capacité à inhiber la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [18].

### **I. 8. 4. 5. L'activité 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), la valeur de DL<sub>50</sub> après 24 h de traitement était de 60,9 µg / escargot. Ces résultats expliquent l'utilisations possibles de cette plante contenant des cardénolides, comme molluscicide [19].

*Chapitre II : matériels et méthodes :*

---

## **II. 1. Préparation des échantillons**

Les feuilles et les tiges de *Pergularia tomentosa* L. ont été récoltées pendant le mois de novembre dans la région de Zelfana (wilaya de Ghardaia) et a été identifiée par Mr EDDOUD A. (botaniste à l'université de KASDI Merbah Ouargla).

Les organes de *Pergularia tomentosa* L. (tiges, feuilles) ont été séché à l'ombre et à l'abri de l'humidité et la lumière à température ambiante pendant un mois, après ont été coupé, le résidu sera utilisé dans les déférents analyses qualitatifs et quantitatifs.

## **II. 2. Screening phytochimiques**

10.22g et 10.00g des feuilles et des tiges respectivement ont été macéré dans un système 7/3 (MeOH/H<sub>2</sub>O) pendant 24 heures, après la filtration, l'extrait brute de chaque organe a conservé pour la réalisation des tests phytochimiques suivant :

### **II. 2. 1. Test des flavonoïdes**

A 1 ml de l'extrait brute, on ajoute 1 ml de acétate de plombe (10%), la formation d'une précipitation jaune indiqué la présence des flavonoïdes.

### **II. 2. 2. Test de stéroïdes**

Deux tests pour la confirmation du résultat ont été réalisés:

- 1- **Test de Salkowski** : 2 ml de l'extrait brute a été mélangé avec V=2ml de CHCl<sub>3</sub>, puis 2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré a été additionné, l'apparition d'une coloration rouge indiqué la présence des stéroïdes.
- 2- **Test de Librman Burchard** :2 ml de l'extrait brute a été dissoudre dans CHCl<sub>3</sub>, puis 2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré et 2ml de l'acide acétique ont été additionné, l'apparition d'une coloration verdâtre indiqué la présence des stéroïdes.

### **II. 2. 3. Test des tanins**

A 1ml d'extrait brute, on ajoute 0.5ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 1% . La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

### **II. 2. 4. Test des saponines**

Dans un tube à essai, on introduire 5ml d'extrait aqueuse et agité pendant quelques secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence de saponines.

## II. 2. 5. Test des terpenoïdes

5 ml d'extrait brute est ajouté à 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpenoïdes.

## II. 2. 6. Test des composés réducteurs

Dans un tube à essai a 1ml d'extrait brute, on ajoute 2ml de réactive de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), incubé l'ensemble pendant 8 min dans un bain marie bouillants.

L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

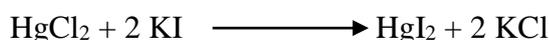
## II. 2. 7. Test des alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Wagner et Mayer.

2 ml de l'extrait brut est divisé en deux volumes égaux, puis 2 ml de HCl concentré a été additionné pour chaque extrait. 1 volume est traité par 1ml de réactive de Mayer, l'autre par 1ml de réactive de Wagner, chaque mélange est chauffé au bain marie. La formation d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

### Mécanisme de réaction [20]

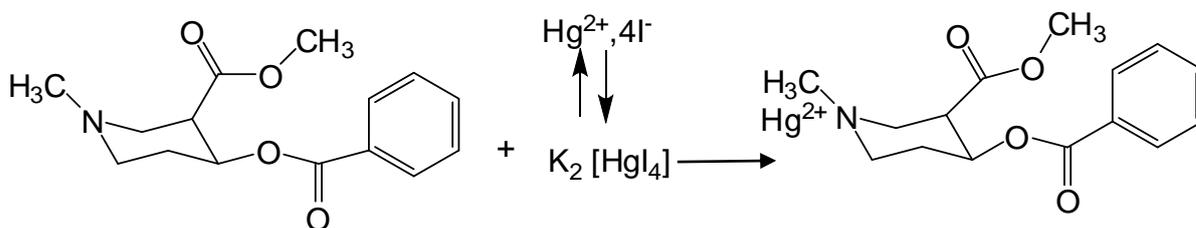
**Avec le réactif de Mayer :** L'iodure de potassium forme avec l'ion  $Hg^{2+}$  un précipité rouge-orangé  $HgI_2$  selon la réaction suivante :



Le précipité se dissout dans un excès de solvant en donnant l'ion complexe  $[HgI_4]^{-2}$  selon la réaction suivante:



Exemple :

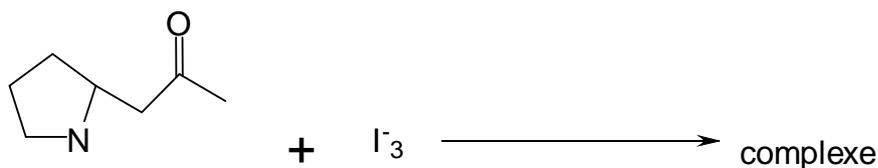


Avec le réactif de wagner :

Avec le réactif de Wagner: L'iode est peu soluble dans l'eau, l'ajout du KI permet d'augmenter sa solubilité. Il se forme l'ion  $I_3^-$  selon la réaction suivante :



Exemple :



## II. 2. 8. Test des protéines

### 1. Test de Biuret

A 3ml de l'extrait brut, 1ml de NaOH (4%) et 1ml de CuSO<sub>4</sub> (1%) a été additionné. Le changement de la couleur de la solution à violet ou rose indiqué la présence de la protéine.

### 2. Test de ninhydrine

A 3ml de l'extrait, 3 goutte de solution de acétate de Pb (5%) a été ajouté et chauffée dans un bain marine pendant 10 min. Le changement de la couleur de la solution à violet ou bleu indiqué la présence des acides aminés.

## II. 2. 9. Test des triterpènes

### 1. Test de Salkowaski

A 2ml de l'extrait, 5 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré a été ajoutl'apparition d'une coloration verdâtre indiqué la présence des tritérpenoides.

### 2. Test de Libremann burchard

A 2ml de l'extrait, 10 gouttes de anhydride acétique a été ajouté et mixé bien, puis 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré a été additionné, l'apparition d'une coloration verdâtre indiqué la présence des tritérpenoides.

## II. 2. 10. Test de quinone libre

Quelques gouttes de NaOH (1%) à sont ajoutées à 5 ml d'extrait. La coloration virant au jaune, rouge ou violet indique la présence de quinones libres [7].

## II. 2. 11. Test des Cardénolides

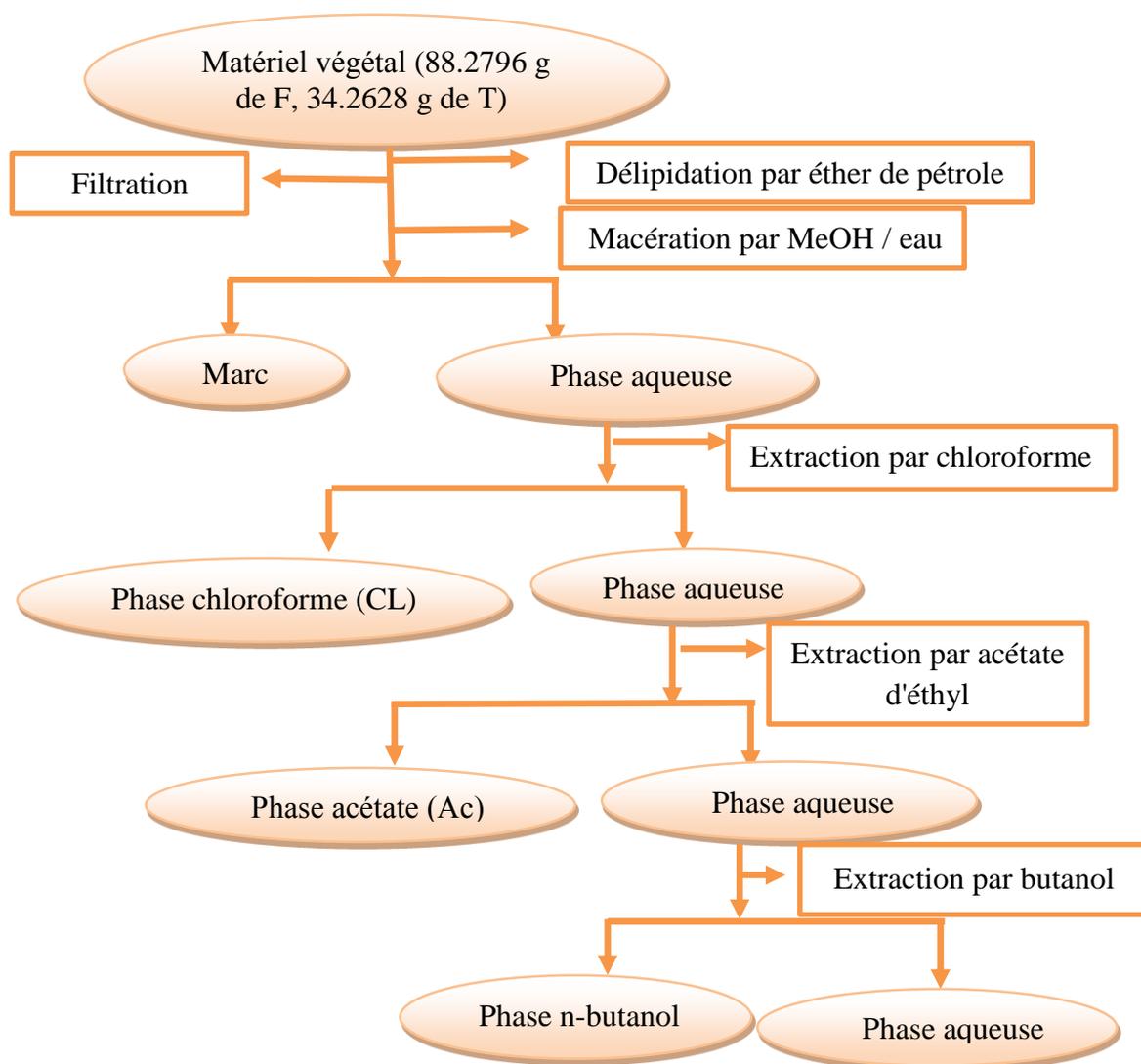
La détection des cardénolides glycosides se fait par l'ajout de 2 ml d'acide acétique glacial et une goutte de solution de FeCl<sub>3</sub> à 5 ml de chaque extrait mélangé avec 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. La présence de l'anneau brun sur l'interface est caractéristique de sucres désoxy desglycosides cardiaques [7].

## II. 3. Extraction des composés phénoliques

Dans notre étude l'extraction est réalisée selon le protocole d'extraction des polyphénols (schéma II.1). 88.2796g, 34.2628g de matériel végétal (feuilles, tiges respectivement) sont macéré dans l'éther de pétrole pendant 24 heure et conservés à l'abri de la lumière et à

température ambiante (pour la délipidation), puis a été filtrée. Les sédiments ont été séchés à l'ombre pendant quelques minutes, puis elles sont mises en contact avec un mélange de 250ml, 520ml (pour macérer les tiges et feuilles respectivement) d'eau distillée et méthanol (20/80 (v/v)) et laissé pendant 24 heures et conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'opération de la macération a été répétée trois fois, en renouvelant le solvant, pour augmenter la masse de l'extrait. Cette solution extractive a été filtrée puis évaporée à sec (37 °C), 41 ml et 60 ml d'eau chaud a été ajouté à le résidu obtenu (tiges feuilles respectivement) et laissé ou repos pendant une nuit.

Le macérat de couleur verte est fractionné successivement par trois (3) solvants : le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.



**Schéma II. 01** : Protocole d'extraction des polyphénols.

## II.4. Etude quantitative

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur taux en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux, en tanins condensés et l'évaluation de l'activité antioxydante.

### II. 4. 1. Calculs de rendement

Nous pouvons déterminer les rendements d'extraction des feuilles et des tiges de *Pergularia tomentosa* selon la relation suivant :

$$R (\%) = ( M_{\text{ext}}/M_{\text{ech}}) \times 100$$

Où :

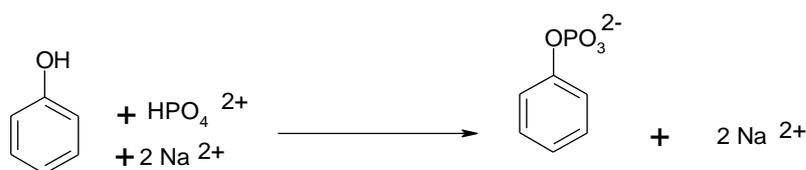
R : le rendement en (%);

M<sub>ext</sub> : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en (g) ;

M<sub>éch</sub> : la masse sèche de l'échantillon végétal en (g).

### II. 4. 2. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

La concentration en phénols totaux des extraits des différentes parties de la plante étudiée a été déterminée par la méthode de SINGLETON et ROSS [21], utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>), qui absorbent fortement à une longueur d'onde de 760 nm.



**Schéma II.02:** Principe de la réduction du réactif de Folin Ciocalteu.

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de l'acide gallique de concentration massique 0.25 g/L, des solutions sont préparées avec des concentrations allant de 0,03 g/L à 0.25 g/L dissous dans l'eau.

0.1ml de chaque solution ont été introduit dans des tubes à essai. Puis sont ajoutés 0.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à (10%). Après 5 minutes, nous ajoutons 2 ml de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 20% (m/v). Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS contre un blanc (même solution sans la solution d'acide gallique remplacé par l'eau).

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée par la même procédure. Toutes les mesures sont répétées 3 fois. Le contenu phénolique total (TPC) est exprimé par mg EAG/g de matière sèche.

### **II. 4. 3. Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par une méthode basée sur la formation de complexe entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 430 nm. Le flavonoïde utilisé comme référence dans cette méthode est la quercétine.

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de la quercétine de concentration massique 0.025 g/L, des solutions sont préparées avec des concentrations allant de 0,003 g/L à 0.025 g/L dissous dans l'éthanol.

1.5ml d'une solution éthanolique d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est rajouté à 1.5ml de la quercétine.

Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS contre un blanc (même solution sans la solution de quercétine remplacé par l'éthanol) [22].

Pour les extraits phénoliques, les mesures ont été réalisées par la même procédure. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. La concentration des flavonoïdes totaux (TF) est exprimée par mg EQ/g de matière sèche.

### **II. 4. 4. Dosage des tanins condensé**

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir d'une solution mère préparée de la catéchine de concentration massique 0.1 g/L, des solutions sont préparées avec des concentrations allant de 0.01 g/L à 0.1 g/L dissous dans l'éthanol.

3ml d'une solution éthanolique de vanilline (4%) est rajouté à 1.5ml de HCl concentré + 0.4 ml de catéchine.

Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS contre un blanc (même solution sans la solution de catéchine remplacé par l'éthanol) [22].

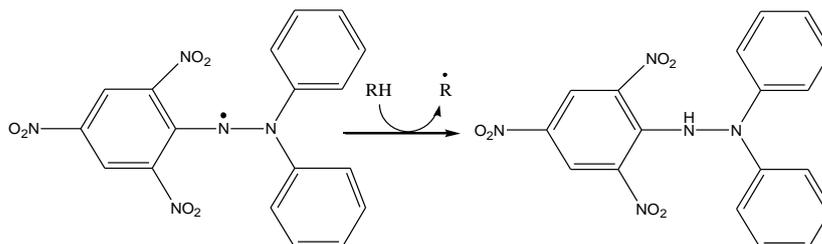
Pour les extraits phénoliques, les mesures ont été réalisées par la même procédure. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. La concentration des tanins (TC) est exprimée par mg EC/g de matière sèche.

## II.5. Activité antioxydante

### II.5.1. Test de piégeage du radical DPPH•

#### Principe

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits étudiés, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH• (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par MANSOURI et *Coll.* [23] avec quelques modifications. Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH• ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazyl, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [24] (Voir le schéma 3). Le DPPH• possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Ce radical reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [25].



**Schéma II.3:** Réduction du radical libre DPPH•

#### Mode opératoire

1.5mL des extraits de *Pergularia tomentosa* L. dilué dans l'eau est additionné à 1.5mL d'une solution de DPPH• (250µM) préparé dans le méthanol ou l'éthanol, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négative contenant la solution de DPPH• et 1.5 mL d'eau, l'absorbance a été mesuré à 517 nm.

Même procédure est répétée, en remplaçant l'extrait de *Pergularia tomentosa* par le BHT et l'acide ascorbique comme des références.

L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité antiradicalaire} = \frac{\text{Abs } 517_{\text{contrôle négative}} - \text{Abs } 517_{\text{échantillon}}}{\text{Abs } 517_{\text{contrôle négative}}} \times 100$$

L'activité antioxydante est exprimé par la valeur de  $CI_{50}$ , sachant que  $CI_{50}$  est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH $\cdot$ .

## II.5.2. Teste de capacité antioxydante totale (TAC)

### Principe

La capacité antioxydante totale des extraits des plantes est évalué par la methode de phosphomolybdéne. Cette technique est base sur la réduction de molybdéne Mo(VI) présent sous la forme d'ion molybdate  $MoO_4^{2-}$  à molybdéne Mo(V) present sous la forme  $MoO_2^{1+}$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate (Mo(V)) à pH acide [26].

### Mode opératoire

Le test de Phosphomolybdate (PPM) a été réalisé selon la méthode décrite par Prieto et Coll. [26] qui consiste à introduire dans un tube 0.3 ml de chaque extrait à 3 ml d'un réactif composé de  $H_2SO_4$  (0,6 M), de  $NaH_2PO_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube a été incubé à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été mesuré à l'aide d'un Spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 695 nm contre un témoin (blanc) préparé de la même manière (sauf que l'extrait est remplacé par 0.3 ml d'eau). Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme antioxydant standard, dont la capacité antioxydante est exprimée selon un nouveau terme appelé AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity). On définit l'**AEAC** comme la concentration molaire de la solution d'acide ascorbique qui possède un pouvoir réducteur équivalent à solution de concentration 1 M d'extrait étudié.

$$AEAC = K/K'$$

**K** : le pent de courbe d'extrait

**K'** : le pent de courbe de l'acide ascorbique (une courbe absorbance à 695 nm en fonction concentration en mM)

## II.6. Etude qualitative

### II.6.1. 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 [7].

Les systèmes solvants choisis sont utilisés comme des éluants des phases stationnaires, leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

**Le dépôt :** le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte [37].

**Développement des plaques :** chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque [37].

**Révélation :** si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques :

**Révélation aux UV :** qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

**Révélation par des méthodes chimiques :** ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler [38].

Des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice (60 F<sub>254</sub> sur feuilles d'aluminium) ont été réalisés, avec les systèmes de migration suivante :

**Pour la phase butanolique :**

CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5:1) (1:1) (1:3)

Toulène/Acétone / Acide formique (38:10:5)

CHCl<sub>3</sub>/Acétone/MeOH (7:3:3)

Acétate d'éthyle /MeOH (5:1)

CHCl<sub>3</sub>/Acétate d'éthyle /MeOH (7:3:1)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (40:9:1)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (30:9:1)

CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O /Acide acétique (30:9:1:3)

**Pour la phase Acétate :**

CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (30:9:1)

Les taches en les révélées en les exposants à la lumière UV à  $\lambda=254$  nm et  $\lambda=365$ nm et pour compléter la révélation ; les plaques sont révélées aux pulvérisations de vanilline sulfurique puis chauffées à 110°C pendant 10 minutes à fin de révéler les spots obtenus.

Après délimitation des taches en utilisant les deux méthodes de révélation (physique et chimique), on calcule les Rf en utilisant :

$$R_f = d (\text{soluté}) / d' (\text{solvant})$$

où : **d**: est la distance parcourue par un soluté à partir de la ligne de dépôt.

**d'**: est la distance parcourue par l'éluant (solvant) à partir de la ligne de dépôt.

### **Mise en évidence des triterpènes, des stérols et des tanins**

Afin de mettre en évidence la présence des triterpènes, des stérols et des tanins dans nos extraits, un test simple et rapide au vanilline sulfurique a été réalisé, pour ce test nous avons préparé une solution éthanolique de vanilline (1%) en dissoudre 1g vanilline dans 100 ml d'éthanol, 2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été additionné puis la solution pulvérisée sur le chromatogramme de gel de silice, ce dernier qui a été développé au préalable dans tous les systèmes des solvants. Après séchage le chromatogramme sera directement observé dans le visible.

### **Relation structure-fluorescence**

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination des structures des flavonoïdes, le tableau II.2 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

**Tableau II.2** : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes [40].

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

## II.6.2. Techniques chromatographiques de séparation

### II.6.2.1. Analyse par chromatographie de papier bidimensionnel CP

La chromatographie de papier bidimensionnel représente des meilleures méthodes pour la séparation rapide des flavonoïdes [41]. On utilise des papiers Whatman n° 3 millimètres

## Les systèmes de solvant

a) Solution de BAW (4:1:5) est constitué de butanol ; acide acétique ; eau.

b) AcOH à 15 % : 15 ml de l'acide acétique mélangé à 85 ml de H<sub>2</sub>O [41].

Le BAW et AcOH sont satisfaisants pour l'analyse de chromatographie sur papier bidimensionnel de la plupart des extraits des flavonoïdes [41].

Dans cette technique, une quantité importante des deux phases butanolique et acétate d'éthyle de *Pergularia tomentosa* est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie (chaque extrait en papier), cet échantillon est absorbé par le papier ; ce qui signifie que les molécules interagissent avec ce dernier et qu'elles auront tendance à rester au même endroit. Le papier est trempé dans le système solvant (butanol /acide acétique/eau) (4:1:5: v/v/v) placé dans une cuve bien fermée, pendant que l'éluant ascendant le long du papier par capillarité, et ensuite le papier est trempé dans le système solvant (acide acétique/eau) (15/85 : v/v) placé dans une cuve bien fermée, pendant que l'éluant ascendante le long du papier par capillarité.

Les différentes substances de l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec le papier. La chromatographie sur papier demande un certain temps, généralement plusieurs heures, une fois que c'est fini, c'est-à-dire quand le solvant est arrivé en haut du papier ce dernier est retiré de la cuve, on laisse évaporer le solvant. Après observé sous la lampe UV [42].

### II.6.2.2. Analyse par chromatographie papier CP monodimensionnel

#### a. BAW

Dans cette technique, une quantité importante des deux phases de butanolique et d'acétate d'éthyle de *Pergularia tomentosa* est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie (dans un même papier), le même principe de papier bidimensionnel. Le papier est trempé dans le système solvant BAW placé dans une cuve bien fermée, pendant que l'éluant ascendant le long du papier par capillarité. Après on laisse évaporer le solvant et observé sous la lampe UV.

#### b. acide acétique/eau

Le papier est trempé dans le système solvant AcOH 15% placé dans une cuve bien fermée. Après on laisse évaporer le solvant et observé sous la lampe UV.

#### c. Test de concentration

Dans un papier de Whatman 3 millimètres de dimension de (20x20cm) des quantités de phase butanolique de *Pergularia tomentosa* sont déposés sur le bord d'une bande de papier des trois concentrations différents, après le papier est trempé dans le système de solvant (acide

acétique/eau) (15:85 v/v) placé dans une cuve bien fermée, pendant que l'éluant ascendant le long du papier par capillarité. Après on laisse évaporer le solvant et observé sous la lampe UV.

#### **d. La séparation**

Dans un cuve bien fermée de dimension de (60x50cm), 500 ml de solvant de système (acide acétique/eau) (15:85 v/v) a été ajouté puis le papier placé dans le cuve, pendant que l'éluant descend le long du papier par gravité. Après on laisse évaporer le solvant et observé sous la lampe UV.

Chaque spot a été déterminé et coupé à un petite morceau, cette dernier est dissoute dans le méthanol puis concentré et testé par des systèmes déférent sur le CCM permet de sélectionné le meilleur système pour la séparation de produit pur.

#### **e. Purification par chromatographie préparative**

Après les tests par CCM préparative des produits de CP en va choisir le système ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) (5:1) pour la purification N°2 dans une plaque préparatif de dimension (20 x20cm), une quantité de 11mg de produit séparé a été déposé et placer dans une cuve bien fermé qui contient le système, pendant que l'éluant ascendant sur plaque CCM par capillarité. Après on laisse évaporer le solvant et on a répété la migration 6 fois jusqu'à l'observation sous la lampe UV des spots bien séparé.

Chaque spot déterminé sous la lampe UV, elle est grattée par une spatule et dissolution dans le méthanol après filtré par verre fritté. Après la séparation et filtration de chaque produit, les produits A, B, C et D ont été testé par CCM dans un différent système de migration pour confirmer leur purification.

### **II.6.3. La chromatographie sur colonne**

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

**La phase stationnaire** : c'est le support solide, qui est la colonne de gel de silice, elle est montée dans le moins polaire des solvants utilisés qui est le chloroforme dans notre cas.

**La phase mobile** : représente le solvant d'éluion utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire.

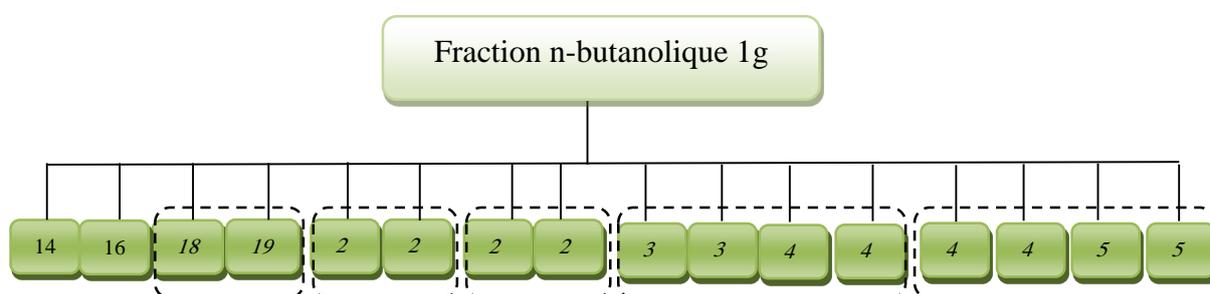
Pour la préparation de la colonne, une quantité  $m=32\text{g}$  de gel de silice a été mélangé avec 70ml de chloroforme dans un bécher, après ajouté dans une colonne de hauteur de 20 cm (la méthode humide).

Après dissolution de phase butanolique de dans le méthanol, le mélange est additionné à une quantité de gel de silice, évaporé à sec ce qui conduit à l'obtention d'une poudre solide qui est introduite délicatement dans la colonne puis fractionnée avec le gradient (chloroforme/méthanol) de polarité croissante, l'élution doit être poursuivie jusqu'au méthanol pur. A chaque fois des fractions de 14 ml sont collectés.

Les fractions collectées sont soumises au contrôle chromatographique sur couche mince, puis révélées aux UV (254 et 365 nm) ce qui en permet de rassembler les fractions présentant des similitudes. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur chromatogramme sur couches minces de gel de silice sur support aluminium, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec vanilline sulfurique et chauffées à 110 C° pendant 10 min.

**Tableau II.3 :** Fractionnement la fraction n-butanolique de *Pergularia tomentosa*

Eluant : CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Fractions collectées	Volume (mL)	Masse (g)
80-20	14	14 ml	/
75-25	16	14ml	/
75-25....70-30	18-19	28ml	0.04 g
70-30....65-35	20-22	42ml	0.1375g
60-40	25-26-27	42ml	/
45-55..40-60..35-65..30-70	36....43	112ml	/
0-100	45.....51	98ml	/



**Schéma II.04:** Schéma de fractionnement de la fraction n-butanolique.

## **II.6.4. Spectres UV-Visible des flavonoïdes**

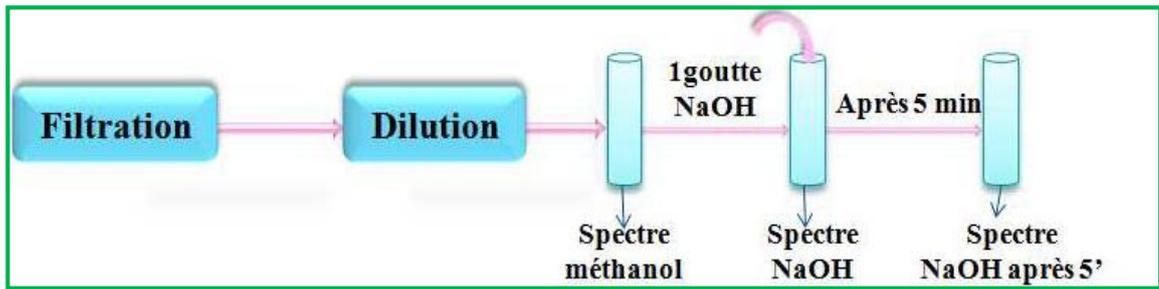
Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes. Les flavones et flavonols sont caractérisés en majorité par deux bandes d'absorption majeures dans la région UV-Visible.

Les flavones et les flavonols hautement oxygénés ont tendance d'absorbance vers les longueurs d'ondes les plus longues en entraînant un déplacement du spectre vers l'infra rouge. La méthylation ou la glycosylation des groupements hydroxyles des flavonoïdes résulte généralement d'un déplacement hypsochromique de la bande I.

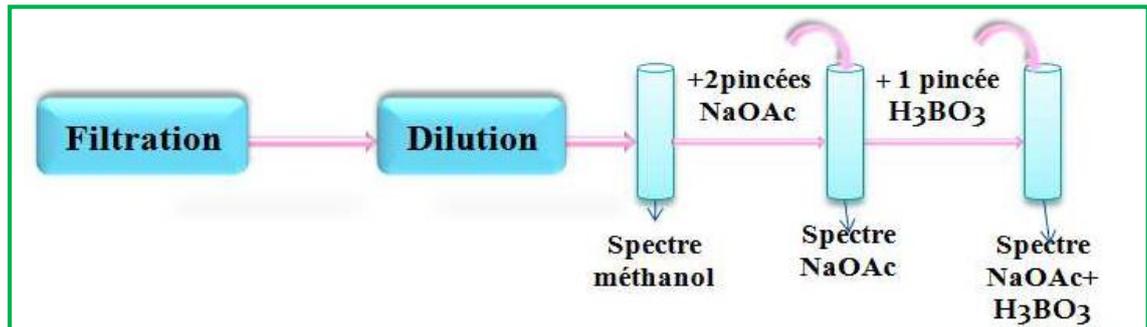
### **II.6.4.1. Etude spectrale des flavonoïdes**

Après la collection des extraits flavoniques suite à l'utilisation de techniques chromatographiques de séparation (chromatographie sur papier) pour *Pergularia tomentosa* L. les composés isolés sont analysés par mesure de leur spectre d'absorption UV-Vis dans le méthanol, ainsi que leur déplacement bathochromique, hypsochromique, hyperchromique suite à l'addition des réactifs spécifiques [43].

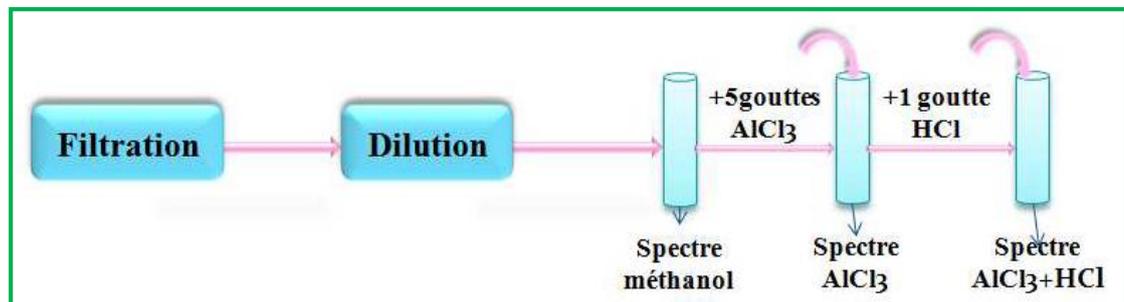
Première série:



Deuxième série:



Troisième série:



**Figure II.01:** Protocole d'étude spectrale des flavonoïdes en présence des différents réactifs

## II.6.4.2. Les séries spectrales

**Tableau II.4 :** Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs [37].

Réactifs	Déplacements ennm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	280-250 280-250 280- 250	350-310 360-330 380-350	Flavones Flavonols (3-OH substitué) Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+45 à 65 BI avec stabilité d'intensité +50 à 60 avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Absence de pic entre 320-335 Apparition d'un pic entre BI et BII Transformation de BI en une inflexion		4'OH 3',4'-di O 4' -OMe 7-OR 7-OH 5-OH
AlCl <sub>3</sub> +MeOH	+20 à 45 +60		5-OH 3-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl / AlCl <sub>3</sub>	-30 à 45 -10 -20		3',4' -di OH 3',4'-OH,OMe 3',4',5'-tri OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl /MeOH	+35 à 55 +17 à 20		5-OH 5-OH
NaOAc / MeOH	+20 à 80 Déplacement très faible Diminution d'intensité avec le temps Spectre se décompose avec le temps		7-OH 7-OR 6,7 ; 7,8 ou 3',4'-di-OH 5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3,3',4'-tri OH
NaOAc +H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / MeOH	+12 à 36 +5 à 10		3',4'-di OH 6,7 ou 7,8 – di OH

## *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

### III.1. Tests phytochimiques

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

**Tableau III.1** : Screening chimique de *Pergularia tomentosa*.

Métabolites secondaires	Tiges	Feuilles
Flavonoïdes	+	++
Alcaloïdes	++	+++
Tanins	+	++
Composés réducteurs	+	+
Cardionolides	++	-
Terpenoïdes	++	+
Triterpenoïdes	+	+
Stéroïdes	+	++
Saponines	-	++
Quinones libers	+	++
Protéines	+	-

- : absence, + : présence,

Les résultats des tests phytochimiques ont révélé la présence des flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, composés réducteurs, terpenoïdes, stéroïdes, quinones libers et triterpenoïdes dans les deux organes (tiges et feuilles) du *Pergularia tomentosa*. Les flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, stéroïdes, saponines et quinones libers ont été détectés en grande quantité dans les feuilles par comparaison aux tiges. La richesse de la plante *Pergularia tomentosa* en alcaloïdes par comparaison aux flavonoïdes explique la toxicité de cette plante ce qui explique certainement son usage dans le traitement des maladies. Aussi, les alcaloïdes sont utilisés comme analgésiques, stimulants, anesthésiques et antibactériens. Les saponines sont présentes dans les extraits des feuilles examinés. Les saponines ont des applications dans les extincteurs moussants, les émulsifiants, les insecticides, etc. La présence de ces métabolites secondaires peut être attribuée aux actions antifongiques de la *Pergularia tomentosa* [27].

### III.2. Extraction des composés phénoliques

Les tests préliminaires réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes et des composés phénoliques. Les composés phénoliques présentent une large gamme d'activités biologiques [28]. Donc, notre choix porté sur cette famille des composés qui ont été obtenus par la méthode d'extraction des polyphénols. Les résultats des rendements sont reportés sur le tableau III.2:

**Tableau III.2:** Rendement et couleur des extraits.

L'organes Les extraits	Tiges		Feuilles	
	Rendement(%)	Couleur	Rendement (%)	Couleur
Brute	1.70	Vert clair	4.07	Vert foncé
Chloroforme	0.15	Vert clair	0.52	Vert foncé
Acétate d'éthyle	0.27	Jaune clair	0.13	Jaune foncé
Butanol	1.53	Marron	1.68	Rouge serais
Aqueus	/	Marron	8.64	Marron foncé

L'extraction par utilisation des solvants à polarité croissante permet de séparer des composés selon leur polarité. On remarque que les rendements des extraits de la plante changent d'un solvant à autre selon le degré de solubilité des composés dans le solvant.

Pour l'extrait chloroformique et butanolique, la présence des composés polyphénols est bien visible au niveau des feuilles où le rendement est intéressant, par contre la phase acétate d'éthyle, le bon rendement observé au niveau des tiges.

Le rendement de la phase aqueuse montre que la plante est très riche en composés très polaires tels que les polyphénols et les glucides.

A la comparaison de nos résultats avec des études antérieures nous remarquons que les rendements d'extraction obtenus par Hassan S. W. et Coll. [13] sont plus élevés à titre d'exemple, pour les feuilles, la phase chloroformique et la phase aqueuse donnent 7% et 15.25% respectivement ; aussi les tiges de *Pergularia tomentosa* la phase chloroformique et la phase aqueuse donnent 4.75% et 13.5% respectivement, nous rappelons que le système d'extraction utilisé dans cette étude est éthanol:eau (1:1).

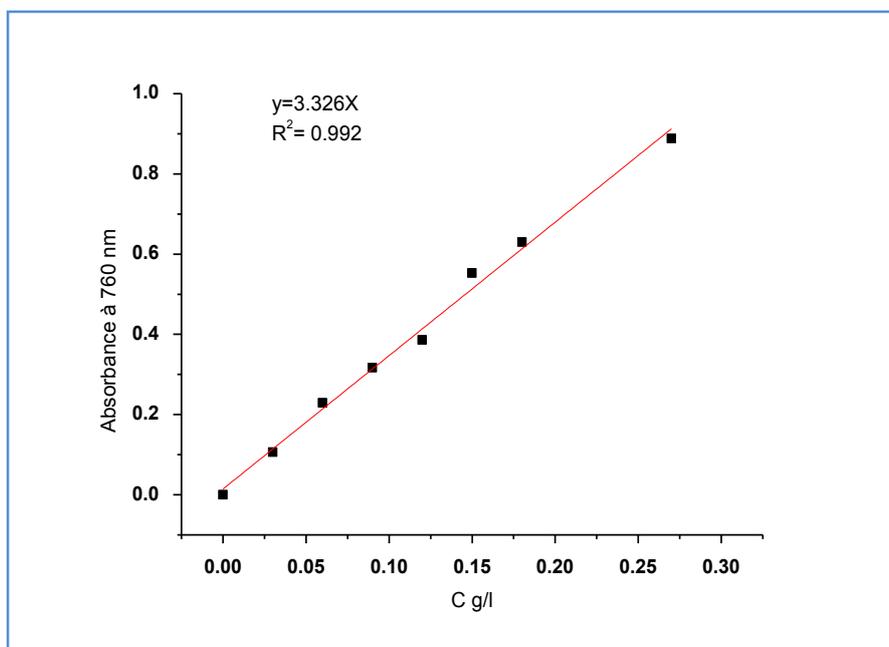
Notons que des résultats similaires à notre étude ont été obtenus sur la même espèce récoltée à Mansoura wilaya de Ghardaia, concernant le rendement de phase butanolique, malgré le

système d'extraction utilisé pour l'étude de l'espèce de Mansoura est l'éthanol. Par contre, notre phase queuese présente un rendement plus élevé que le rendement d'espèce de Mansoura (8.64% et 2.73% respectivement)[7]. Nous attribuons ce différence de rendement au système d'extraction utilisé, où nous avons utilisé méthanol:eau (8:2), c'est pour ça les composés hydrophiles sont extraites ce qui conduit à l'augmentation de rendement de la phase aqueuse.

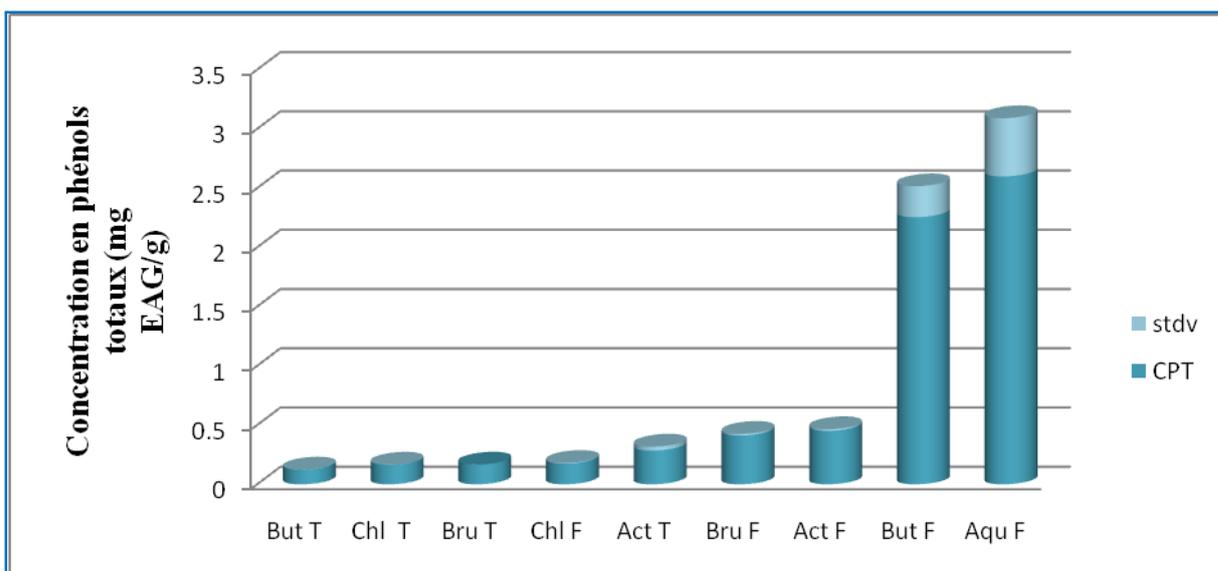
### III.3. Analyse quantitative

#### III.3.1. Dosage de polyphénols totaux

La quantification des polyphénols des extraits de *Pergularia tomentosa* est réalisé avec la méthode de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en TPC des différents extraits exprimées en mg EAG/g d'extrait à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (voir la figure III.01).



**Figure III.01** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



**Figure III.02 :** Teneurs en polyphénols totaux

D'après la figure III.02, nous remarquons que les feuilles sont plus riches en composés phénoliques par rapport aux tiges.

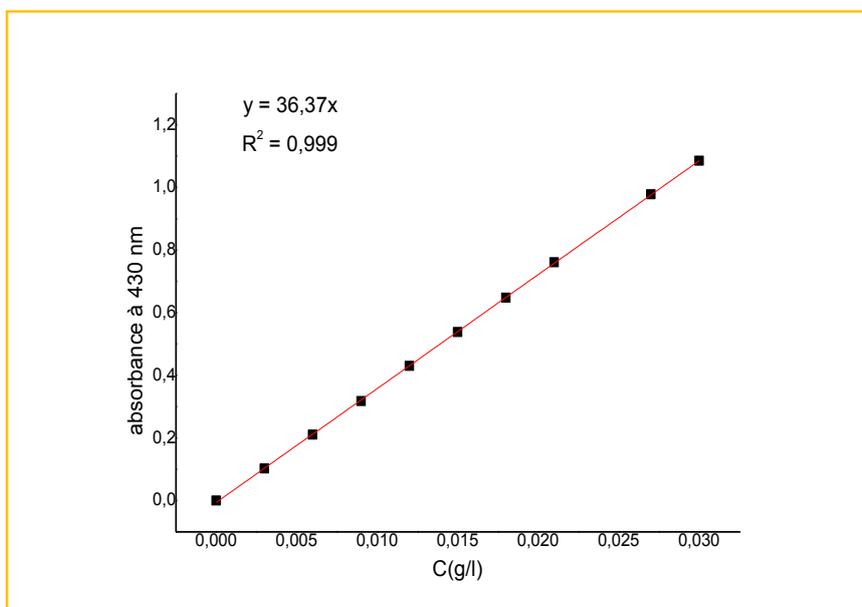
Ces résultats montrent que les fractions de butanol feuilles et celles d'aqueuse feuilles sont les extraits les plus riches en polyphénols, où la teneur la plus élevée est constatée dans la fraction aqueuse feuilles, elle est de l'ordre de  $2.599 \pm 0.491$  mg EAG/g, suivi par la fraction butanolique avec une teneur de  $2.255 \pm 0.261$  mg EAG/g.

Notons aussi, que les teneurs en polyphénols des extraits butanol tiges et chloroforme tiges sont les plus pauvres en polyphénols, où les teneurs sont de l'ordre de  $0.124 \pm 0.001$  mg EAG/g et  $0.165 \pm 0.001$  mg EAG/g respectivement.

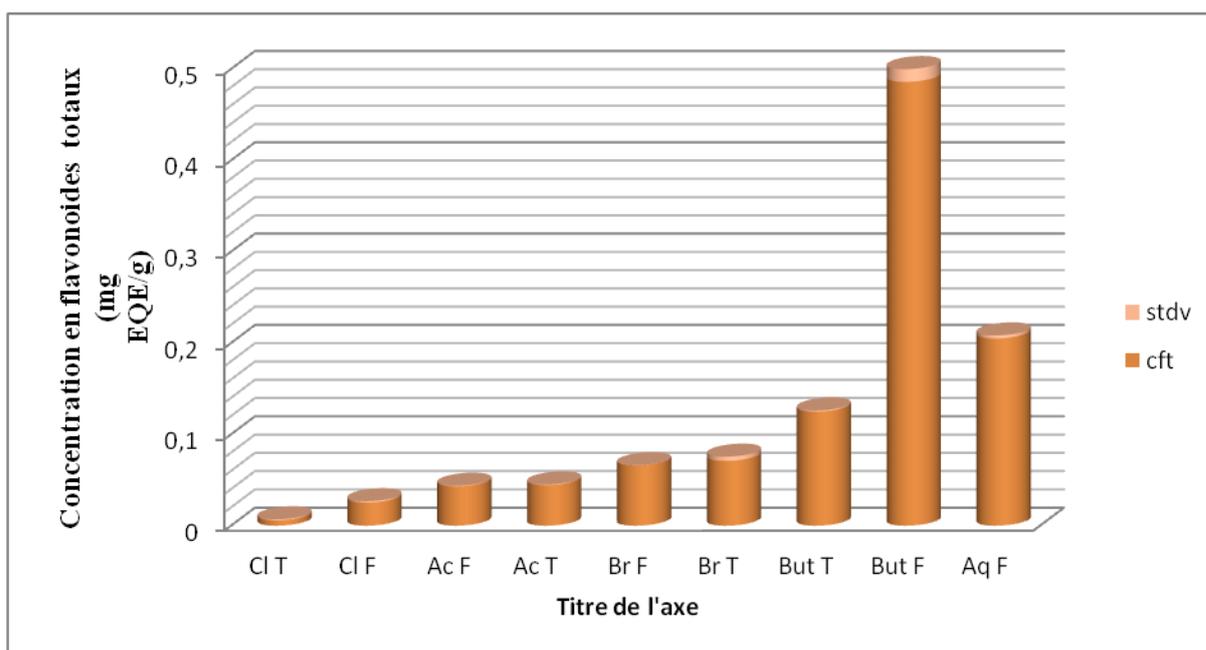
Le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu est un dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols, car il est impliqué que toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C [29].

### III.3.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur des flavonoïdes a été effectuée au moyen d'un dosage spectrophotométrique au niveau des extraits de *Pergularia tomentosa*. Une courbe d'étalonnage réalisé par la quercétine a été tracée pour cet objectif (Figure III.03).



**Figure III.03 :** Courbe d'étalonnage la quercétine pour le dosage des flavonoïdes



**Figure III.04 :** Teneurs en flavonoïdes totaux.

Les teneurs en flavonoïdes (figure III.04), font apparaitre que la fraction butanolique des feuilles et la fraction aqueuse des feuilles sont les plus riches. La teneur la plus élevée est constatée dans la fraction butanol feuilles  $0.48 \pm 0.014$  mg EQE/g. Les teneurs en flavonoïdes dans la fraction brut tiges et brut feuilles presque le même où les teneurs sont de l'ordre de 0.07

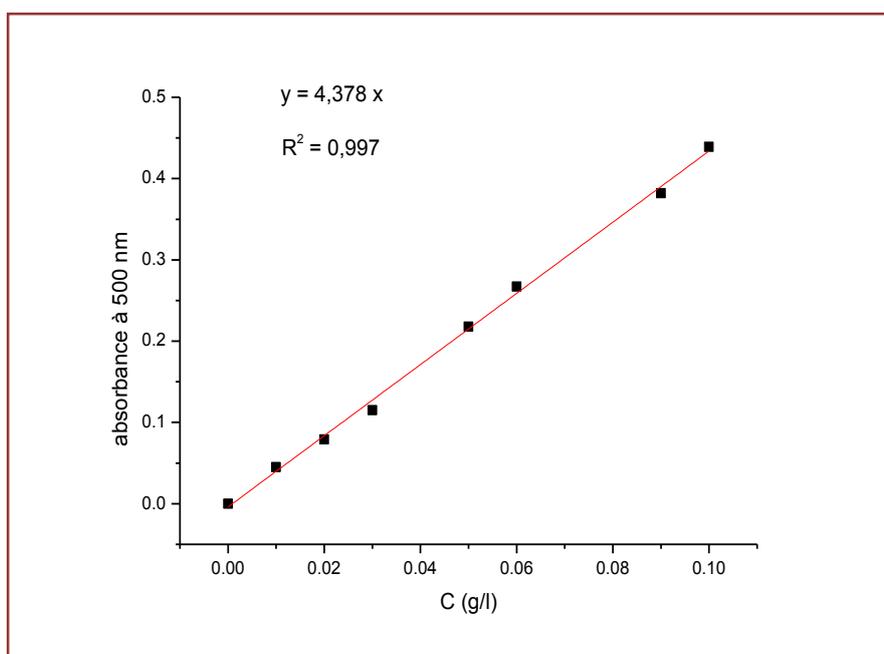
$\pm 0.004$  mg EQE/g et  $0.06 \pm 0.0002$  mg EQE/g respectivement, et la même remarque pour la fraction d'acétate d'éthyle tiges et acétate d'éthyle feuilles où les teneurs sont de l'ordre de  $0.044 \pm 0.0007$  mg EQE/g et  $0.043 \pm 0.0007$  mg EQE/g respectivement. La quantité la plus faible est constatée dans la fraction chloroforme tiges et chloroforme feuilles, elle est de l'ordre de  $0.005 \pm 0.001$  mg EQE/g et  $0.025 \pm 0.001$  mg EQE/g respectivement.

La plante de *Pergularia tomentosa* L. est plus riche en flavanols glycosides [30] ce qui explique la richesse des extraits butanol feuilles et aqueuse feuilles en flavonoïdes.

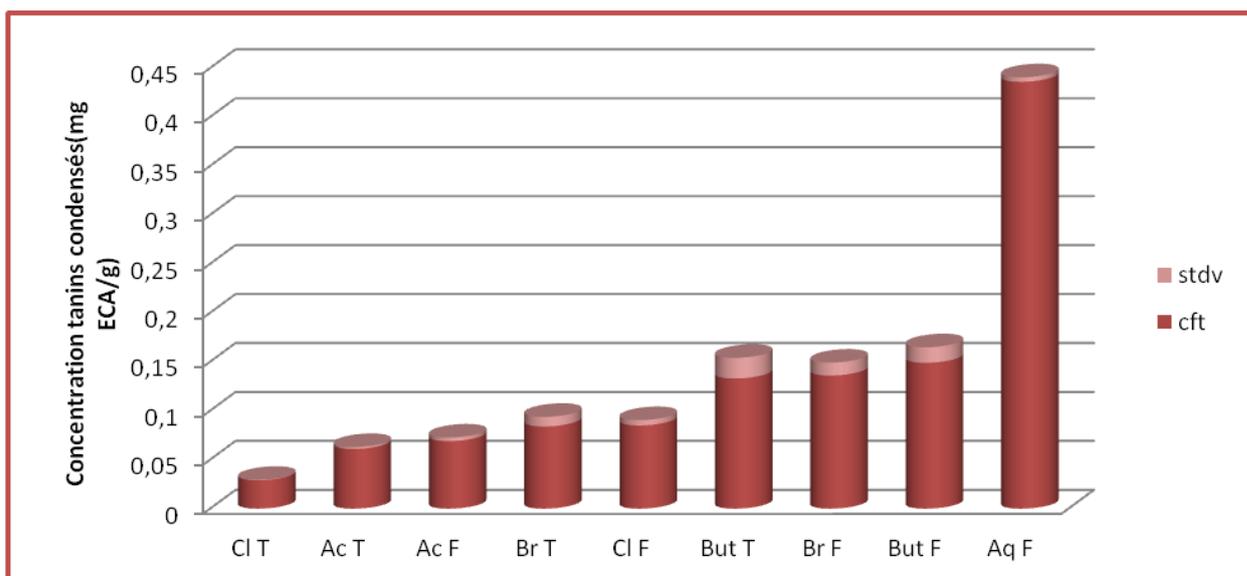
Les flavonoïdes possèdent des activités antivirales, anti tumorales, et anti-inflammatoires [10], ce qui explique l'utilisation de cette plante dans la thérapie des maladies.

### III.3.3. Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins a été effectuée avec le valine et HCl [32]. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine comme standard.



**Figure III.05:** Courbe d'étalonnage de la catéchine



**Figure III.06 :** Teneurs en tanins condensés.

Ces résultats montrent que les feuilles sont plus riches en tanins condensés par comparaison aux tiges. Nous remarquons que l'extrait d'aqueuse feuilles contient plus de tanins que les autres extraits, leur concentration a atteint  $0.436 \pm 0.004$  mg ECA/g, par contre où l'extrait de chloroforme tiges, leur concentration a atteint  $0.029 \pm 0.0005$  mg ECA/g. Notons aussi que les teneurs en tanins condensés des extraits butanol feuilles, brut feuilles et butanol tiges sont voisines, où les teneurs sont de l'ordre de  $0.149 \pm 0.015$  mg ECA/g,  $0.136 \pm 0.013$  mg ECA/g et  $0.133 \pm 0.021$  mg ECA/g respectivement. La même remarque est observé pour les fractions d'acétate d'éthyle tiges et feuilles.

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, ce qui explique la richesse de la phase aqueuse en tanins condensés.

La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, ce qui permet l'utilisation de cette plante en désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes [33].

### **III.4. Activité antioxydante**

#### **III.4.1. Test de piégeage du radical DPPH•**

L'évaluation de l'activité anti radicalaire de nos extraits via le test DPPH• a conduit aux résultats illustrés par la figure III.07

**Figure III.07:** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits.

**Tableau III. 3:** Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH•

Extraits	CI <sub>50</sub> (mg/mL)
Brut T	0.7
Chloroforme T	0.37 ± 0.01
Acétat T	0.31 ± 0.02
Butanol T	0.39 ± 0.01
Brut F	0.25 ± 0.01
Chloroforme F	1.11 ± 0.03
Acetat F	0.10 ± 0.02
Butanol F	0.04 ± 0.01
Aqueuse F	1.78 ± 0.32
BHT	0.004 ± 0.0004
Vitamine C	0.009 ± 0.0005

Ces résultats montrent que tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH•, plus la valeur de CI<sub>50</sub> est faible plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

À des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés, le BHT et l'acide ascorbique, ils ont montré une activité anti radicalaire puissante avec des CI<sub>50</sub> de l'ordre de 0.004 ± 0.0004 mg/ml et 0.009 ± 0.0005 mg/ml respectivement.

Parmi les extraits de *Pergularia tomentosa*, les extraits d'acétat F et butanol F ont montré des activités antioxydantes très importantes par rapport aux autres extraits. Par contre les extraits d'aqueuse F et chloroforme F, montrent une très faible activité antiradicalaire, dont le CI<sub>50</sub> : 1.88 ± 0.32 mg/ml et 1.21 ± 0.03 mg/ml respectivement.

Dans notre travail, le classement de la capacité des extraits à piéger le DPPH• est comme suit:

**Acetat F ≈ Butanol F > Brut F > Acétat T > Chloroforme T > Butanol T > Brut T > Chloroforme F > Aqueuse F**

D'après ce classement, nous remarquons que les feuilles présentent une bonne réduction de radicale DPPH• dans les fractions polaires par rapport aux tiges.

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

La capacité antioxydante de *P. tomentosa* peut être attribuée à la teneur élevée en alcaloïdes, anthraquinones, flavonoïdes, glycosides, saponines, stéroïdes et tanins, cardénolide

glycosides, cardénolides et glucoside  $\beta$ -sitostérol, deux triterpènes du squelette taraxostérol étaient isolés; pergularine A et pergularine B ont été isolés de *P. tomentosa*. En outre, l'activité antioxydante puissante des extraits étudiés peut être attribuée principalement au contenu phénolique, dû à leurs groupes d'hydroxyle, et/ou des flavonoïdes qui réagissent avec le radical de DPPH• par donation d'atome d'hydrogène libres aux radicaux [34].

#### **III.4.2. Teste de capacité antioxydante totale (TAC)**

Comme une activité réductrice par la donation d'électrone, on réalise le test de réduction d'ions molybdate. Les résultats de ce test sont illustré dans la figure III.8:

**Figure III.08** : Courbes représentant le pouvoir réductrice des extraits de *P.temontosa*

**Tableau III. 4 :** Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC).

Extrait	AEAC (mM)
Brut T	31.48 ± 1.06
Chloroforme T	11.80 ± 4.28
Acetat T	32.62 ± 0.89
Butanol T	62.48 ± 8.62
Brut F	74.76 ± 0.05
Chloroforme F	60.36 ± 7.71
Acetat F	41.45 ± 2.91
Butanol F	211.58 ± 7.09
Aqueuse F	255.85 ± 8.09
BHT	4.96 ± 1.51
BHA	11.10 ± 7.55

L'efficacité de la réduction du molybdène Mo (VI) est directement proportionnelle à la valeur d'AEAC, nos composés ont montré une bonne activité réductrice qui était comparable à l'acide ascorbique, BHA et BHT. De ces résultats, nous remarquons que les extraits butanol F et aqueuse F possède une capacité réductrice très importante (AEAC=221.58mM et 265.85mM respectivement) par contre à l'extrait de chloroforme T ou l'AEAC = 21.80mM.

Nous observons que la capacité réductrice est basée sur le potentiel rédox des antioxydants [46]. En réalité, les groupes donneurs des électrons comme (OH, OCH<sub>3</sub>, alkyle) minimisent le potentiel rédox des polyphénols et augmente leurs capacités antioxydantes [36]. Parmi les flavanols glycosides isolés de *P. tomentosa*, on a les 3-O-galactoside et 3-O-glucosides de quercétine, nous rappelons que le potentiel d'oxydation de la quercétine est de l'ordre 0.25 V (Ag/AgCl) [36], donc, la faible valeur de potentiel d'oxydation facilite beaucoup la donation d'électron.

À la fin d'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Pergularia tomentosa*, nous pouvons dire que ces extraits possèdent une bonne réduction du molybdène Mo (VI) et une faible inhibition de radicale DPPH• par rapport aux antioxydants standards utilisés. Cela donne une idée sur le mécanisme de réduction du Mo (VI) ou de DPPH•, à ce point nous proposons que les molécules bioactives existant dans les extraits jouent un rôle de donneurs d'électrons plus que la donation d'hydrogène.

### III. 5. Corrélation

Afin de confirmer que l'activité antioxydante des extraits de *Pergularia tomentosa* revient à leur richesse en composés phénolique, flavonique et tannique, nous avons essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs de capacités antioxydantes calculées par les deux méthodes (la méthode du test DPPH• et la réduction de molybdène Mo (VI)) avec leur contenu en polyphénol totaux, flavonique et tannique.

**Tableau III. 5 :** Les résultats de la corrélation linéaire entre les valeurs de  $CI_{50}$  avec les contenu en polyphénol totaux, flavonique et tannique.

	$CI_{50}$	TPC	TC	TF
$CI_{50}$	1			
TPC	0.34	1		
TC	-0.91	-0.28	1	
TF	0.23	-0.63	-0.33	1

La détermination des coefficients de corrélation entre les  $CI_{50}$  et le contenu en polyphénols et en flavonoïdes a montré l'existence d'une corrélation très faible qui est de  $R^2 = 0.115$  et  $R^2 = 0.052$  respectivement, ce qui explique que le  $CI_{50}$  ne pas être affecté par la concentration des substances polyphénoliques et flavonoïdiques mais il affecté par la nature de ces substances. Par contre, la corrélation entre les  $CI_{50}$  et le contenu en tanins, on a trouvé une bonne corrélation avec une valeur de  $R^2 = 0.828$ , Pour ce cas, les valeurs de  $CI_{50}$  diminuent avec l'augmentation du contenu de tanins, ce qui se traduit par des activités antioxydantes très élevées dans les extraits riches en tanins.

**Tableau III. 6 :** Les résultats de la corrélation linéaire entre les valeurs de AEAC avec les contenu en polyphénol totaux, flavonique et tannique.

	AEAC	TPC	TC	TF
AEAC	1			
TPC	-0.02	1		
TC	0.30	0.07	1	
TF	0.10	-0.78	-0.27	1

Nous remarquons qu'il y a indépendance de l'activité réductrice aux quantités des polyphénols, flavonoïdes et tanins, où les coefficients de corrélation entre les AEAC et ces contenu:

$R^2 = 0.0004$ ,  $R^2 = 0.01$  et  $R^2 = 0.09$  respectivement.

La seule explication de cette indépendance semble être que l'activité réductrice de cette plante dépend des structures chimiques des composés réductrices renfermés dans ces extraits.

Par contre, une faible corrélation a été obtenue entre l'activité de réduction et la capacité d'inhibition de DPPH. Cette contradiction est due certainement aux types des tests utilisés et le mécanisme des réactions mises en jeu.

### **III.6. Analyse chromatographique par chromatographie sur couche mince (CCM analytique)**

Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les fractions butanolique et acétate d'éthyle étudiées sur une plaque de gel de silice en utilisant des différents systèmes. Le criblage phytochimique effectué sur les deux extraits, montre que les deux extraits donnent des taches différentes avec les différents révélateurs et les différents systèmes d'éluion utilisés.

Les spots sont visualisés avant et après révélation sous une longueur d'onde de 365 nm et 254nm. Cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes.

**Figure III.09** : Révélation sous une longueur d'onde de 365 nm et 254

Le CCM visualisé sous UV présente des taches de couleur violet, bleu, blanc fluorescent, jaune, orange et marron, qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires (voir le Fig. III.09). De ce fait nous avons procédé à la révélation avec le réactif de vanilline sulfurique pour permettre une première orientation sur les classes de composés présents dans les échantillons.

Les échantillons analysés semblent contenir des triterpènes (coloration violet, rose et orange par révélation à la vanilline sulfurique) [42] et des stérols (coloration bleu) [45] (voir le Fig. III.10). Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavones et des flavonols.

**Figure III.10 : Révélation par le réactif de vanilline sulfurique**

Cette étude qualitative a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans les deux fractions (fluorescence jaune, noire violette et bleue) sous la lampe UV [35]. Grâce aux systèmes d'élution, nous avons mis en évidence dans les deux extraits étudiés, des polyphénols et les tanins.

### **III.7. La chromatographie sur papier**

A l'utilisation de papier monodimensionnel pour les phases butanol et acétate d'éthyle, nous observons deux spots indiquant la séparation d'au moins deux molécules différentes dans chaque phase dans le système de AcOH 15%. Dans le système de migration BAW trois spots pour la phase butanolique et deux spots pour la phase acétate d'éthyle. Les résultats résumés dans le tableau III.7 :

**Tableau III. 7** : Les résultats de papier monodimensionnel

Système	La phase	Spots	Rf
acide acétique /eau (15/85)	Butanol	1	
		2	
	Acétate d'éthyle	1	
		2	
BWA	Butanol	1'	
		2'	
		3'	
	Acétate d'éthyle	2'	
		2'	
		3'	



**Figure III.11** : Papier monodimensionnel dans le système BWA

**Figure III.12**: Papier monodimensionnel dans le système aqueuse.

Afin d'attribuer les résultats de tableau III.5 aux structures appropriées, nous avons essayé de comparer ces résultats avec des études antérieures de P. M. Dey [9], qui donne les flavanones avec leurs propriétés comme la couleur sous UV et les valeurs de Rf dans les deux systèmes BAW et AcOH 15%.

Nous commençons par le spot **2** à Rf= obtenu au système AcOH 15%, cette spot apparaît incolore, ces données est en accord avec (un composé flavonoïdique) voir le schéma III.01

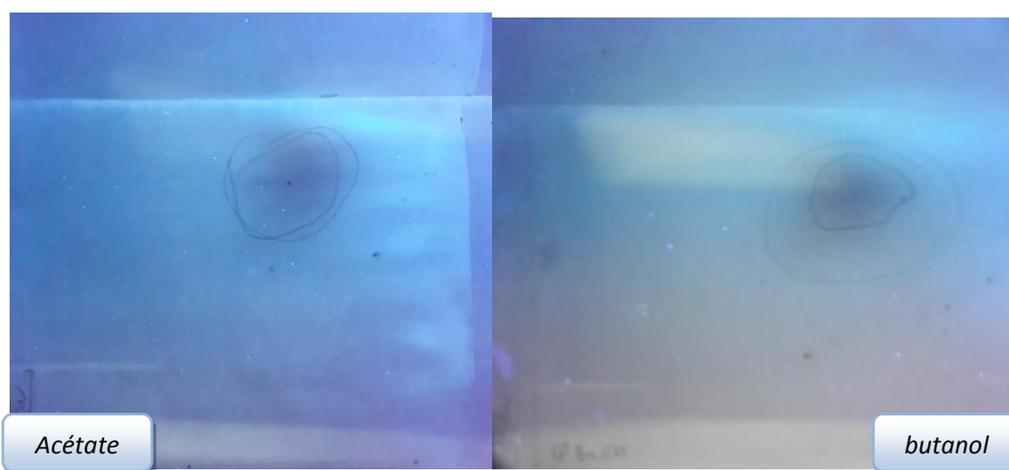
**Schéma III.01**: Structure de

Le spot **2'** de  $R_f = /$  obtenu au système BAW, cette spot apparaît jaune, ces données est en accord avec voir le schéma III.02

### Schéma III.02: Structure

Nous comparons le composé qui donne un spot **1'** à  $R_f=0./$  obtenu au système BAW et un autre spot **1** à  $R_f=0.46$  dans le système AcOH 15% avec un autre travail de J. Brzozowska et P. Hanower[31] qui donne des caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques des principaux phénols des feuilles de *Gossypium*, ces spots conduit à la quercétine, glucose et la quercétine, rhamnose. En effet, S. Heneidak et *Coll.* [30] sont séparés la quercétine avec ses défférents sucres.

À la chromatographie bidimensionnel pour les phases butanol et acétate d'éthyle on observe un seul spot dans chaque phase dans les systèmes des migrations (acide acétique /eau) (15/85) et BAW. Les rapports frontaux donnent les mêmes  $R_f=0.66$ .



**Figure III.13:** Papier bidimensionnel de la phase acétated'éthyle

**Figure III.14 :** Papier bidimensionnel de la phase butanol

Ces résultats indiquent que les 2 extraits contiennent des molécules ayant des propriétés similaires (polarité et masse moléculaire); l'intensité des tâches correspond à des concentrations différentes. Dans notre étude nous basons sur la phase butanolique de feuille à cause de leur quantité élevée  $m=1.08g$  par rapport à la phase d'acétate d'éthyle de feuille  $m=0.11g$ . Aussi, nous utilisons le système AcOH 15% parce qu'il nous donne des spots bien séparés par rapport au système BAW sous la lampe UV.

Le test de concentration montre que la concentration de trois bandes donne des spots bien défini.



**Figure III.15** : Teste de concentration de la phase butanolique.

### III.7.1. Les flavonoïdes isolés de *Pergularia tomentosa L.* par la CP

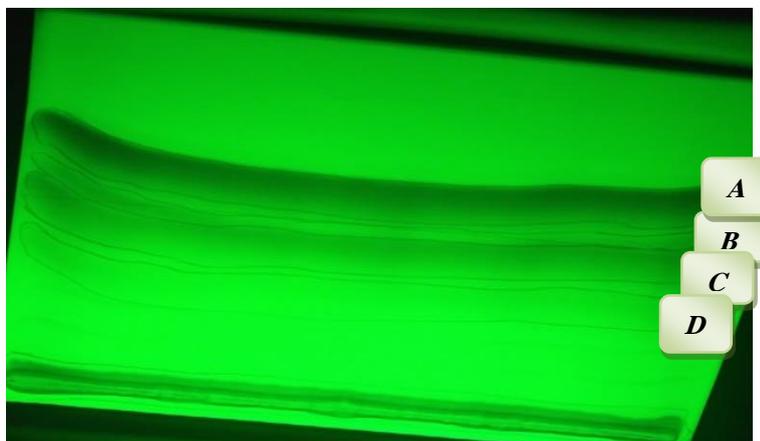
Les flavonoïdes isolés de *Pergularia tomentosa L.* ont été obtenus par la technique de chromatographie sur papier en utilisant comme éluant le système AcOH 15%. Après le développement des chromatogrammes, les bandes correspondant aux composés sont délimitées sous UV à 365 nm. En fin, on observe quatre spots indiquant la séparation d'au moins quatre molécules différentes de système d'AcOH 15%.

**Tableau III. 8** : Les différents spots obtenus de *Pergularia tomentosa L.*, leurs fluorescences sous UV à 365nm, ainsi que leurs Rf sur papier Whatman n°3.

Spots	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
1	Noir	
2	Noir	
3	Bleu	
4	Bleu	

Le test par CCM des fractions (1, 2, 3 et 4) par des systèmes différents permet de sélectionner le meilleur système pour la fraction N°2 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) ().

La purification par CCM préparatif de fraction N°2 par le système d'éluion ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) () permet d'obtenir un produit majoritaire avec des impuretés.



**Figure III.16 :** Le résultat de produit N°2 après 6<sup>ème</sup> migration.

La purification par CCM préparatif de fraction N°2 par le système d'éluion ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) () permet d'obtenir quatre sous-fractions. La première sous-fraction correspondant au composé **A**, la troisième sous-fraction est correspondant au composé **C**. Ces deux sous-fractions sont purifiées sur colonne de séphadex LH-20 avec système d'éluion ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) () pour donner les composés **F3PA** et le composé **F6PC**. Les deux composés **F3PA** et **F6PC** sont testés par CCM avec l'éluant ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) () et nous obtenons un spot de coloration noir qui correspond à un flavonoïde et un spot de coloration jaune fluorescent qui correspond à un chalcone selon (le tableau II.2 et la figure III.17) respectivement.

**Figure III.17:** Les couleurs des spots après la purification sur le séphadex

### III.7.1.1. Identification structurale des flavonoïdes isolés:

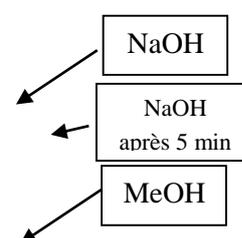
#### a. Analyse spectrale de molécule F3PA:

La fluorescence noire sous UV à 365 nm de la molécule **F3PA** et les pics d'absorption dans la région UV-Vis: BI (379 nm) et BII (243 nm), nous orientent vers la supposition que cette molécule fait partie des flavonols (3-OH libre).

##### Série I :

Les effets bathochromiques (+nm) de la bande I en présence de NaOH, et la stabilité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C4', l'absence de pic entre 320- 335nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique que le 7-OH est substitué.

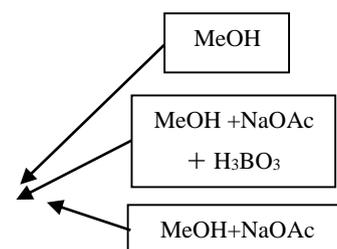
Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	243	379
MeOH + NaOH	/	/
NaOH après 5 min	/	



##### Série II :

Le faible déplacement de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution en C7. La comparaison du spectre NaOAc +H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH donne (-nm) de la bande I, cette résultat ne donne aucune information.

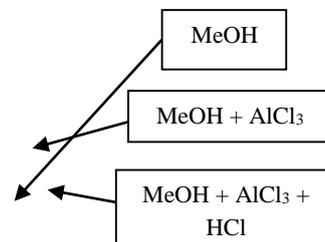
Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH		
MeOH + NaOAc		
MeOH + NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		



### Serie III:

L'effet bathochromique du spectre d' $\text{AlCl}_3$  par rapport au spectre méthanol (+nm) confirme que cette molécule dispose d'un OH libre en C5. Suite à une comparaison du spectre  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  par rapport au spectre  $\text{AlCl}_3$ : faible déplacement hypochrome.

Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH		
MeOH + $\text{AlCl}_3$		
MeOH + $\text{AlCl}_3$ + HCl		



**Structure proposée:** d'après tous les critères cités précédemment et en absence de spectre de  $\text{RMN}^{\text{H}}$ , on propose donc une schématisation de la molécule **F3PA** comme suit:

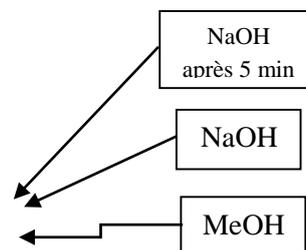
### b. Analyse spectrale de molécule F6PC:

La fluorescence jaune sous UV à 365 nm de la molécule **F6PC** et les pics d'absorption dans la région UV-Vis: BI (360 nm) et BII (245 nm), nous orientent vers la supposition que cette

#### Série I :

Les effets bathochromiques (+nm) de la bande I en présence de NaOH, et l'augmentation d'intensité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C4.

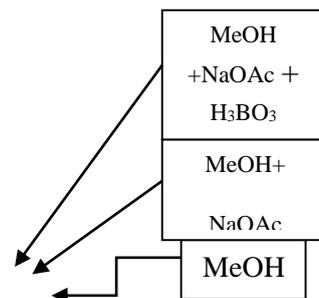
Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH		
MeOH + NaOH		
NaOH après 5 min		



#### Série II:

Le faible déplacement de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une hydroxyle en C4 ou C4'. La comparaison du spectre  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$  par rapport au spectre MeOH donne (+nm) de la bande I, cette résultat confirme l'existence d'ortho-hydroxyle en cycle A.

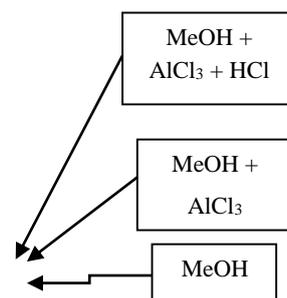
Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH		
MeOH + NaOAc		
MeOH + NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		



**Série III :**

L'effet bathochromique du spectre d'AlCl<sub>3</sub> par rapport au spectre méthanol (+) confirme que cette molécule contient en cycle A.

Réactive utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH		
MeOH + AlCl <sub>3</sub>		
MeOH + AlCl <sub>3</sub> + HCl		



**Structure proposée:** d'après tous les critères cités précédemment et en absence de spectre de RMN<sup>H</sup>, on propose donc une schématisation de la molécule **F6PC** comme suit:

**Tableau III.9 :** Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des chalcones en présence des différents réactifs [41].

Réactifs	Déplacements ennm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	220-270	340-390	Chalcone
NaOH	60 à 100 nm BI avec augmentation d'intensité		4-OH
	60 à 100 avec stabilité d'intensité		Pas 4-OH et 2-OH ou 4'-OH
AlCl <sub>3</sub> +HCl/ MeOH	40 à 70 nm		Ortho hydroxyle en cycle B

	48 - 64 nm 40 nm	Ortho hydroxyle en cycle A 2' -hydroxychalcones 2',3',4'-trihydroxychalcone et ses dérivés
NaOAc / MeOH	Epaulement Le spectre se décomposer	4'-OH ou 4-OH trois groupes hydroxyles adjacents
NaOAc +H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / MeOH	28 à 36 nm Faible déplacement	Ortho-hydroxyle en cycle B Ortho-hydroxyle en cycle A

### III.8. Les composés isolés de *Pergularia tomentosa L.* par chromatographie de colonne CC:

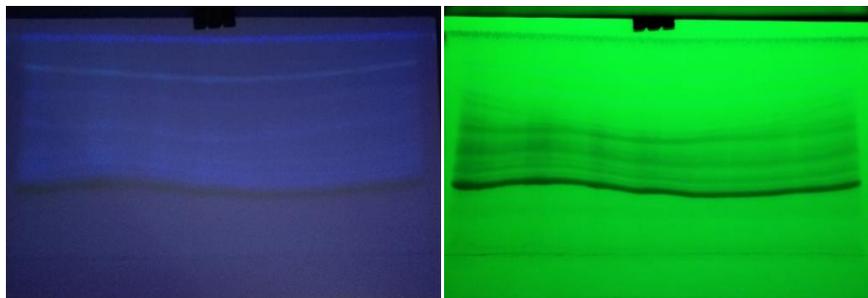
La technique de chromatographie sur colonne de gel de silice est utilisée pour isoler des composés du mélange de phase butanolique de *Pergularia tomentosa L.*, dont on a pu collecter 51 fractions de 14 ml (voir le tableau II.3) , le contrôle de ces fractions sur des plaques de gel de silice nous a permis de sélectionner celles qui représentent des spots bien distingué sous UV à 365 nm.

**Figuer III.18:** Plaques CCM des déférents fraction révéle par la vaniline sulfurique.

Les fractions rassemblées sont testées par différent système à fin de choisi le meilleur système pour séparer des produits purs :

**Etude de la fraction 18+19(E) :**

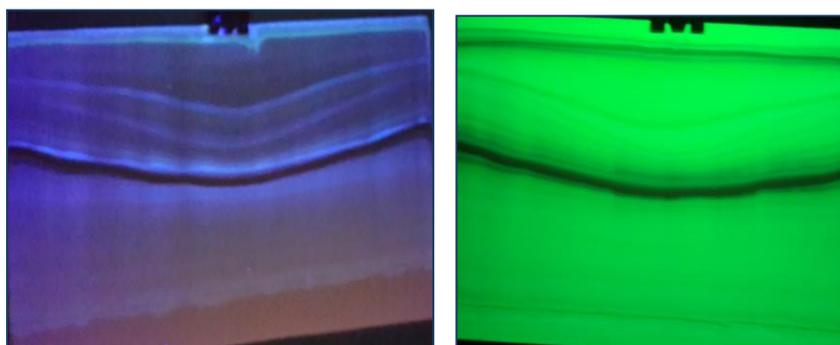
La fraction 18+19 (0.04mg) a été chromatographiée sur une plaque de gel de silice en phase normale éluee avec un système de (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) () Après une élution répétée 5 fois dans ce système du solvant, on a obtenu 4 produits purs (voir le Fig. III.19).



**Figuer III.19** : Plaque sous la lampe UV  $\lambda = 365$ ,  $\lambda = 254$  de fractions 18 et 19

#### Etude de la fraction 20+21+22(F) :

La fraction 20+21+22 (0.1375mg) a été chromatographiée sur une plaque de gel de silice en phase normale éluee avec un système de (CHCl<sub>3</sub>/ MeOH/Mec) () Après une élution plusieurs fois dans ce système du solvant, on a obtenu 4 produits purs.



**Figure III.20:** Plaque sous la lampe UV  $\lambda = 365$ ,  $\lambda = 254$  de fraction 20-21 et 22

Les testes par CCM des 4 produits isolés dans les deux fractions montre que ces produits presque les même.

**Figure III.21:** Plaque sous la lampe des 4 produits des fraction E et F

Nous pouvons donc conclure que la séparation d'extrait butanolique de *Pergularia tomentosa* par la chromatographie sur colonne, contiennent un nombre considérable de constituants visibles sur les profils chromatographiques.

L'étude des fractions E et F a permis de séparer 4 produits dans chaque fraction. Les tests effectués sur les fractions E et F montrent que ces fractions contiennent des produits presque les mêmes et qui peuvent être identifiés par les techniques spectroscopiques non disponibles dans notre travail

[Titre du document]

*Conclusion :*

---

## Conclusion:

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés tels que les tanins, les composés réducteurs, les cardionolides, les terpenoïdes, les stéroïdes, les saponines, les quinones libers et les protéines.

L'analyse quantitative des extraits par dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a révélé des teneurs importantes se variant de tiges aux feuilles.

Par ailleurs, certains extraits possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils ont montré une réduction très importante de molybdène Mo (VI).

En utilisant les méthodes chromatographiques : CCM (gel de silice), CP et colonne de gel de silice et séphadex, on a pu montrer sous UV la présence des bandes d'absorption de composés phénoliques et stérols en se basant sur les extraits acétate d'éthyle et n-butanol en comparant le nombre, la couleur et les R<sub>f</sub> des taches.

Les structures des produits isolés ont été déterminées par une étude directe au spectrophotomètre UV-Vis.

L'étude phytochimique menée sur *Pergularia tomentosa* a permis l'obtention de huit produits purs. Parmi lesquels nous avons proposé la structure de deux produits.

Ces composés sont indiqués ci-dessous :

En fin nous espérons que ce travail constitue une modeste contribution dans la mise en valeur de la flore algérienne méconnue jusqu'à ce jour.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Concernant l'identification et la purification d'autres flavonoïdes plus rares chez *P. tomentosa* qui n'ont pas été ciblés dans le présent travail à savoir les chalcones et des autres flavonoïdes sucrés, à ce jour et à notre connaissance, n'ont jamais été caractérisés quant à leurs activités biologiques. D'autres molécules appartenant à des classes chimiques différentes comme les coumarines, les alcaloïdes; les stéroïdes pourraient être également visées pour leur activité potentielle thérapeutique ou cosmétique... En effet, la présence d'alcaloïdes potentiellement intéressants pour le traitement des morsures de serpent et de scorpion.
- ✓ La réalisation d'une analyse structurale par RMN permet la détermination de la structure exacte des substances à analyser.
- ✓ Identification des molécules responsables de l'activité biologique.

- ✓ Elargir le panel des activités antioxydants in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques: antidiabétique et anti-inflammatoire.

## Références:

- [1] BRUNETON J.; Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, 5<sup>e</sup> édition, Lavoisier, p IV, Itali (2016).
- [2] World Health Organization, *WHO traditional medicine strategy* (2002).
- [3] QUEZEL P., SANTA S.; Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.) Tome 2, Paris (1963).
- [4] KEMASSI A., DAREM S., CHERIF R., BOUAL Z., SADINE S. E., AGGOUNE M.S., OULD EL HADJ-KHELIL A. et OULD ELHADJ M. D.; *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 1(1), pp 1-5 (2014).
- [5] FOCKE A. et ULRICH M.; *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Asclepiadaceae*, Published by Springer Berlin Heidelberg (2004).
- [6] DEVAUX C.; Plantes toxiques ou réputées toxiques pour le bétail en Afrique de l'ouest., *Service Agrostologie* (1973).
- [7] TLILI M. L. ; Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional), mémoire de magister, université d'Ouargla (2015).
- [8] HOSSEINI KAHNOUJ SH, AYYARI M., AZARNIVAND H., PIACENTE S. et ZARE CHAHOUKI MA; *Journal of Medicinal Plants* (2017).
- [9] DEY P.M.; *Methods in plant Biochemistry* volume 1, 1<sup>st</sup> Edition (1989).
- [10] LAHMAR I., BELGHITH H., BEN ABDALLAH F. et BELGHITH K.; *BioMed Research International*, pp 1-9 (2017).
- [11] AL-MEKHLAFI N. A. et MASOUD A.; *Indo American Journal of Pharmaceutical sciences*, 4 (11), pp 4558-4565 (2017).
- [12] OULD EL HADJ M.D., HADJ-MAHAMMED M. et ZABEIROU H.; *Courrier du Savoir*, 3, pp 47-51 (2003).
- [13] HASSAN S.W., UMAR R.A., LADAN M.J., NYEMIKE P., WASAGU R.S.U., LAWAL M. et EBBO A.A.; *International Journal of Pharmacology*, 3(4), pp 334-340 (2007).
- [14] ROYER M.; Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs, thèse de doctorat, Université de Lorraine (2013).
- [15] FIDELE N.K. et JOSEPH N. Y.; *RSC Advances*, 00 (1-3), pp 1-26 (2014).
- [16] MANSOUR S.A., ABDUL HAMEED U. KADER T. et MOHAMED S. H.; *Int. J. Crude Drug Res*, 26 (1), pp 9-16 (1988).
- [17] LAHMAR I., RADEVA G., MARINKOVA D., VELITCHKOVA M., BELGHITH H., BEN ABDALLAH F., YOTOVA L. et BELGHITH K.; *Process Biochemistry*, 64, pp 143-151 (2018).
- [18] PIACENTE S., MASULLO M., DE NEVE N., DEWELLE J., HAMED A., KISS R. et MIJATOVIC T.; *J. Nat. Prod.*, 72, pp 1087-1091 (2009).
- [19] HUSSEIN H.I., AL-RAJHY D, EL-SHAHAWI F.I. et HASHEM S.; *Int J Pest Manag*, 45, pp 211-213 (1999).
- [20] BERREGHIOUA A.; Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*, thèse de doctorat, Université de Tlemcen (2016).
- [21] SINGLETON V.L. et ROSSI J.A.; *J. Eol. Vitic*, 16, pp 144-158 (1965).
- [22] BELGUIDOUM M. et al.; *Der Pharma Chemica*, 8(1), pp 22-27 (2016).
- [23] MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. et KEFALAS P.; *Food Chemistry*, 89(3), pp 411-420 (2005).

- [24] FOURNET A. et MUÑOZ A. V.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(11), pp 1213-1235 (2002).
- [25] BOUBEKRI C; Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques, thèse de doctorat, Université de Biskra (2014).
- [26] PRIETO P., PINEDA M., AGUILAR M.; *Anal Biochem*, 269, pp 337-341 (1999).
- [27] DANGOGGO S. M., FARUQ U. Z. et HASSAN L.G; *Sakata Journal of Veterinary Sciences*, 4(2) (2002).
- [28] BRUNETON J.; Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, p 1234, Paris (2009).
- [29] FUKUSHIMA Y., OHIE T., YONEKAWA Y., YONEMOTO K., AIZAWA H., MORI Y., WATANABE M., TAKEUCHI M., HASEGAWA M., TAGUCHI C. et KONDO K.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), pp 1253-1259 (2009).
- [30] HENEIDAK S., GRAYER R.J., KITE G.C. et SIMMONDS M.S.J.; *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, pp 575-584 (2006).
- [31] BRZOZOWSKA J. et HANOWER P.; sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers, Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences), tome XII, pp 65-87 (1976).
- [32] SCHOFIELD P., MBUGUA D.M. et PELL A.N.; *Feed Sci. Technol*, 91, pp 21-40 (2001).
- [33] COWAN M.M.; *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), pp 564-582 (1999).
- [34] SULIMAN M.A et YASSER A.E; *International Journal of Plant Science and Ecology*, 3(2), pp 7-15 (2017).
- [35] LABED A.; Investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Astragalus armatus* ssp. *numidicus* (Coss. Et Dur.) Maire. Et Synthèse catalytique de nouveaux dérivés julolidines, thèse de doctorat, université de Constantine (2016).
- [36] RAHMANI Z.; Etude de la relation structure-activité antioxydante et antihémolyse des érythrocytes humaines par quelques dithiole thiones et composés phénoliques, thèse de doctorat, université d'Ouargla (2015).
- [37] SINE J. P; *Ellipses editions marketing S A*, pp 99-101 (2003).
- [38] LATIFOU L.; Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes beninoises, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg (2005).
- [39] SENNBAD B. et BREMER B.; *Pl. Syst. Evol.*, 202, pp153-175 (1996).
- [40] LAHOUEL M.; Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat Université de Constantine (2005).
- [41] MABRY T. J., MARKHAM K. R. et THOMAS M. B.; The Systematic Identification of Flavonoïdes, 1<sup>er</sup> édition, Springer-Verlag, New York (1970).
- [42] ZEGHAD N.; Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, thèse de doctorat, Université de Constantine (2009).
- [44] Villars G.; Chromatographie sur couche minces. *Tec et Doc(Ed)*, (Paris), p 370 (1971).
- [45] ANJANEYULU A. S. R., Row L. R. et SUBRAHMANYAM C.; *Tetrahedron*, 22, pp 2179-2182 (1972).
- [46] SHARADANAND PHATAK R., ANUP S.H.; *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (5), pp 32-35 (2014).

## Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels, les métabolites secondaires de plante *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) a été étudié, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante. L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation des techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, ont permis d'isoler deux composés dont deux dérivés flavonoïdiques: Ces composés dont la structure a pu être partiellement déterminée. Les résultats obtenus dans des essais biologiques montrent une bonne activité antioxydante. Comme exemple, parmi les extraits de *Pergularia tomentosa*, les extraits d'acétate feuilles et butanol feuilles ont montré des activités antioxydantes très importantes par rapport aux autres extraits au cas d'inhibition de DPPH•.

**Mots clés:** *Pergularia tomentosa*, Asclepiadaceae, spectroscopiques, DPPH•.

## Abstract:

As part of the search for new natural compounds, the secondary metabolites of plant *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) were studied, as well as the evaluation of the antioxidant activity. The isolation of the compounds and their purification, based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination using physicochemical and spectroscopic techniques, such as ultraviolet, have made it possible to isolate two compounds including two flavonoid derivatives: These compounds whose structure could be partially determined. The results obtained in the biological tests show a good antioxidant activity. As an example, among the extracts of *Pergularia tomentosa*, the extracts of acetate leaves and butanol leaves showed very important antioxidant activities compared to the other extracts in case of inhibition of DPPH•.

**Keywords:** *Pergularia tomentosa*, Asclepiadaceae, spectroscopic, DPPH•

## المخلص:

في إطار البحث على مركبات طبيعية جديدة، ونواتج الايض الثانوية لنبتة *Pergularia Temontosa* من عائلة Asclepiadaceae، تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لهذه النبتة. فصل المركبات و تنقيتها تعتمد على استعمال الطرق الكروماتوغرافية و تحديد بنيتها يكون باستعمال التقنيات الفيزيوكيميائية و المطيافية فوق البنفسجية، و باستخدام هذه الطرق تمكنا من فصل مركبين فلافونويدين مختلفين و هما: - ، هذين المركبين حددت بنيتهما جزئيا. النتائج المتحصل عليها من خلال التجارب البيولوجية بينت أن لهذه النبتة نشاطية مضادة للأكسدة معتبرة على سبيل المثال: من بين مستخلصات النبتة، المستخلصين اسيتات أوراق و بيوتانول أوراق أعطى فعالية مضادة للأكسدة معتبرة مقارنة بمختلف المستخلصات الأخرى و ذلك في حالة تثبيط الجذر الحر DPPH•.

الكلمات المفتاحية: *Pergularia Temontosa* ، Asclepiadaceae ، المطيافية ، DPPH•.