

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad DAHLAB BLIDA 1
Faculté de Technologie

Département Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Génie Chimique

Intitulé du mémoire

**Optimisation des paramètres d'extraction
des molécules organiques
À partir d'une plante algérienne Saharienne**

Présenté par :

Melle CHIKHAOUI Imane

Melle BAYAH Maria

Encadré par :

M. CHEURFA Zahia

Promotion 2024

RESUMES

ملخص:

كان الهدف من هذه الدراسة هو تحسين معايير استخلاص القلويدات من نبات جزائري من فصيلة الإيفيدراس في الماء الحمضي باستخدام منهجية سطح الاستجابة. ولتحقيق هذه الغاية، اخترنا خمسة متغيرات هي: درجة الحرارة، وزمن الاستخلاص، والنسبة (نسبة كتلة النبات إلى المذيب)، وتركيز حمض HCL ومعامل التجزئة. وقد مكنتنا النتائج التي تم الحصول عليها من تحديد الظروف المثلى، أي درجة حرارة 30 درجة مئوية، وزمن استخلاص 3 ساعات، وتركيز حمض HCl 0.1 مول/لتر، ونسبة 1:20 ومعامل تقسيم يساوي 2، مما أدى إلى الحصول على محصول 6.8%. سمحت لنا هذه النتائج بملاحظة أن أفضل معامل يؤثر على هذا الاستخلاص هو وقت الاستخلاص وأفضل تفاعل بين درجة الحرارة والنسبة.

الكلمات الرئيسية: التحسين الأمثل، منهجية سطح الاستجابة، قلويدات، الإيفيدرا، الاستخلاص

Abstract:

The aim of this study is to optimize parameters for the extraction of alkaloids from an Algerian plant of the Ephedrace family in acidic water using response surface methodology. To this end, we chose five variable parameters: temperature, extraction time, ratio (plant mass/solvent ratio), HCL acid concentration and partition coefficient. The results obtained enabled us to determine the optimum conditions, that is, a temperature of 30°C, extraction time of 3 hours, HCl acid concentration of 0.1 mol/L, a ratio of 1:20 and a distribution coefficient equal to 2, leading to a yield of 6.8%. These results allowed us to note that the best parameter influencing this extraction is the extraction time, and the best interaction is between temperature and ratio.

In parallel, extraction by two conventional methods in polar organic solvents: methanol and ethanol, gave extraction results equal to 1.6% and 1.5%.

During this study, we carried out a qualitative HPLC analysis to identify the alkaloids extracted from the plant, based on their retention time, which was 1.99 min, compared with 2.00 min for standard compounds.

Keywords : optimization, response surface methodology, alkaloids, Ephedra, Extraction

Résumé :

Cette étude a pour but l'optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes à partir d'une plante algérienne de la famille des Ephédrace dans l'eau acide par la méthodologie des surfaces de réponses. À cet effet, nous avons choisi cinq paramètres variables : la température, le temps d'extraction, le ratio (rapport masse végétale/solvant), la concentration de l'acide HCL et le coefficient de partage. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer les conditions optimales, à savoir une température de 30 °C, le temps d'extraction 3 heures, une concentration de l'acide HCl de 0,1 mol/L, un ratio de 1 : 20 et un coefficient de partage égal à 2 conduisant à un rendement de 6,8 %. Ces résultats obtenus nous ont permis de noter que le meilleur paramètre influençant cette extraction est le temps d'extraction et que la meilleure interaction est entre la température et le ratio.

En parallèle, une extraction par deux méthodes conventionnelles dans les solvants organiques polaires : le méthanol et l'éthanol nous ont permis d'avoir des rendements d'extraction égaux à 1,6 % et 1,5 %.

Durant cette étude, nous effectuons l'analyse qualitative par HPLC permettant l'identification des alcaloïdes extraits à partir de la plante végétale en se basant sur leur temps de rétention qui est égal à 1,99 min, devant le temps de rétention des composés standard égal à 2,00 min.

Mots clés : optimisation, méthodologie des surfaces de réponses, alcaloïdes, Ephédra, Extraction

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont tout premièrement à Dieu tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a données durant toutes ces longues années.

Nous exprimons notre gratitude et notre remerciement à notre promotrice Mme **Cheurfa Zahia**, professeure au département de génie des procédés à l'université de Blida, de nous avoir encadré pour ces orientations, ses conseils qu'elle nous a prodigués et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Nous voudrions adresser nos vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger notre travail.

Nous remercions tous les ingénieurs de laboratoire.

Cela va de soi, nous remercions évidemment nos familles pour son irremplaçable et inconditionnel soutien, un grand merci pour nos chers parents.

Imane et Maria

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, pour leur amour inestimable, leur confiance,

Leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer et qui m'ont

Toujours encouragés et soutenus dans toute décision que je prends dans ma vie, que Dieu les

Garde en bonne santé et leur offre une longue vie.

Ma chère mère et mon cher père

Mes chères sœurs et frères, source de joie et de bonheur

À tous, ma famille, source d'espoir et de motivation

À ma chère binôme : Imane

J'ai partagé avec elle les joies et les difficultés au suivi de notre travail.

À tous mes chers amis.

Pour votre fidèle amitié et les moments passés ensemble tout au long de mes études et en
dehors

Enfin, à tous ceux qui savent donner sans recevoir et qui aident sans retour.

Bayah Maria

Dédicace

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont

Toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines.

C'est avec émotion que je leur exprime toute mon affection, mon admiration et

Mon profond respect.

J'espère que par ce modeste travail je vous rends un peu de ce sentiment de fierté.

Que j'éprouve d'être votre fille.

À mes très chères sœurs et frères

À ma chère copine Maria qui a partagé le travail avec moi.

À mes amies Meroua Zelmat, Nadjlaa Ziani, Rofaida Medani et Aya kheddar

Et

À tous ceux que j'aime

Imane.CH

TABLE DES MATIERES

Résumé

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures et les graphes

Liste des tableaux

Abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I : Généralités sur les alcaloïdes.

I.1 Historique :3

I.2 Généralités :3

I. 3 Distribution et localisation :4

 I.3.1 Distribution :4

 I.3.2 Localisation :4

I.4 Définition des alcaloïdes :4

I.5 Nomenclature des alcaloïdes :5

I.6 Classification et structure chimique des alcaloïdes :5

 I.6.1 Les alcaloïdes vrais :5

 I.6.2 Les pseudo-alcaloïdes5

 I.6.3 Les proto–alcaloïdes :6

I.7 Propriétés des alcaloïdes :9

 I.7.1 Propriétés toxiques :9

 I.7.2 Propriétés pharmacologiques :10

 I.7.3 Propriétés physiques et chimiques :10

 I.7.4 Autres propriétés :11

Chapitre II: Généralités sur l'extraction et le plan d'expérience.

II.1 Introduction :12

II.2 Principe de l'extraction solide liquide :12

II.3 Principe de L'extraction liquide-liquide :13

II.4 Méthodes d'extraction des alcaloïdes :14

| | |
|---|----|
| II.4.1. Extraction des alcaloïdes par l'eau acidifiée : | 14 |
| II.4.2 Extraction par les solvants organiques apolaires : | 14 |
| II.4.3 Extraction par les solvants organiques polaires : | 15 |
| II.5 Extraction par les méthodes conventionnelles : | 15 |
| II.5.1 Extraction par macération : | 15 |
| II.5.2 Extractions par Soxhlet : | 16 |
| II.6 Paramètres influençant l'extraction : | 17 |
| II.6.1 La température : | 17 |
| II.6.2 Temps d'extraction : | 18 |
| II.6.3 Influence du solvant : | 18 |
| II.6.4 Rapport solvant-solide : | 19 |
| II.6.5 Influence de l'agitation : | 19 |
| II.6.6 Influence du pH : | 19 |
| II.6.7 Taille des particules : | 20 |
| II.6.8 Coefficient de partage : | 20 |
| II.7 Généralités sur les plans d'expériences : | 21 |
| II.7.1 Définition des plans d'expériences : | 21 |
| II.7.2 Les Facteurs : | 21 |
| II.7.3 Réponse : | 21 |
| II.7.4 Les objectifs des plans d'expériences : | 21 |
| II.7.5 Principaux avantages des plans d'expériences : | 22 |

Chapitre III: Matériels et méthodes.

| | |
|--|----|
| III.1 Introduction : | 23 |
| III.2 Tableau des réactifs : | 23 |
| III.3 Préparation du Matériel végétale : | 24 |
| III.4 Préparation de la poudre végétale : | 24 |
| III.5 Détermination du taux d'humidité : | 24 |
| III.6 l'extraction des alcaloïdes par l'eau acidifiée : | 25 |
| III.6.1 Première étape : | 25 |
| III.6.2 Deuxième étape : | 25 |
| III.7 Détermination du rendement d'extraction des alcaloïdes : | 26 |
| III.8 Caractérisation des alcaloïdes : | 26 |
| III.8.1 Préparation de Réactif de Mayer : | 27 |

| | |
|--|----|
| III.8.2 Préparation de réactif de Bouchardat : | 27 |
| III.9 Extraction par les méthodes conventionnelles : | 28 |
| III.9.1 Extraction par macération : | 28 |
| III.9.2 Extraction par solvant sur le montage de Soxhlet : | 28 |
| III.10 Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) : | 29 |
| III.11 Plan d'expérience : | 29 |
| III.11.1 Choix de plan d'expérience : | 29 |
| III.11.2 La matrice expérimentale : | 30 |
| III.11.3 Exploitation des résultats : | 32 |
| III.11.4 Logiciel MODDE 6 : | 32 |

Chapitre IV: Résultats et discussions.

| | |
|--|----|
| IV.1 Introduction : | 33 |
| IV.2 Détermination du taux d'humidité : | 33 |
| IV.3 Test phytochimique : | 33 |
| IV.4 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) : | 34 |
| IV.5 Matrice expérimentale : | 34 |
| IV.6 Etude statistique : | 36 |
| IV.6.1 Modélisation mathématique : | 38 |
| IV.6.2 Effets des facteurs étudiés sur le rendement : | 38 |
| IV.7 Prédiction des résultats : | 42 |
| IV.7.1 La relation entre la réponse et les interactions entre les facteurs : | 42 |
| IV.8 Matrice des optimums : | 51 |
| IV.9 Résultats des méthodes conventionnelles : | 51 |
| IV. Discussion des résultats : | 52 |
| Conclusion..... | 54 |

Les références

LISTE DES ABRIVIATIONS

| | |
|--------------------------------|---|
| SNC | Système nerveux central. |
| UV | Ultraviolet |
| Ph | Potentiel hydrogène |
| H ₂ SO ₄ | Acide sulfurique |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| HPLC | Chromatographie liquide haute performance |
| RP | Pourcentage de réduction |
| UV-Vis | Ultraviolet-visible |

LISTE DES FIGURES ET LES GRAPHES

| | |
|--|----|
| Figure II.1 : Schéma d'extraction par solvant..... | 13 |
| Figure II.2 : Les étapes d'une extraction par macération..... | 15 |
| Figure II.3 : Montage d'extraction de Soxhlet..... | 17 |
| Figure III.1 : Feuilles de la plante végétale..... | 24 |
| Figure III.2 : Résidu sec des alcaloïdes extraits..... | 26 |
| Figure III.3 : Solutions de réactifs de Bouchardat et le réactif de Mayer..... | 27 |
| Figure IV.1 : Les précipités obtenus après l'ajout des réactifs de Mayer et Bouchardat..... | 33 |
| Figure IV.2 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du temps et de la température..... | 42 |
| Figure IV.3 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du Ratio et du Temps..... | 43 |
| Figure IV.4 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction de la température et de la concentration..... | 43 |
| Figure IV.5 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du température et du ratio..... | 44 |
| Figure IV.6 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du ratio et de concentration..... | 44 |
| Figure IV.7 : Carte contours de la variation du Rendement en Fonction de la concentration et du coefficient de partage..... | 45 |

| | |
|---|----|
| Figure IV.8 : Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du ratio et du coefficient de partage..... | 46 |
| Figure IV.9: Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du temps et de la concentration..... | 46 |
| Figure IV.10: Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du temps et du coefficient de partage..... | 47 |
| Figure IV.11 : Carte contours de la variation du Rendement en Fonction de la température et de coefficient de partage..... | 47 |
| Graphique IV.1 : Chromatogramme en HPLC des alcaloïdes extraits de la plante Ephédra..... | 34 |
| Graphique IV.2: Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction de modèle..... | 36 |
| Graphique IV.3 : Comparaison entre les données expérimentales et le modèle de prédiction de rendement..... | 37 |
| Graphique IV.4: Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction de modèle..... | 38 |
| Graphique IV.5: Influence des effets sur la réponse..... | 39 |
| Graphique IV.6 : Classification des variables selon l'importance de leur effet sur la réponse..... | 41 |
| Graphique IV.7 : Courbes de variation du rendement en fonction de temps, température et la concentration..... | 48 |
| Graphique IV.8 : Courbes de variation du rendement en fonction de ratio et le coefficient de partage..... | 50 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I.1 : Structure de quelques alcaloïdes..... | 6 |
| Tableau III.1 : Les réactifs utilisés | 23 |
| Tableau III.2 : plan de matrice expérimentale..... | 30 |
| Tableau III.3 : Matrice d'expériences..... | 31 |
| Figure IV.1 : Matrice des essais de plan d'expérience..... | 35 |
| Tableau IV.2 : Matrice des optimums..... | 51 |
| Tableau IV.3 : les résultats des différents techniques d'extraction..... | 52 |

Introduction générale

Le Sahara algérien est constituée de 500 espèces végétales, dont on dénombre 162 espèces endémiques dans le Sahara seul et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Plusieurs de ces espèces sont connues par leurs propriétés thérapeutiques remarquables [1].

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des maladies vient habituellement de la croyance qu'elles présentent une très faible toxicité du fait de leur origine naturelle. Selon l'Organisation mondiale de la santé, autour de 80 % de la population du monde emploie la médecine traditionnelle pour le soin de santé. Ces études ont pour but, d'une part, de confirmer les propriétés thérapeutiques et, d'autre part, l'identification des principes actifs à l'origine des vertus attribuées aux plantes [2].

Les alcaloïdes existent, dans les plantes, sous forme saline. L'extraction des alcaloïdes repose, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part [3].

En raison de la valeur élevée des alcaloïdes, des recherches mondiales ont tenté de trouver de nouvelles méthodes d'extraction et d'estimation de ces composés [4].

Pour une bonne extraction, il ne suffit pas de prendre en considération la solubilité du soluté désiré ou non désiré. L'extraction solide-liquide à partir de la matrice végétale est une opération unitaire complexe en raison de la nature même du substrat. Les résistances au transfert de matière dues à la structure végétale et la localisation des composés recherchés peuvent être déterminantes.

Le présent travail consiste à l'étude d'optimisation et d'amélioration des paramètres d'extraction des alcaloïdes à partir de l'espèce végétale Ephédra originaire de la région d'Oued Souf.

C'est dans ce cadre que nous avons réalisé ce travail pour déterminer les paramètres conduisant à une extraction solide-liquide optimale des alcaloïdes dans l'eau acide à partir d'une espèce végétale saharienne algérienne en utilisant les plans d'expériences.

Le présent mémoire comporte deux parties principales :

- Une partie bibliographique composée essentiellement de deux chapitres portant sur des généralités sur les alcaloïdes et sur les différents paramètres qui influent sur la technique d'extraction solide-liquide par la méthode des plans d'expériences.
- Une partie expérimentale où l'on décrit en détail en troisième chapitre les différents modes opératoires et le matériel utilisés lors de l'extraction des alcaloïdes, ainsi que le plan d'expérience établi qui permet d'optimiser les différents paramètres d'extraction. Le quatrième chapitre est réservé aux résultats expérimentaux obtenus ainsi qu'à leurs interprétations.

En dernier, nous terminons avec une conclusion générale et les recommandations à suivre en future.

I.1 Historique

Le terme alcaloïde a été introduit pour la première fois en 1818 par le pharmacien W. Meissner (1792-1853) en Allemagne. [5]

De 1817 jusqu'à 1821 les deux pharmaciens Pierre Joseph Pelletier et Joseph Benaim Ceventou, découvrent une large gamme de principes actifs tels que la brucine, la fébrifuge, la quinine, caféine et vératrine. Cependant ces molécules isolées sont des combinaisons d'alcaloïdes non pas d'alcaloïdes pure.

Depuis la nuit des temps, l'homme a pu explorer différentes plantes à fort effet biologique au tant que médicament, poison, excitant... On cite l'exemple de la quinine qu'était utilisée sous forme d'herbe par les autochtones d'Amérique pour le traitement du paludisme en 1638. [6]

Si la notion d'alcaloïdes est assez récente, la connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne voire plusieurs millénaires. [3]

I.2 Généralités

Les alcaloïdes sont des composés chimiques aux effets antiprolifératifs et anticancéreux, représentant un groupe important de médicaments anticancéreux d'origine végétale. [7]

Les alcaloïdes sont un groupe de composés chimiques naturels aux propriétés diverses et aux usages médicaux variés, notamment anti-inflammatoires, antifongiques et antibactériens. [8]

Les alcaloïdes dérivés des plantes jouent un rôle crucial dans la protection des plantes contre les herbivores et les pathogènes, et leur production a été stimulée par des stratégies d'ingénierie enzymatique et des techniques de biologie moléculaire et structurale [9].

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ce sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote [10]. Ils exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, Ils jouent plusieurs activités pharmacologiques : Analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), dégrisant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphédrine), etc.... [11]. Ils présentent aussi une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologique, pharmacologique et écologique ; mais possèdent aussi des effets toxiques.

[12]. Ils sont un groupe diversifié de composés à faibles poids moléculaires, contenant de l'azote dérivés principalement d'acides aminés et trouvés dans environ 20% des espèces végétales [13].

I. 3 Distribution et localisation

I.3.1 Distribution

Les alcaloïdes sont présents essentiellement chez les Angiospermes dont la plupart sont des Dicotylédones. Cependant, de nombreux alcaloïdes ont également été trouvés chez des Monocotylédones (Liliacées, Poacées) et même chez des Gymnospermes (Ephédra). Les Ptérydophytes sont rarement alcaloïdifères [14]. Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, même si elles contiennent parfois un composé très majoritaire (ex. ; hyoscyamine de la feuille de belladone) mais, il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même drogue, voire des centaines (cas de la pervenche de Madagascar).

I.3.2 Localisation

La synthèse des alcaloïdes s'effectue généralement dans des sites précis (racines en croissance, cellules spécialisés de laticifère... etc.). Ils sont ensuite transportés dans leurs sites de stockage. Les alcaloïdes sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques ; assises externes des écorces de tige et de racine, téguments des graines, etc. et rarement dans les tissus morts. Au niveau cellulaire, la synthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique et le stockage dans les vacuoles [15].

Les alcaloïdes naturels qui se trouvent dans certains organes ou parties de la plante ne suggèrent pas logiquement qu'ils soient synthétisés ou formés dans ces organes. On prend exemple des alcaloïdes trouvés dans plusieurs espèces de *Datura* et les espèces *Nicotiana*, sont invariablement formés dans les racines, mais sont rapidement transférés vers les feuilles [15 ; 16].

I.4 Définition des alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale et rarement animale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique [17 ; 18] et douée de propriétés physiologiques remarquables (toxiques ou thérapeutiques), telle que la morphine, la nicotine, la cocaïne et la quinine. [19]

Winterstein et Tier ont défini les alcaloïdes comme étant des composés à azote hétérocyclique, synthétisés à partir d'acides aminés ou de leurs dérivés immédiats, à distribution restreinte ; possédant une toxicité plus au moins grande, agissant principalement sur le SNC. [6]

I.5 Nomenclature des alcaloïdes

Les noms des alcaloïdes ne sont pas codifiés par une nomenclature officielle. En règle générale, le nom dérive de la plante dont l'alcaloïde a été extrait (Ex : la cocaïne est extraite de la coca). On trouve aussi des noms dérivant de la personne qui a découvert la plante (Ex : La spégazzine extraite de l'aspidosperma par Spégazzini). En français et en anglais, le suffixe "-ine" est utilisé le plus communément, mais plusieurs alcaloïdes peuvent être isolés d'une même plante, c'est pourquoi on peut trouver d'autres suffixes comme "-idine", "-anine", "-aline" ou "-inine".

Pour les alcaloïdes dérivés du règne animal ou des champignons, le même type de "règles" est appliqué. [20]

I.6 Classification et structure chimique des alcaloïdes

Vouloir proposer une classification pour les alcaloïdes demeure une tâche ardue, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant il y a plus de 10 000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés à partir de sources végétales, animales, ou de micro-organismes. [3].

La classification la plus adaptée est basée sur l'origine biogénétique, c'est-à-dire de les classer en trois groupes selon leur précurseur biosynthétique :

I.6.1 Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés, comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique, d'origine naturelle, de structure souvent complexe et de caractère basique. Ces substances bioactives se produisent dans les plantes à l'état libre ou sous forme de sels ou bien sous forme de N-oxydes. Ils sont dotés d'une activité pharmacologique significative même à faible doses [21 ; 22].

I.6.2 Les pseudo-alcaloïdes

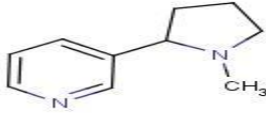
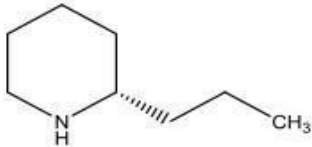
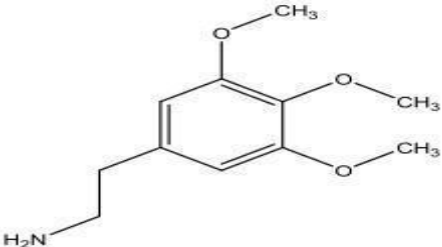
Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés [3] [23]. Ils peuvent cependant être

indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs postcurseurs (dérivés) [24].

I.6.3 Les proto-alcaloïdes

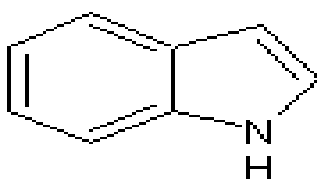
Les proto-alcaloïdes sont des composés de structures simples dans lesquels l'atome d'azote dérivé d'un acide aminé ne fait pas partie de l'hétérocycle. Ces types d'alcaloïdes comprennent des composés dérivés de la L-tyrosine et du L-tryptophane, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau [3] [21] [25]. L'hordénine, la mescaline et la sérotonine sont de bons exemples de ce type.

Tableau I.1 : Structure de quelques alcaloïdes [26].

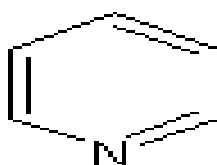
| classe | Exemple | structure |
|-------------------|---------------------|---|
| Vrai alcaloïdes | nicotine du tabac |  |
| Proto alcaloïdes | coniine de la ciguë |  |
| Pseudo alcaloïdes | mescaline de peyotl |  |

On peut cependant regrouper certains d'entre eux en considérant qu'on retrouve dans leur formule certains noyaux relativement simples ; on distingue par exemple [27] :

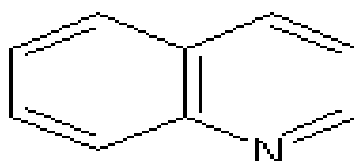
1. Les alcaloïdes renfermant le noyau indole :



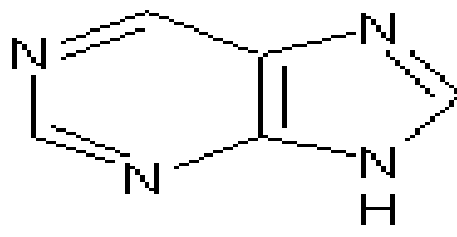
2. Les alcaloïdes renfermant le noyau pyridine



3. Les alcaloïdes renfermant le noyau quinoléine

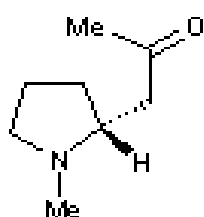


4. Les alcaloïdes renfermant le noyau purine :

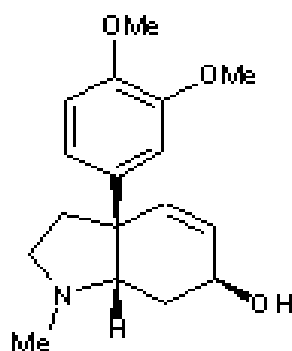


Parmi les familles des alcaloïdes, on peut retrouver les familles chimiques suivantes :

- Pyrrolidines :

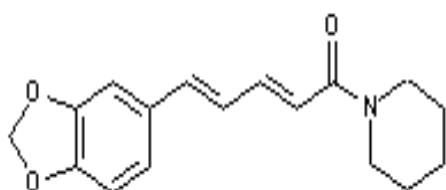


(R)-hygrine

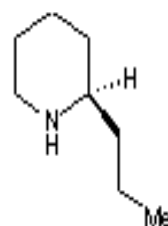


Mésembrénol

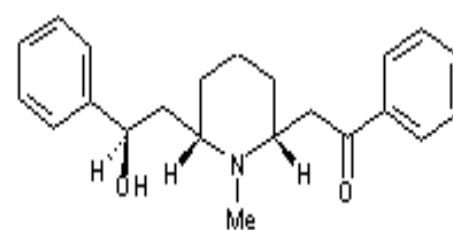
- Pipéridines :



Pipérine

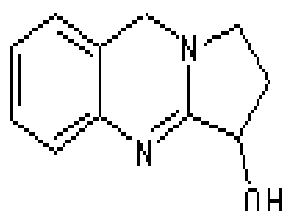


(+)-Coniine

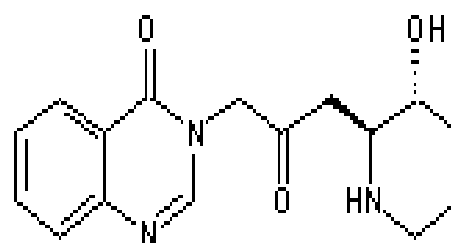


(-)-Lobéline

- Quinazolines : vasicine, (+) -fébrifugine

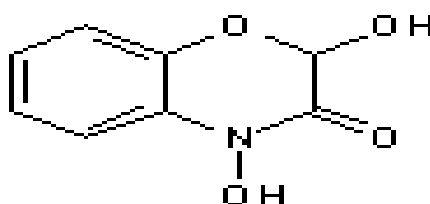


Vasicine

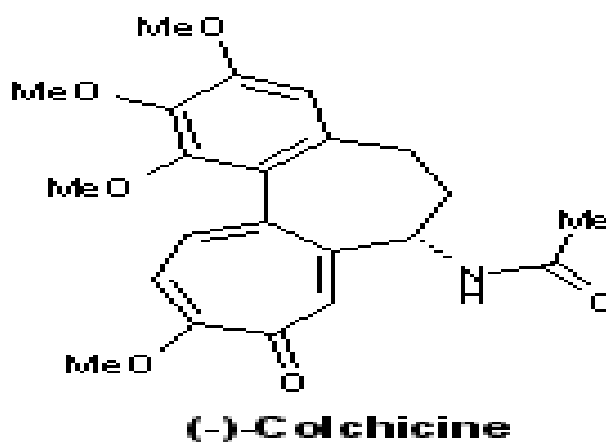


(+)-Fébrifugine

- Benzoxazines et benzoxazoles :



- Colchicines :



I.7 Propriétés des alcaloïdes

I.7.1 Propriétés toxiques

- A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques. Des doses de 60-90 mg de strychnine provoquent des crampes musculaires, dont une paralysie de la respiration entraînant la mort [28].
- Une trop forte dose de réserpine entraîne une chute de tension et une insuffisance cardiaque aigue [29].
- L'émétine, extrait de l'épicaire, peut provoquer une myocardite aigue, une atteinte rénale et surtout une polynévrite.
- On retiendra ainsi que certains alcaloïdes sont fréquemment responsables des empoisonnements du bétail tel la lupinine [29].

Cependant Les alcaloïdes tout d'abord, ont des effets bénéfiques sur la plante synthétisante dont ils régulent la croissance et le métabolisme interne végétaux, ils désintoxiquent et transforment

les substances nocives au végétal, ils protègent la plante contre les rayons UV, comme ils ont des effets contre les herbivores [30].

Les alcaloïdes font partie du mécanisme d'adaptation d'un organisme à son milieu de vie. Ces substances ne sont pas toxiques lorsqu'elles sont stockées, mais elles le deviennent suite à un changement de pH cellulaire. Les réponses des animaux aux alcaloïdes sont très diverses. Certaines d'entre eux les tolèrent, tandis que d'autres sont lésés ou même empoisonnés.

I.7.2 Propriétés pharmacologiques

Si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme :

- Antitumoraux : vincalécoblastine, vincristine, taxol, camptothécine.
- Antalgiques : morphine, codéine.
- Spasmodiques : tubocurarine et papaverine.
- Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine.
- Emétiques : émétine.
- Antitussifs : codéine.
- Antiarythmiques : quinidine et ajmaline.
- Antipaludiques : quinine.
- Anti-tumeur, sympathomimétique : éphédrine.
- Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine. [3]

I.7.3 Propriétés physiques et chimiques

Les alcaloïdes possèdent des propriétés physicochimiques très remarquables, ce sont des composés complexes, avec des formules diverses. Parmi leurs différentes propriétés :

- Les alcaloïdes sont des composés à caractères basiques, leur basicité est très variable, dépend de la disponibilité du doublet de l'azote existant. Ainsi, elle est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote : les groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité, par contre ceux électro-donneurs la renforcent. Cette basicité peut être également un facteur d'instabilité pour ces molécules. Sous l'état de base ou en solution, elles sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène.

- Leur solubilité varie en fonction du pH (plus le pH est acide plus la solubilité augmente). Ils forment des sels avec les acides (organiques et minéraux). Et ils sont ordinairement insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (alcools, chloroforme, acétone, etc.), alors que leurs sels ont des caractères de solubilité inverses [31 ; 32].
- Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes » et forme :
 - Précipité blanc jaunâtre avec le réactif de Valser-Mayer.
 - Précipité rouge orangé avec le réactif de Dragendorff.
 - Brun avec le réactif de Bouchardat.
 - Précipitent aussi à la présence de l'acide picrique et les tanins [21].

I.7.4 Autres propriétés

Du fait de leurs : gout amer, les alcaloïdes peuvent protéger les plantes de la consommation par les animaux (herbivores) [32], comme ils paraissent servir de moyen de dissuasion contre les insectes telle la nicotine qui a été l'un des premiers insecticides utilisés par l'homme [33] [29].

II.1 Introduction

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

Les alcaloïdes, à pH basique, sont sous forme de bases insolubles ou peu solubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires et les alcools à titre élevés.

En milieu acide, les alcaloïdes sont à l'état de sels fortement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont par contre insolubles dans les solvants organiques apolaires [14].

II.2 Principe de l'extraction solide liquide

L'extraction solide/liquide est réalisée par contact intime entre le solide et le solvant. Au cours de l'extraction, la concentration du soluté dans le solide varie sans interruption, ce qui explique un état non stationnaire de transfert de matière. Une série de processus successifs a lieu traduisant l'interaction entre le solide contenant initialement le soluté, et le solvant effectuant la séparation ; ces processus concernent :

1. La diffusion du solvant au sein de la matrice solide.
2. La dissolution du soluté dans le solvant.
3. La diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface.
4. Le transfert par convection ou diffusion du soluté contenu dans la solution près du solide vers la masse restante du solvant.

L'extraction, souvent étudiée au plan phénoménologique comme une opération unifiée, peut être analysée en termes de cinétique et de rendement total. La cinétique est généralement exprimée en termes de concentration du soluté dans le solide par unité de temps (dx/dt).

La nature séquentielle de ces quatre processus fait que l'opération globale d'extraction se déroule à la vitesse du processus le plus lent, qualifiée alors du processus limitant du procédé.

Dans le cas de la plupart des végétaux, c'est l'étape du transfert du solvant à travers la matrice solide qui constitue l'étape limitante. En effet, la microstructure naturelle des végétaux génère une mauvaise aptitude quant à la diffusion interne des liquides. Une relation étroite existe alors entre la vitesse d'extraction et la structure de la matière. Pour mieux analyser cet aspect, il faudrait commencer par aborder les notions théoriques du transfert de masse. [34]

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide. [35]

II.3 Principe de L'extraction liquide-liquide

L'extraction par solvant consiste à dissoudre le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer la phase organique contenant le composé à extraire de la phase aqueuse [36].

L'extraction par solvant, également connue sous le nom d'extraction ou de séparation liquide-liquide, est une méthode pour séparer un composé en fonction de la solubilité de ses parties. Cela se fait en utilisant deux liquides non miscibles, par exemple, l'eau et un solvant organique [37].

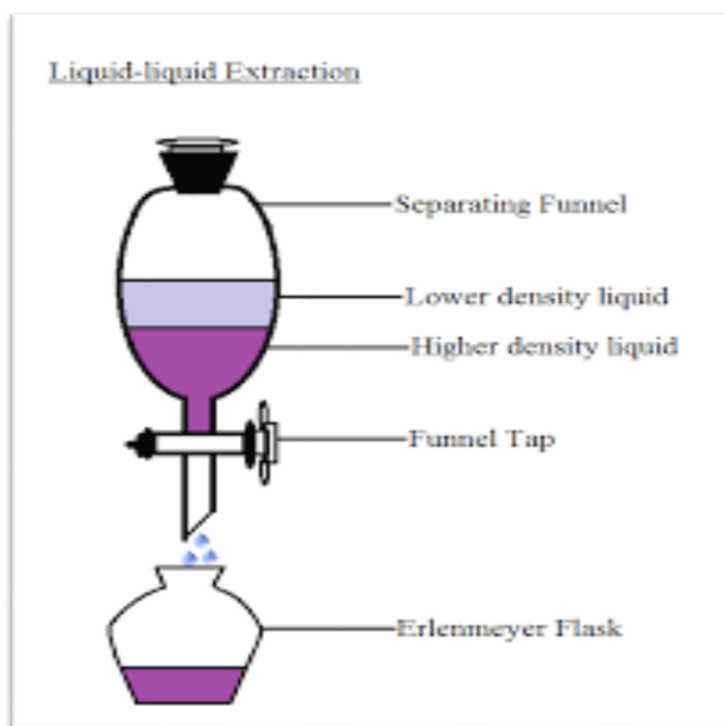


Figure II.1: Schéma d'extraction par solvant

II.4 Méthodes d'extraction des alcaloïdes

L'extraction est basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et en milieu alcalin ; ils vont ainsi pouvoir être séparé des autres constituants du végétal qui possèdent les mêmes solubilités quel que soit le pH. Dans tous les cas, il faudra préalablement pulvériser la plante végétale pour la rendre perméable aux liquides d'extraction [38].

Il faudra préalablement pulvériser le végétal pour le rendre perméable aux liquides d'extraction, il existe trois types généraux d'extraction des alcaloïdes :

- Extraction par l'eau acidifiée.
- Extraction par solvant organique apolaire.
- Extraction par solvant organique polaire.

Une nouvelle méthode d'extraction a été développée en 2006, cette technique est réalisée à l'aide d'une solution sonique contenant un tensioactif comme agent d'extraction [39].

II.4.1 Extraction des alcaloïdes par l'eau acidifiée

C'est une extraction réalisée à l'aide d'eau acidifiée et d'un acide organique apolaire. La plante pulvérisée subit une macération sous agitation (ou à l'aide d'un bain ultrasons), par l'eau acidifiée (H_2SO_4 ou HCl), suivie d'une filtration.

Le filtrat est alcalinisé par ammoniac concentré, cela permettra aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme base. Les alcaloïdes bases sont alors extraits par un solvant organique non miscible à l'eau dans une ampoule à décanter. La phase organique est récupérée, séchée avec Na_2SO_4 puis concentrée [26].

II.4.2 Extraction par les solvants organiques apolaires

Une fois la plante séchée et pulvérisée est traitée par un alcali (ammoniaque, carbonate de sodium, eau de chaux &), les alcaloïdes libérés sont ensuite extraits par un solvant organique non polaire. L'épuisement se fait à froid par macération, percolation, ou le plus souvent, à l'aide d'un appareil à épuisement continu (Soxhlet). On obtient une poudre épuisée et une solution organique dans laquelle les alcaloïdes se trouvent à l'état de bases [38].

II.4.3 Extraction par les solvants organiques polaires

La poudre végétale est pulvérisée et traitée par une solution alcoolique acide ; celle-ci est évaporée à sec. Le résidu est repris par l'eau acide, après alcalinisation la solution aqueuse est épuisée par un solvant organique non polaire. On obtient une solution organique d'alcaloïdes à l'état de base, on évapore le solvant, un résidu d'alcaloïdes (bases) est récupéré [38].

II.5 Extraction par les méthodes conventionnelles

II.5.1 Extraction par macération

C'est une technique d'extraction dans laquelle le matériel végétal est mis en contact avec le solvant d'extraction, à température ambiante et pendant une longue durée. Les substances solubles passent par simple diffusion et l'extraction est réalisée jusqu'au moment où la concentration des substances solubles est la même dans le solvant d'extraction que dans la matière végétale. La macération est le moyen le plus simple de préparer des extraits et peut être effectuée à plusieurs reprises pour obtenir un meilleur épuisement des substances solubles contenues dans la matière végétale. Son inconvénient est la longue durée, parfois des jours ou des semaines [40]. Afin d'obtenir l'extraction la plus complète possible, le récipient doit être hermétiquement fermé et une agitation du lot est nécessaire pour permettre la diffusion des composés extraits dans le liquide et ainsi éviter l'équilibre des extraits substances [41]. Figure II.2

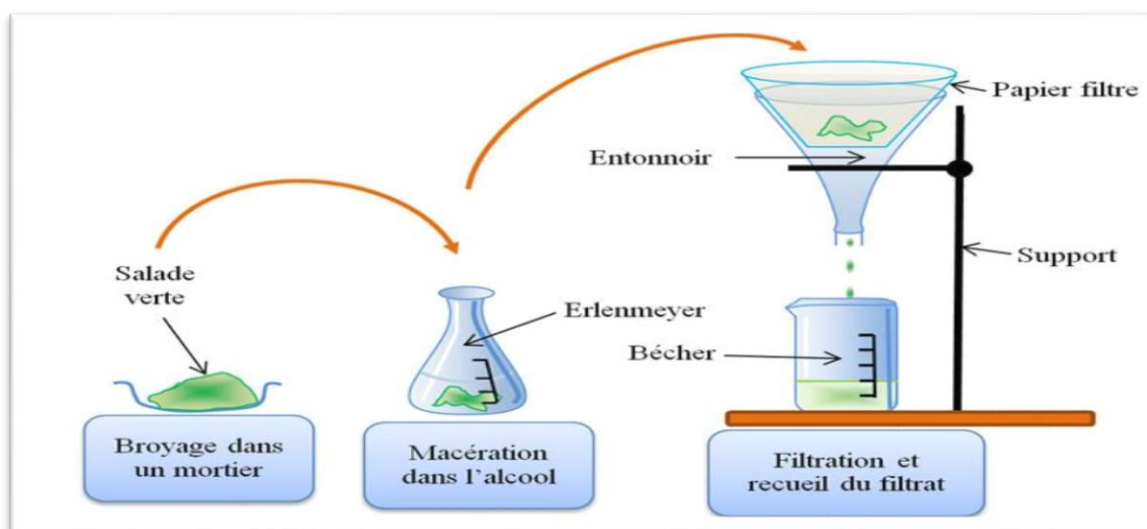


Figure II.2 : Les étapes d'une extraction par macération

- C'est une méthode qui présente des avantages et des inconvénients, parmi ces avantages :
 - Le coût : elle ne demande pas de gros matériels et montages expérimentales.
 - La purification : l'utilisation d'un solvant organique judicieusement choisi permet de solubiliser sélectivement la substance d'intérêt et de laisser dans la matrice les molécules interférentes.
 - La possibilité de travailler sur des matrices très variées.
 - La possibilité d'extraire une gamme très étendue de molécules.
- Concernant les inconvénients on peut citer :
 - Consommation de volumes importants de solvants.
 - La toxicité des solvants : les solvants sont des produits toxiques dont il faut se protéger.
 - Ce sont des techniques conventionnelles qui nécessitent beaucoup de temps et d'énergie. [3]

II.5.2 Extractions par Soxhlet

Un extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue d'un solide par un solvant (figure II.3). Il se compose d'un corps en verre dans lequel est placé une cartouche en papier filtre épais, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction. Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction, Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant [42].

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps en verre, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits [42].

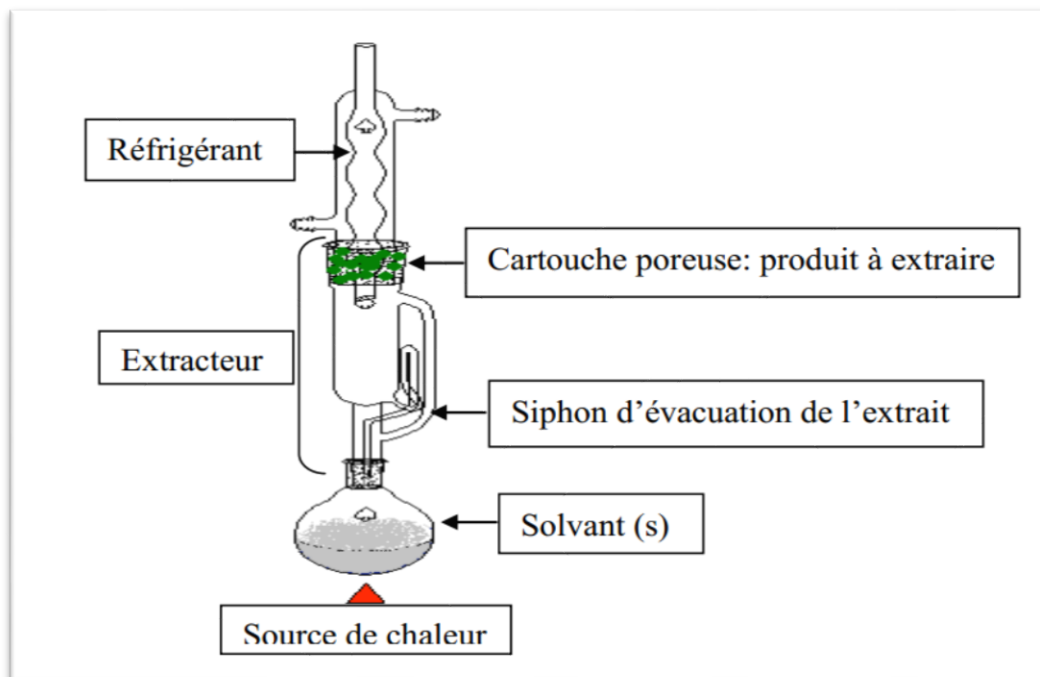


Figure II.3 : Montage d'extraction de Soxhlet [42].

Avantages et inconvénients de l'extracteur Soxhlet :

C'est une technique qui présente plusieurs avantages :

- Une méthode très simple.
- Aucune nécessité de filtration après l'extraction.

Cependant, cette méthode présente aussi des inconvénients :

- Un temps d'extraction long.
- Une grande quantité de solvant est nécessaire qui exige une étape d'évaporation et déconcentration [43].

II.6 Paramètres influençant l'extraction

II.6.1 La température

Il est difficile de cerner de façon simple l'influence de la température sur l'extraction.

Dans la plupart des cas, les gammes élevées de température sont favorables au rendement d'extraction et ceci pour quatre principales raisons :

- La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation.

- La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire.
- Enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation.

La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de :

- Dégradation thermique du soluté.
- Risques d'extraire des composés nuisibles [44].

II.6.2 Temps d'extraction

Le temps d'extraction correspond au temps nécessaire au solvant pour pénétrer dans la matière végétale et extraire la totalité des substances naturelles.

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc....).

Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et sans diminution notable du rendement.

A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes [45].

II.6.3 Influence du solvant

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène [46], L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales, sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires [47].

Comme dans le cas du soluté, la taille des molécules de solvant exerce une influence sur la diffusion. Il est également question de sélectivité, afin d'extraire le maximum de soluté et le minimum des autres constituants du cytoplasme et plus généralement de la matière végétale. Car il va falloir ensuite séparer le soluté des autres molécules extraites. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique. [48]

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [49] :

- La solubilité des composants spécifiques dans le solvant.
- La régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé. Il ne doit pas former d'azéotrope avec un des composés qu'il solubilise et sa chaleur latente doit être faible.
- La tension interfaciale et la viscosité, car le solvant doit correctement mouiller la matrice solide.
- Idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux.

Dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, le choix du solvant est très important. Les normes et les règles d'hygiène et de sécurité sont très strictes. Il ne doit pas en rester dans les produits finaux ou bien les traces doivent être suffisamment insignifiantes pour être inoffensives. De manière pratique, les ateliers disposent souvent d'un « parc » de solvants. Le choix est souvent restreint à ce groupe de solvants qui sont connus, maîtrisés et acceptables

II.6.4 Rapport solvant-solide

Le rapport solvant-solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est grand, la quantité totale de composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide importants, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans les extraits sont faibles et plus d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec. [50]

II.6.5 Influence de l'agitation

L'agitation du milieu a pour effet d'augmenter la surface de contact et l'homogénéisation entre les phases et de favoriser la diffusion du soluté au sein de chaque phase. [51]. Elle a un effet toujours favorable sur l'opération de transfert de matière, car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide (couche mince) et l'augmentation du coefficient de transfert. [52 ;53]

II.6.6 Influence du pH

La polarité de beaucoup de composés varie avec le pH du solvant, par conséquent leur solubilité dépend aussi de l'acidité ou basicité du solvant [54]. La valeur du pH intervient sur la dissolution des composés solubles ainsi que sur la solubilisation des fractions hydrolysables. Il est généralement mis à profit pour apporter à l'extraction une certaine sélectivité [55]. Des

transformations chimiques ont été mises en évidence pour les pH fortement acide. Ces travaux ont laissé supposer une transformation chimique des composés sous l'action des protons H⁺ [48]

II.6.7 Taille des particules

Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel. Nous pouvons ainsi citer à titre d'exemples que de plus grands rendements d'extraction ont été observés avec la diminution de la taille des particules [56].

II.6.8 Coefficient de partage

Un soluté présent dans une phase au contact d'une seconde phase évolue jusqu'à atteindre d'un équilibre thermodynamique. C'est à partir de cet état que l'on peut définir le coefficient de partage qui rend compte de sa distribution dans chacune des phases. Il s'applique aux couples de phases liquide/liquide ; liquide/solide ou gaz/liquide. [57]

Dans un premier temps, nous rappelons les principes des équilibres entre phases. Nous présentons la méthodologie adoptée pour la détermination expérimentale de la propriété de partage.

Soit « A » une substance soluble à la fois dans l'eau et un autre solvant, à l'équilibre hétérogène de partage de A entre les phases liquides.



On définit la constante d'équilibre D, coefficient de partage de la substance A entre le solvant et la phase aqueuse [58].

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

Le coefficient de partage, qui rend compte de l'affinité relative d'un soluté présent entre deux phases, est une propriété utilisée dans de nombreux domaines : biochimique, médical, pharmacologique, ou encore dans le domaine environnemental.

Plusieurs facteurs peuvent influencer le coefficient de partage : la température, le pH, les propriétés de la molécule (taille) et la composition du milieu.

II.7 Généralités sur les plans d'expériences

II.7.1 Définition des plans d'expériences

Un plan d'expérience est une méthode d'organisation des tests pour produire des résultats fiables rapidement et à moindre coût. La méthodologie de conception d'expériences est basée sur l'observation qu'une expérience conçue de manière appropriée aboutira généralement à une analyse statistique simple et à une interprétation des résultats. [59]

Cette méthode permet une investigation expérimentale organisée. Elle vise à établir une relation entre les types des grandeurs physiques à l'étude. Les niveaux des composants à examiner sont combinés de diverses manières dans un plan d'expérimentation (essais élémentaires). Construire la meilleure structure de données possible pour produire un modèle de haute qualité statistique avec le moins d'essais possibles. [60]

II.7.2 Les Facteurs

Les facteurs sont les paramètres d'entrée qui interviennent sur le système ou le processus. Un facteur est dit maîtrisé s'il est identifié et sa variation maîtrisée. Les facteurs non maîtrisés sont responsables de la dispersion des paramètres de sortie et conduisent à un bruit système qui perturbe les réponses et nécessite la répétition d'une même combinaison de facteurs de niveau au cours des différentes expériences. Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif. Un facteur significatif est un facteur qui, lorsqu'il varie, modifie la réponse du système. [61]

- Facteur quantitatif : Un facteur quantitatif est un facteur mesurable, souvent à variation continue ou discrète.
- Facteur qualitatif : Un facteur qualitatif est un facteur non mesurable, on distingue des variables qualitatives ordinales et nominales.

II.7.3 Réponse

On qualifie de réponse la grandeur qui est observée pour chaque expérience réalisée. En d'autres termes, c'est le résultat mesuré d'une étude. Sachant qu'à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble de ces dernières, forme la surface de réponse. La valeur d'une réponse ne peut être modifiée que de manière indirecte en faisant varier les facteurs [62].

II.7.4 Les objectifs des plans d'expériences

Le but principal de l'expérimentation est d'établir s'il existe des relations de dépendance entre certains facteurs et certaines réponses, et de modaliser.

Dans toute expérience l'un des problèmes est le contrôle des facteurs essentiels qui peuvent influencer le résultat. On appelle niveau d'un facteur ou modalité, l'une des valeurs particulières que celui-ci pourra prendre. Dans une expérience élémentaire chacun des facteurs se verra affecter un niveau (une valeur). On appelle traitement un ensemble contenant une modalité pour chacun des facteurs, définissant ainsi une expérience élémentaire. Les essais élémentaires pourront éventuellement être réalisés plusieurs fois (répétitions) pour améliorer la précision de l'information recherchée.

L'objectif général des plans d'expérience faire le minimum d'essai et obtenir le maximum de précision [63].

II.7.5 Principaux avantages des plans d'expériences

Les principaux avantages de cette méthode sont :

- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs.
- Détection des interactions entre facteurs.
- Modélisation des réponses étudiées.
- Une précision optimum des résultats.

La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié. [64]

III.1 Introduction

Ce chapitre décrit les procédés adoptés pour l'extraction des alcaloïdes en présentant en premier lieu les réactifs et la matière végétale utilisée. Il décrit d'un point de vue physicochimique les différentes techniques de caractérisation qualitative et quantitative des alcaloïdes.

III.2 Tableau des réactifs

Les réactifs utilisés au cours de ce travail sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III.1 : Les réactifs utilisés

| Réactif | Formule brut | Rôle |
|---------------------------|--------------|--|
| Hexane | C_6H_{14} | délipidation |
| Acide chlorhydrique | HCl | Extraction solide-liquide |
| Hydroxyde d'ammonium | NH_4OH | Alcalinisation (ajustement de PH) |
| Chloroforme | $CHCl_3$ | Extraction liquide-liquide |
| Sulfate de sodium anhydre | Na_2SO_4 | Sécher la phase organique |
| Méthanol | CH_3OH | Extraction par Soxhlet et conservation es alcaloïdes |
| Ethanol | C_2H_6O | Extraction par macération |
| Chlorure de mercure | $HgCl_2$ | Préparation de réactif de Mayer |
| Iodure de potassium | KI | Préparation des réactifs |
| Iode | I_2 | Préparation de réactif de Bouchardat |

III.3 Préparation du Matériel végétale

La matière végétale utilisée est une plante Saharienne Algérienne de la famille des éphédrace. Elle a été récoltée dans la région d'Oued Souf. Les feuilles de cette plante ont été sécher à l'ombre et à température ambiante dans un endroit aéré pendant 30 jours. Voir ci-dessous la figure III.1 qui montre les feuilles sèches de cette plante.



Figure III.1 : Feuilles de la plante végétale

III.4 Préparation de la poudre végétale

Les feuilles sèches de la plante, sont finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamiser en utilisant un tamiseur de granulométrie de diamètre inférieur à 200 μm . La poudre obtenue est conservée à l'abri de la lumière dans des boîtes en verre. Par la suite cette poudre est délipidée avec l'hexane par macération et sous agitation mécanique douce, à température ambiante pendant trois heures, ensuite filtré et laissé sécher tout une nuit à une température qui ne dépasse pas 50°C et conservée dans une boîte en verre à l'abri de la lumière.

III.5 Détermination du taux d'humidité

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser avec une masse de 5 g dans une étuve à une température de 104 °C, sous une pression atmosphérique pendant 1h. On pèse l'échantillon et on répète l'opération chaque heure jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient de laisser l'échantillon refroidir dans un dessiccateur avant de peser. [65]

La teneur en eau (%) du matériel végétal est donnée par la formule suivante :

$$Teneur\ en\ eau(\%) = \left[\frac{M_h - M_s}{M_h} \right] \cdot 100$$

D'où :

- **M_h** : masse en g de la prise d'essai avant séchage.
- **M_s** : masse en g de la prise d'essai après séchage.

III.6 l'extraction des alcaloïdes par l'eau acidifiée

Extraction des alcaloïdes est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin. Les alcaloïdes, à pH basique, sont sous forme de bases insolubles ou peu solubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires. En milieu acide, les alcaloïdes sont à l'état de sels fortement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont par contre insolubles dans les solvants organiques apolaires.

La méthode d'extraction suivie dans ce travail est l'extraction par l'eau acidifiée. Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole suivant.

III.6.1 Première étape

- 5g de la poudre délipidée est mélangée à 100 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique et mis dans un erlenmeyer de 250 ml, le mélange est mis sous agitation à pression atmosphérique pendant une période bien déterminée. La concentration de la solution aqueuse d'acide chlorhydrique, le rapport (masse végétale /solution aqueuse) (Ratio), le temps d'agitation et la température ont été varié. [26]

III.6.2 Deuxième étape

- Dans une ampoule à décanter on va ajouter la solution alcalinisée et un volume de chloroforme (solvant organique apolaire) après on va les agités et on va laisser décantés. Après la décantation on descend la phase organique qui contient les alcaloïdes. Ensuite, on lave avec de l'eau distillée la solution organique deux ou trois fois. Finalement, on la séchée avec le sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces de l'eau et passer vers l'évaporation de chloroforme utilisant l'évaporateur rotatif.

On ajoute le méthanol au résidu sec d'alcaloïdes restant dans le ballon et conserver dans un flacon brun à une température de 4 °C. [26]



Figure III.2 : Résidu sec des alcaloïdes extraits.

III.7 Détermination du rendement d'extraction des alcaloïdes

Le rendement a été calculé par rapport à 5 g de matériel végétal sec, les résultats sont exprimés en pourcentage. Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \frac{(P1-P0)}{E} \times 100$$

Avec :

- P1 : poids du bécher après évaporation du solvant (g).
- P0 : poids du bécher vide (g).
- E : poids de l'échantillon initial (g).

III.8 Caractérisation des alcaloïdes

Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes ». Ces réactions sont fondées sur la capacité des alcaloïdes à se combiner aux métaux

lourds (Bismuth, Mercure, Iode...) en milieu aqueux légèrement acide, Il en existe plusieurs types. Dans notre travail on a choisie d'utilisé les réactifs suivants :

- Réactif de Valsler-Mayer (tétra-iodo-mercure de potassium) qui donne un précipité blanc jaunâtre en présence des alcaloïdes.
- Réactif de Bouchardat (Iodo-iodurée de potassium) : donne un précipité brun en présence des alcaloïdes. [66]

III.8.1 Préparation de Réactif de Mayer

Le réactif de Mayer est composé de l'iodure de potassium, chlorure mercurique et l'eau distillée [3]. Le filtrat de l'extraction est traité par cinq gouttes de réactif de Mayer dans un tube La formation d'un précipité blanc révèle la présence des alcaloïdes [67] [68]. Ce test présente une méthode d'analyse préliminaire.

III.8.2 Préparation de réactif de Bouchardat

Une solution aqueuse d'un mélange de 25 g d'iode et 50 g d'iodure de potassium jaugée jusqu'à 1000 ml, mais on va travailler avec des petites quantités : [69]

- Dissolvez 5 g d'iode (I_2) dans 100 ml d'eau distillée.
- Ajoutez 10 g d'iodure de potassium (KI) dans la solution d'iode.
- Agitez la solution jusqu'à dissolution complète de l'iode et de l'iodure de potassium.



Figure III.3 : Solutions de réactifs de Bouchardat et le réactif de Mayer

III.9 Extraction par les méthodes conventionnelles

L'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcoolique a été réalisés en utilisant l'éthanol comme solvant ou le méthanol, soit par macération ou à l'aide d'appareil du soxhlet.

III.9.1 Extraction par macération

La méthode de Ross et Rain (1977) rapportée par Harborne (1998) avec quelques modifications

- 10 g de la poudre délipidée par 250 ml d'éthanol par macération et sous agitation mécanique à température ambiante pendant 24heures.
- Après 24 heures, en utilisant un évaporateur rotatif pour évaporer le solvant.
- On prépare 50 ml d'eau distillée acidifié avec HCl jusqu'à pH=3, et l'ajoutée sur le résidu qui reste dans le ballon de solvant évaporée précédant.
- Ensuite, on lave dans une ampoule à décanté avec le chloroforme, et on récupère la phase aqueuse et l'alcalinisée jusqu'à pH=9 par une solution d'ammoniaque qui permet ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique.
- On va passer à l'extraction liquide-liquide par le chloroforme dans une ampoule à décanté pour récupérer les alcaloïdes qui sont se forme organique dans la phase organique.
- On lave la phase aqueuse avec l'eau distillée une à deux fois. Après, on va la séchée par le sulfate de sodium anhydre, et évaporer le chloroforme utilisant l'évaporateur rotatif pour récupérer les alcaloïdes qui reste dans le ballon. [70]

III.9.2 Extraction par solvant sur le montage de Soxhlet

On va faire l'extraction avec le méthanol par le soxhlet Les alcaloïdes sont obtenus selon la méthode de Ross et Rain (1977) rapportée par Harborne (1998) :

- 10g de la poudre délipidée est extraite au Soxhlet par 250 ml d'alcool (méthanol) pendant 5 siphonage.
- On récupère le solvant et l'évaporer dans un évaporateur rotatif.
- On prépare 50ml de l'eau distillée acidifie jusqu'à pH=3 par HCl à 37% et on va l'ajouter sur le résidu qui reste dans le ballon de solvant évaporée précédant.
- Après 30 min, on l'alcalinisé jusqu'à pH=9 par une solution d'ammoniaque qui permet ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique.

- Puis mise pour extraction des alcaloïdes avec 50ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase chloroformique récupérée et évaporée à sec. [70]

III.10 Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance, est sans doute la technique d'analyse et de caractérisation la plus utilisée pour les extraits d'alcaloïdes, car elle représente une haute résolution, une reproductibilité élevée, et une durée d'analyse relativement courte. Elle peut être employée pour la séparation, la détermination quantitative et l'identification des alcaloïdes.

- Colonne utilisée :
Les colonnes les plus utilisées sont les RP C18 de 125 millimètres de longueur avec un diamètre interne habituelle de 4,6 millimètres ; le volume d'injection est de 20 µl. [71]
- Phase mobile :
Le solvant d'éluion utilisé est l'acétonitrile 0,1% et l'eau légèrement acide (50/50). L'ajout d'acide en petite quantité a pour but de supprimer l'ionisation des composés phénoliques et des groupes carboxyliques ; apportant ainsi une bonne résolution et une bonne reproductibilité de lecture. Le débit utilisé est 1mL / min. [71]
- La détection en HPLC :
Les alcaloïdes absorbent bien les rayonnements UV et le détecteur d'UV ou d'UV-Vis à longueurs d'onde variables est le plus généralement utilisé en chromatographie liquide à haute pression. La longueur d'onde de détection est de 313 nm. [71]

III.11 Plan d'expérience

III.11.1 Choix de plan d'expérience

Afin d'étudier notre procédé d'extraction nous avons utilisés un plan factoriel complet à deux niveaux, cinq facteurs et une point centrée.

- La problématique : Optimisation des paramètres d'extraction des molécules organiques à partir d'une matrice végétale.
- Les facteurs : Les facteurs étudiés sont :

Tableau III.2 : plan de matrice expérimentale

| Facteur | code | niveau bas -1 | niveau haut +1 |
|---------------------------------|------|---------------|----------------|
| Temps(h) | X1 | 2 | 3 |
| Température (°C) | X2 | 30 | 90 |
| Concentration de HCl (Mol/l) | X3 | 0,1 | 0,2 |
| Ratio | X4 | 01:10 | 01:20 |
| Coefficient de partage | X5 | 1 | 2 |

- La réponse : est le rendement (%) d'extraction (code R).
- L'objectif : optimisation.

III.11.2 La matrice expérimentale

Le nombre d'essai est déterminé par l'équation suivante pour un plan factoriel complet à deux niveaux :

$$N = 2^n + C$$

- N : le nombre des essais
- n : nombre des facteurs.
- C : nombre des points au centre.

Donc pour notre cas le nombre d'expériences que nous devons réaliser pour étudier le procédé d'extraction est de 33 expériences.

Tableau III.3 : Matrice d'expériences.

| Essai | Temps (h) | | Température (°C) | | Concentration (mol/l) | | Ratio | | Coefficient de partage | |
|-------|--------------|--------|---------------------|--------|--------------------------|--------|--------|--------|---------------------------|--------|
| | niveau | valeur | niveau | valeur | niveau | valeur | niveau | valeur | niveau | valeur |
| 1 | -1 | 2 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 2 | 1 | 3 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 2 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 4 | 1 | 3 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 5 | -1 | 2 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | 3 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 2 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 8 | 1 | 3 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | -1 | 1 |
| 9 | -1 | 2 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 10 | 1 | 3 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 11 | -1 | 2 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 12 | 1 | 3 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 13 | -1 | 2 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 14 | 1 | 3 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 15 | -1 | 2 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 16 | 1 | 3 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | -1 | 1 |
| 17 | -1 | 2 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 18 | 1 | 3 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 19 | -1 | 2 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 20 | 1 | 3 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 21 | -1 | 2 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 22 | 1 | 3 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 23 | -1 | 2 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 24 | 1 | 3 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | -1 | 01:10 | 1 | 2 |
| 25 | -1 | 2 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 26 | 1 | 3 | -1 | 30 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 27 | -1 | 2 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 28 | 1 | 3 | 1 | 90 | -1 | 0.1 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|-----|----|----|---|------|---|-------|---|-----|
| 29 | -1 | 2 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 30 | 1 | 3 | -1 | 30 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 31 | -1 | 2 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 32 | 1 | 3 | 1 | 90 | 1 | 0.2 | 1 | 01:20 | 1 | 2 |
| 33 | 0 | 2,5 | 0 | 60 | 0 | 0,15 | 0 | 01:15 | 0 | 1,5 |

III.11.3 Exploitation des résultats

Les valeurs obtenues ont été introduite dans le logiciel MODE6 (2001, suède) afin de déterminer les effets des facteurs et leurs interactions ainsi que le modèle mathématique du procédé.

III.11.4 Logiciel MODDE 6

MODDE 6 est un logiciel professionnel spécialisé dans la conception et l'analyse de plans d'expérience. Développé pour répondre aux besoins des chercheurs, ingénieurs et scientifiques, MODDE 6 offre des fonctionnalités avancées dans le domaine de l'optimisation et de la modélisation. En utilisant des algorithmes sophistiqués, il guide les utilisateurs dans le choix du plan d'expérience optimal en fonction de leurs objectifs spécifiques. Grâce à une interface conviviale, MODDE 6 facilite l'importation des données, la définition des facteurs, la configuration des contraintes, et la visualisation des plans recommandés. Ce logiciel permet également une analyse approfondie des résultats expérimentaux, contribuant ainsi à une prise de décision éclairée et à une optimisation des processus.

Les valeurs obtenues expérimentalement ont été introduite dans le logiciel MODE6 afin de déterminer les effets des facteurs et leurs interactions ainsi que le modèle mathématique du procédé.

IV.1 Introduction

Dans ce chapitre nous allons présenter les différents résultats auxquels cette présente étude a pu aboutir. Les principaux résultats s'articulent autour de :

- ❖ Caractérisation des alcaloïdes.
- ❖ Optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes dans les feuilles de la plante Ephédra.

IV.2 Détermination du taux d'humidité

Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminé le taux d'humidité de notre plante Ephédra. Cette méthode consiste à déterminer la perte en masse d'eau dans la plante par dessiccation à l'étuve. Nous avons révélé un taux d'humidité de 7,34%.

IV.3 Test phytochimique

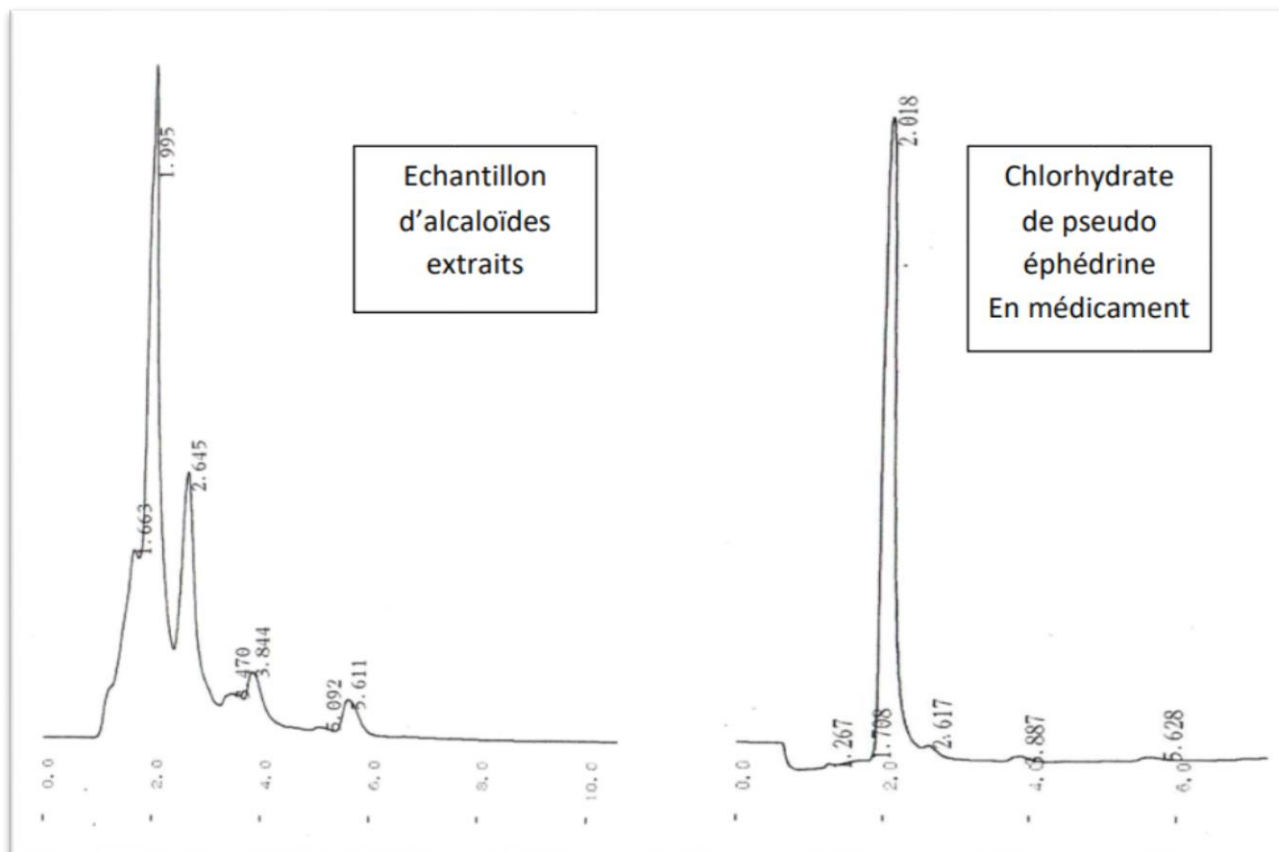
La révélation de la présence des alcaloïdes dans les extraits obtenus (figure IV.1) a été réalisée par l'ajout du réactif de Mayer qui donne un précipité blanc et Bouchardat qui donne un précipité brun ainsi explique le résultat positif de ce test.



Figure IV.1: Les précipités obtenus après l'ajout des réactifs de Mayer et Bouchardat

IV.4 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'identification des composés de l'extrait des alcaloïdes totaux majoritaires de la poudre de plante d'éphédra par HPLC s'est faite sur la base de la comparaison de leurs temps de rétention avec ceux obtenus pour les mêmes composés standard. Cette comparaison, nous a permis de confirmer la présence des alcaloïdes et nous a permis de confirmer la présence d'un alcaloïde majoritaire, le sel de chlorhydrate de pseudo éphédrine avec un temps de rétention 1,995 min. Graphique (IV.1).



Graphique IV.1 : Chromatogramme en HPLC des alcaloïdes extraits de la plante Ephédra

IV.5 Matrice expérimentale

A fin de la réalisation des essais expérimentales on a les résultats de rendement ci-dessous :

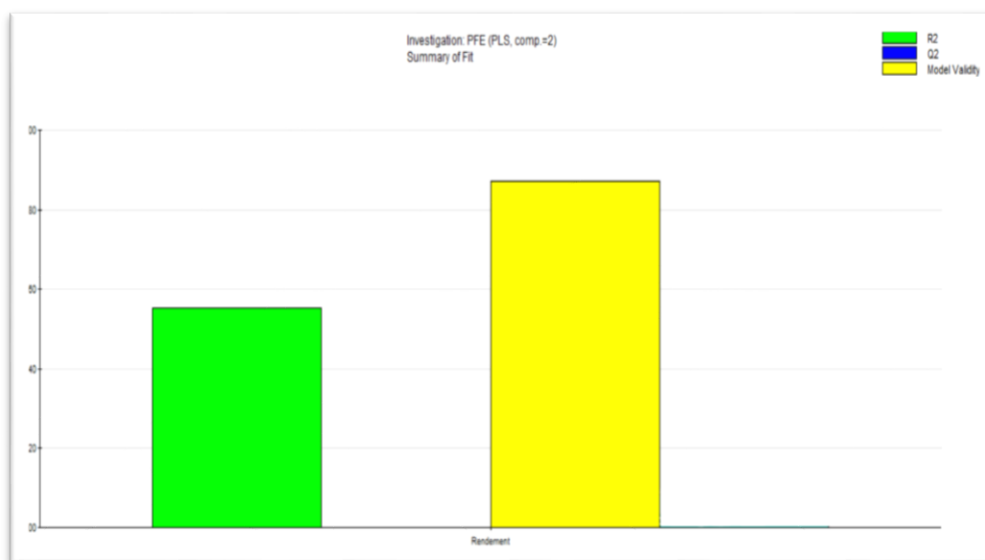
Tableau IV.1: Matrice des essais de plan d'expérience.

| Essai | Temps (h) | Température (°C) | Concentration (mol/l) | Ratio | Coefficient de partage | Rendement (%) |
|-------|-----------|------------------|-----------------------|-------|------------------------|---------------|
| 1 | 2 | 30 | 0.1 | 01:10 | 1 | 3 |
| 2 | 3 | 30 | 0.1 | 01:10 | 1 | 3.6 |
| 3 | 2 | 90 | 0.1 | 01:10 | 1 | 8.6 |
| 4 | 3 | 90 | 0.1 | 01:10 | 1 | 6.4 |
| 5 | 2 | 30 | 0.2 | 01:10 | 1 | 3 |
| 6 | 3 | 30 | 0.2 | 01:10 | 1 | 6 |
| 7 | 2 | 90 | 0.2 | 01:10 | 1 | 4.8 |
| 8 | 3 | 90 | 0.2 | 01:10 | 1 | 5.1 |
| 9 | 2 | 30 | 0.1 | 01:20 | 1 | 7.8 |
| 10 | 3 | 30 | 0.1 | 01:20 | 1 | 5.2 |
| 11 | 2 | 90 | 0.1 | 01:20 | 1 | 4.6 |
| 12 | 3 | 90 | 0.1 | 01:20 | 1 | 4.4 |
| 13 | 2 | 30 | 0.2 | 01:20 | 1 | 3.2 |
| 14 | 3 | 30 | 0.2 | 01:20 | 1 | 5.4 |
| 15 | 2 | 90 | 0.2 | 01:20 | 1 | 2.6 |
| 16 | 3 | 90 | 0.2 | 01:20 | 1 | 5.8 |
| 17 | 2 | 30 | 0.1 | 01:10 | 2 | 2.4 |
| 18 | 3 | 30 | 0.1 | 01:10 | 2 | 7.2 |
| 19 | 2 | 90 | 0.1 | 01:10 | 2 | 5.6 |
| 20 | 3 | 90 | 0.1 | 01:10 | 2 | 6 |
| 21 | 2 | 30 | 0.2 | 01:10 | 2 | 2.6 |
| 22 | 3 | 30 | 0.2 | 01:10 | 2 | 4.6 |
| 23 | 2 | 90 | 0.2 | 01:10 | 2 | 3.6 |
| 24 | 3 | 90 | 0.2 | 01:10 | 2 | 6,08 |
| 25 | 2 | 30 | 0.1 | 01:20 | 2 | 5.6 |
| 26 | 3 | 30 | 0.1 | 01:20 | 2 | 6.8 |
| 27 | 2 | 90 | 0.1 | 01:20 | 2 | 5.6 |
| 28 | 3 | 90 | 0.1 | 01:20 | 2 | 5.6 |
| 29 | 2 | 30 | 0.2 | 01:20 | 2 | 5.2 |
| 30 | 3 | 30 | 0.2 | 01:20 | 2 | 4.8 |
| 31 | 2 | 90 | 0.2 | 01:20 | 2 | 4.8 |
| 32 | 3 | 90 | 0.2 | 01:20 | 2 | 4 |
| 33 | 2,5 | 60 | 0,15 | 01:15 | 1,5 | 3 |

Le tableau montre que le domaine de variations des rendements est entre 2,4% et 8,6% pour les limites choisies de temps, température, concentration, ratio et coefficient de partage.

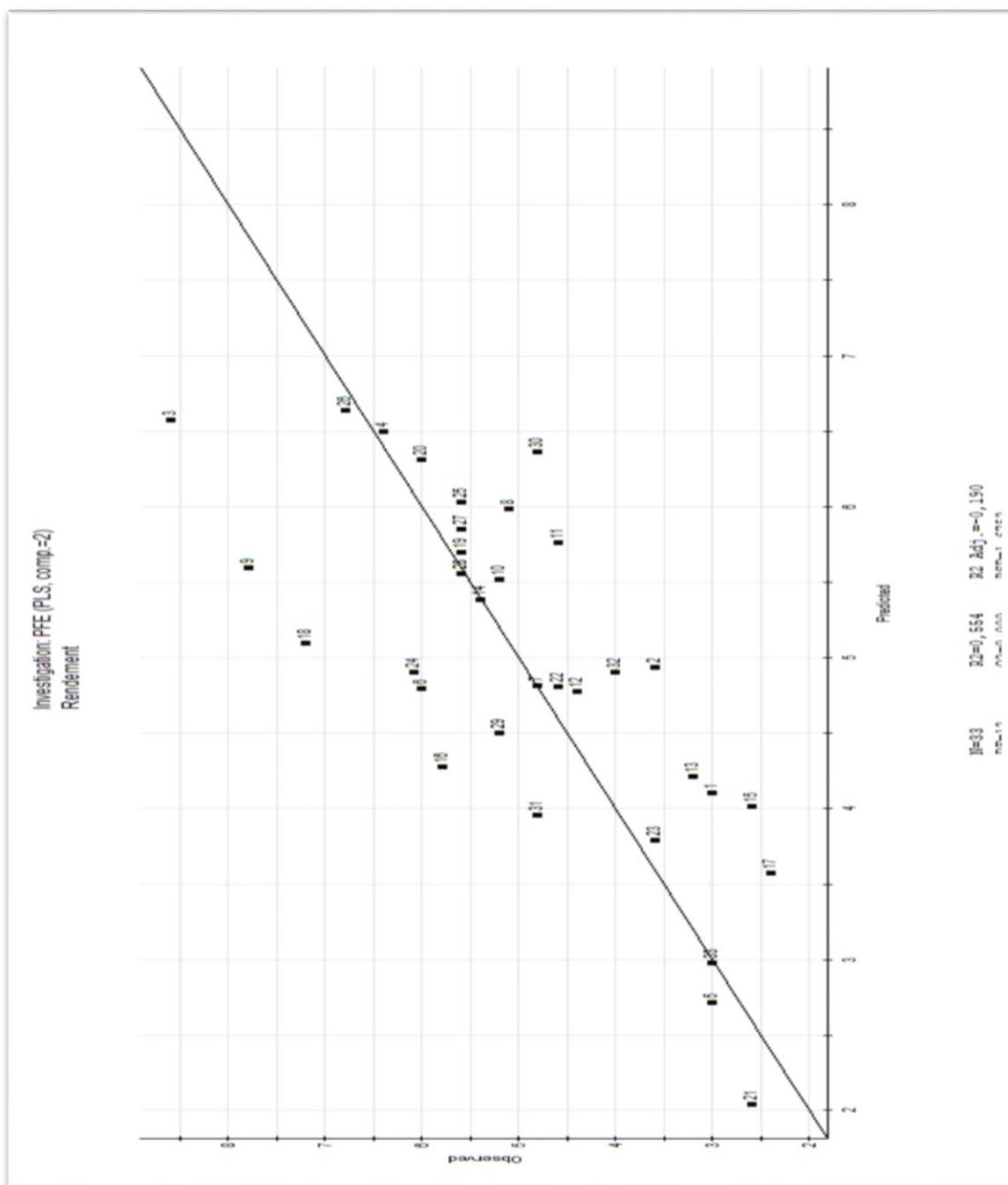
IV.6 Etude statistique

Pour évaluer la fiabilité d'un modèle obtenu par les plans d'expériences, les valeurs de quelques coefficients sont exigées. Le graphique IV.2 représente le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction.



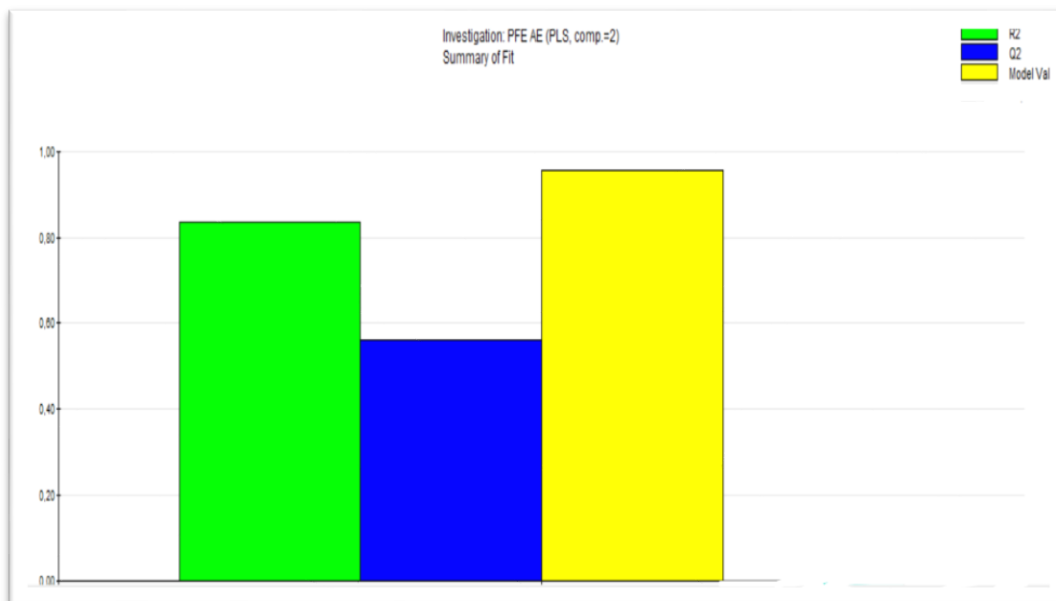
Graphique IV.2: Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction de modèle.

- Pour le rendement la valeur de R^2 est égale à 0,554, cette valeur n'est pas proche de 1 nous permis de dire qu'il y n'a pas une bonne corrélation entre les résultats obtenus.
- La valeur de coefficient de prédiction Q^2 est de l'ordre de 0,00, cette valeur loin de 1 montre que la prédiction des rendements à l'intérieur des intervalles étudiés reste très difficile.



Graphique IV.3 : Comparaison entre les données expérimentales et le modèle de prédiction de rendement

- La difficulté de prédiction peut être expliquée par le le graphique IV.3, comparant les données expérimentales et le modèle de prédiction du rendement. La plupart des points sont suivant la ligne medium à part quelques expériences comme 30, 18, 16, 9 et 3 ce ce qu'on va exclu pour améliorer les valeurs de R^2 et Q^2 (graphique IV.4).



Graphique IV.4: Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction de modèle

- D'après le graphique IV.4, on lire que R^2 est égale à 0,837 ce qui est très proche de 1 et Q^2 est égale à 0,561, ce qui nous permet de dire que maintenant on peut dire qu'il y a une excellente corrélation entre les résultats obtenus.

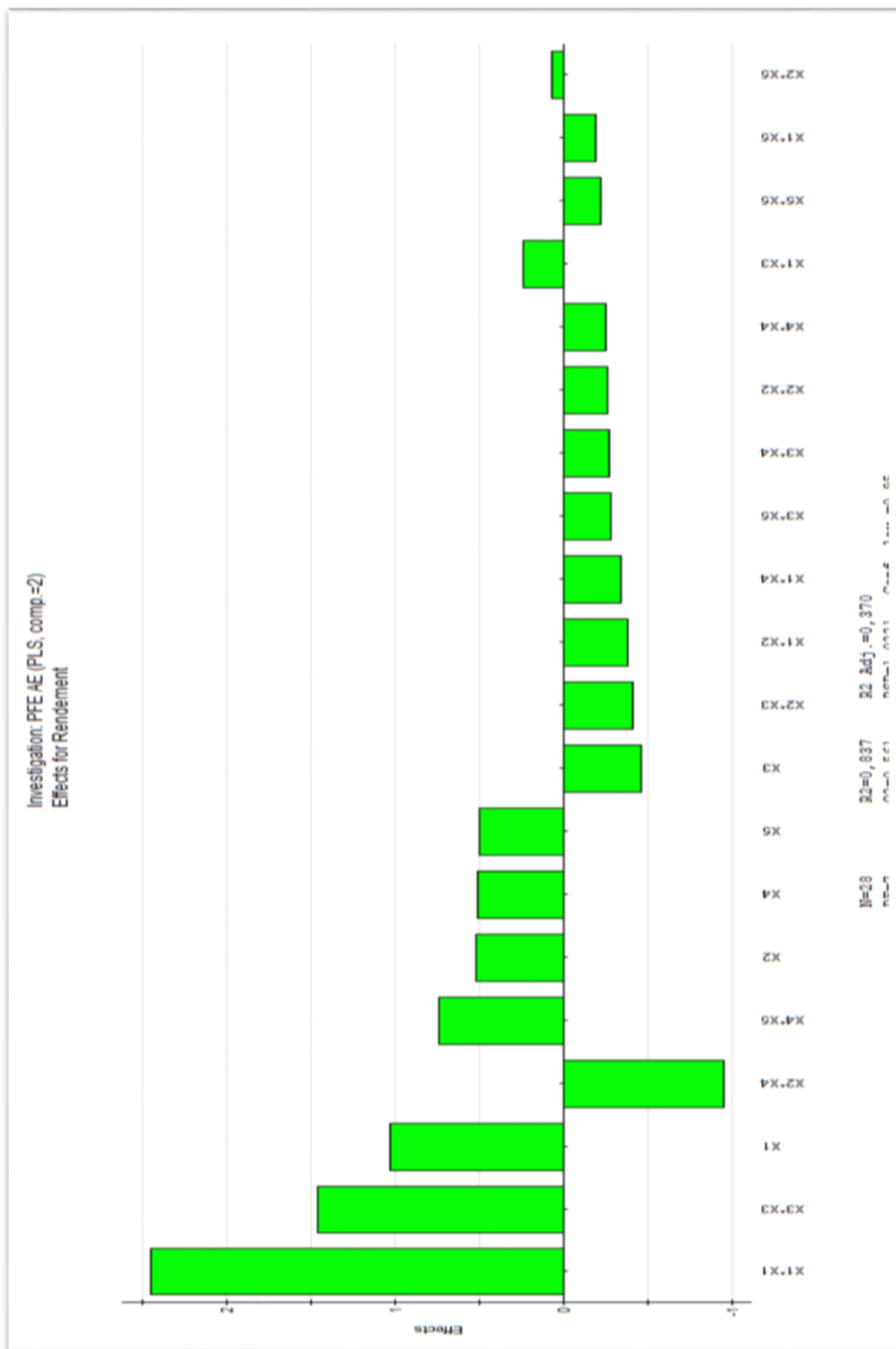
IV.6.1 Modélisation mathématique

Le modèle mathématique liant la réponse avec les cinq facteurs du procédé d'extraction étudié est suivant :

$$Y=1,026X_1+0,519025X_2-0,459807X_3+0,511006X_4+0,494445X_5-0,379103X_1X_2+0,2412X_1X_3-0,345061X_1X_4-0,191592X_1X_5-0,41439X_2X_3-0,953786X_2X_4+0,062092X_2X_5-0,278234X_3X_4-0,287263X_3X_5+0,737412X_4X_5+4,93878$$

IV.6.2 Effets des facteurs étudiés sur le rendement

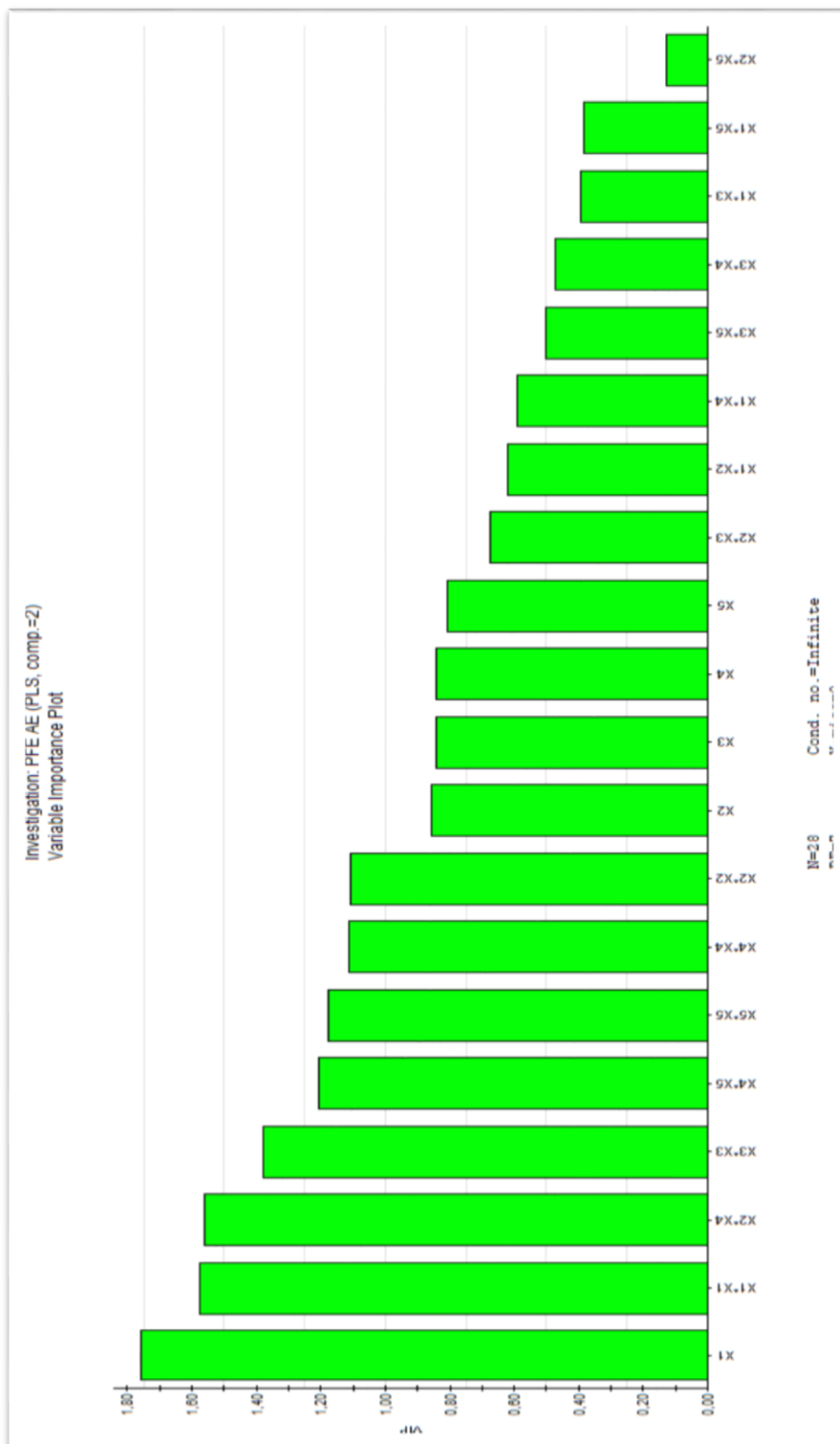
La représentation des effets des facteurs est important pour estimer les variables ayant plus d'influence sur la réponse.



Graphique IV.5: Influence des effets sur la réponse

- ✓ Tous les facteurs influent positivement sauf la concentration ce qui est le troisième facteur influence négativement.

- ✓ L'interaction entre la température et le ratio (X2X4) a l'influence la plus importante sur le rendement ce qui est représenté dans la figure IV.7, et influence négativement.
- ✓ L'interaction entre le temps et le coefficient de partage (X1X5) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre le temps et le ratio (X1X4) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre la température et la concentration (X2X3) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre la concentration et le coefficient de partage (X3X5) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre le temps et la concentration (X1X3) influence positivement.
- ✓ L'interaction entre le temps et la température (X1X2) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre le ratio et le coefficient de partage (X4X5) influence positivement.
- ✓ L'interaction entre la concentration et le ratio (X3X4) influence négativement.
- ✓ L'interaction entre la température et le coefficient de partage (X2X5) a l'influence la moins importante (négligeable) sur le rendement ce qui est représenté dans le graphique IV.6, et influence positivement.



Graphique IV.6 : Classification des variables selon l'importance de leur effet sur la réponse

IV.7 Prédiction des résultats

IV.7.1 La relation entre la réponse et les interactions entre les facteurs

Les contours représentant l'évolution du rendement en fonction de deux facteurs et en fixant les trois facteurs restants au centre. Cela peut être utile pour déterminer les conditions optimales pour maximiser le rendement.

- Les zones de couleur plus bleue indiquent des rendements plus faibles.
- Les zones de couleur plus verte à rouge indiquent des rendements plus élevés.

1^{er} contour : (interaction X1X2)

Les rendements les plus élevés (4.7%) sont atteints à des températures autour de 60°C et des temps proches de 3h.

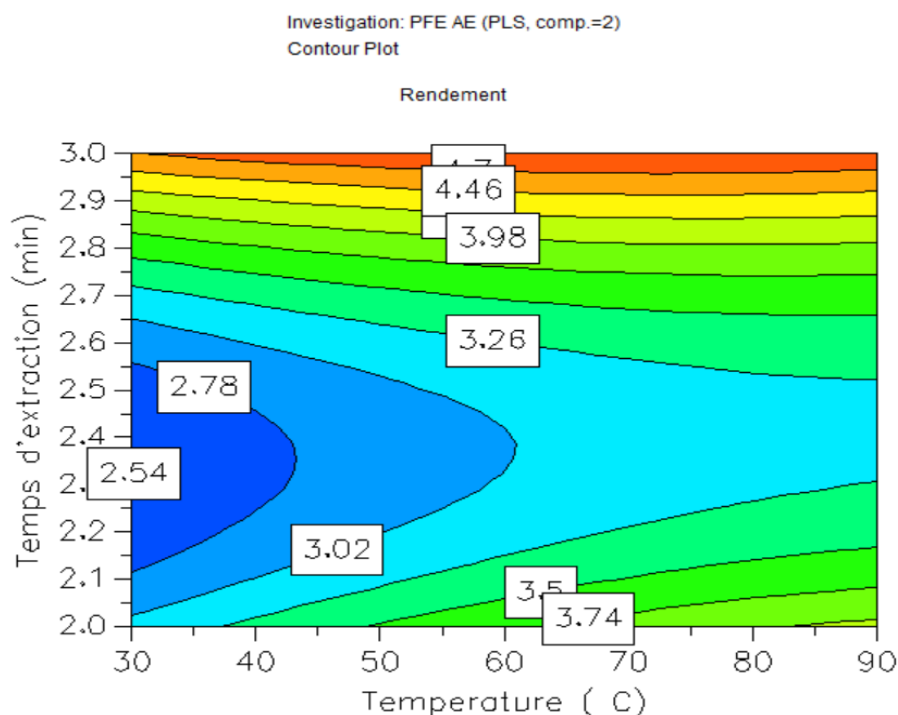


Figure IV.2 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du temps et de température d'extraction

2^{eme} contour : (interaction X1X4)

Les rendements les plus élevés (4,73%) sont atteints à un ratio (X4) environ 15, et de temps(X1) est environ de 3h.

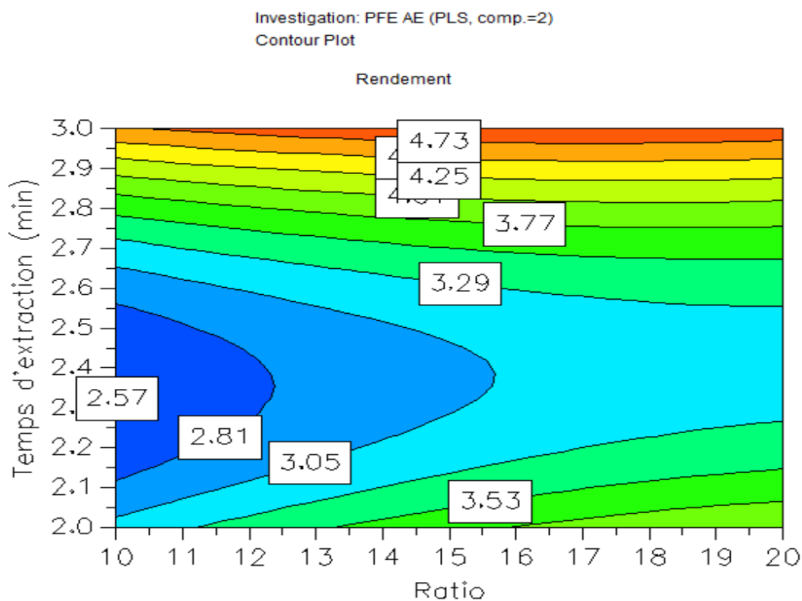


Figure IV.3 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du Ratio et du Temps d'extraction

3^{eme} contour : (interaction X2X3)

Le rendement est égal à 4,29 % au max, lorsque la température (X2) est environ de 80°C et la concentration (X3) soit minimale (environ 0,1 mol/l).

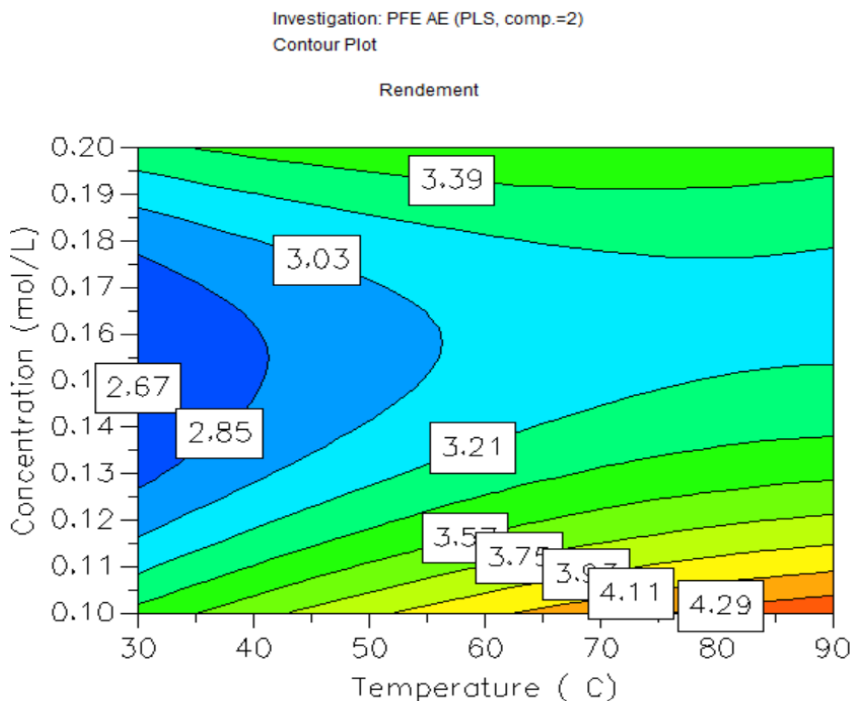


Figure IV.4 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction de la température d'extraction et de la concentration d'HCl

4^{ème} contour : (interaction X4X2)

Le rendement est égal à 3,3% au max, lorsque la température (X2) est maximale environ de 90°C et le ratio (X4) soit environ 10.

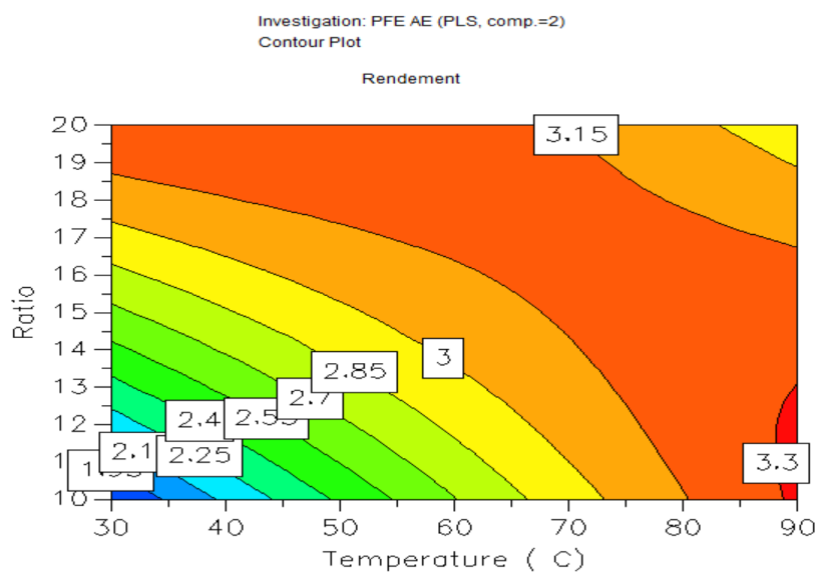


Figure IV.5 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction de la température d'extraction et du ratio

5^{ème} contour : (interaction X4X3)

Les rendements les plus élevés (4,22%) sont atteints à un ratio (X4) environ 20 et des concentrations (X3) faibles (0,1 mol/l).

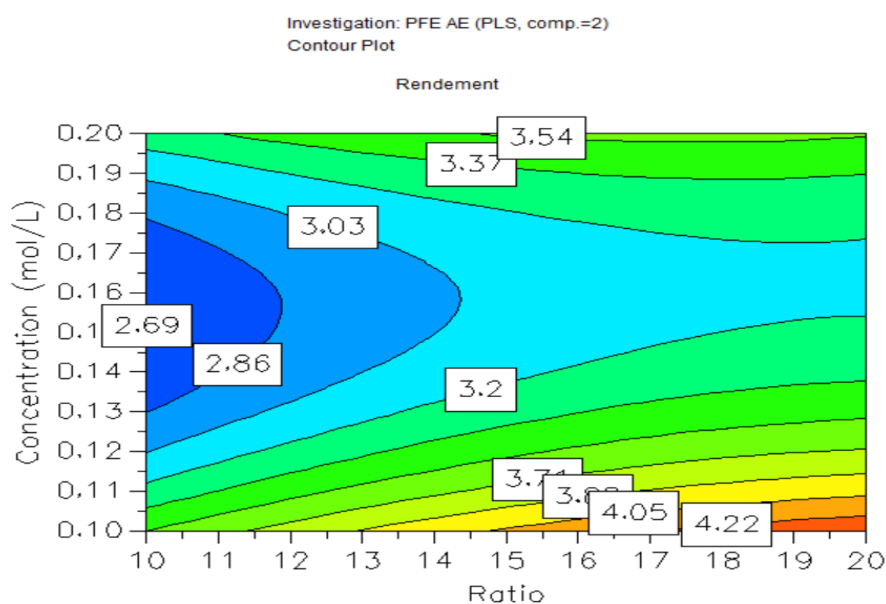


Figure IV.6 : Carte de contours de la variation du Rendement en Fonction du ratio et de concentration d'HCl

6^{ème} contour : (interaction X5X3)

Les rendements les plus élevés (4,33%) sont atteints à un coefficient de partage (X5) environ 2 et concentration (X3) environ 0,1 mol/l.

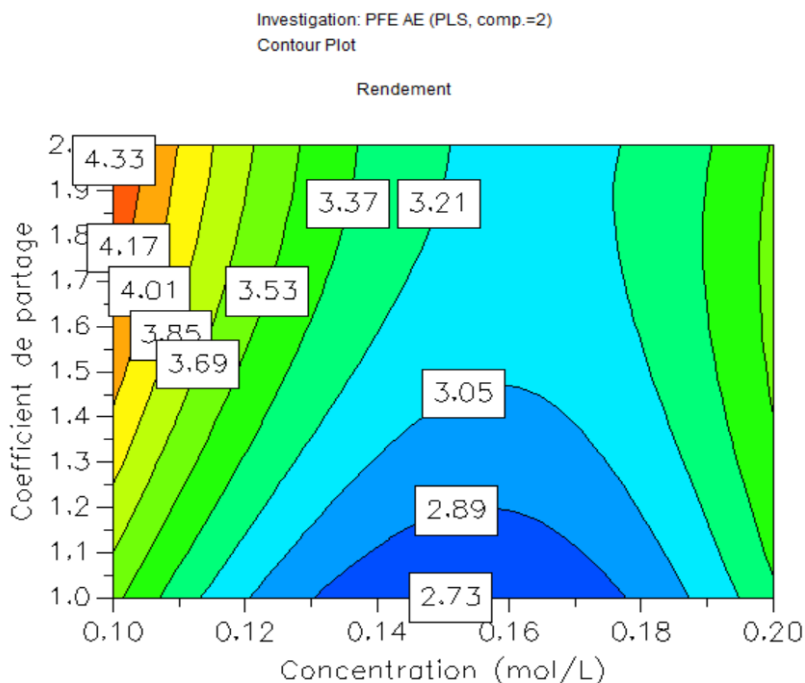


Figure IV.7: Carte contours de la variation du Rendement en Fonction de la concentration d'HCl et du coefficient de partage

7^{ème} contour : (interaction X5X4)

Le rendement est égal à 3,63% au max lorsque le ratio (X4) est égal à 20 et le coefficient de partage environ 2.

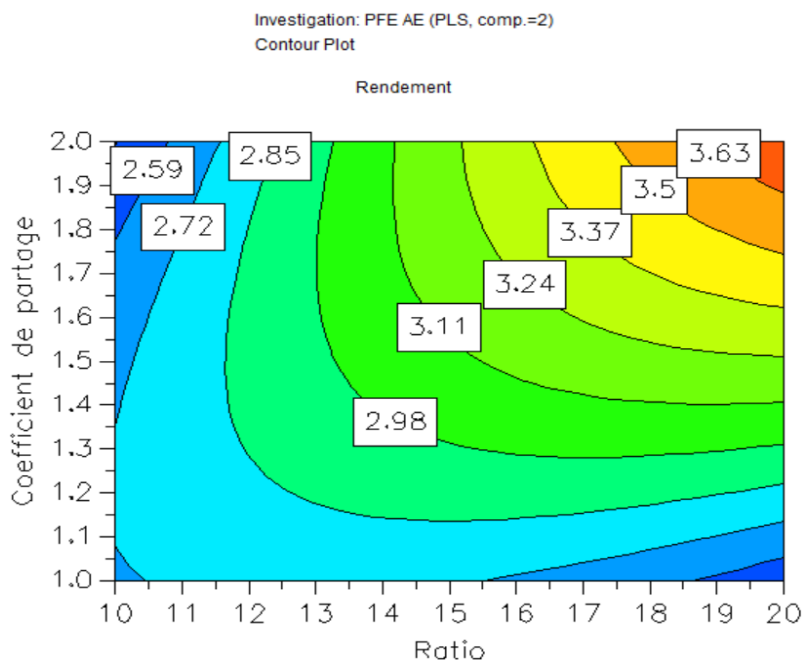


Figure IV.8 : Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du ratio et du coefficient de partage

8^{eme} contour : (interaction X1X3)

Les rendements les plus élevés (5,5%) sont atteints à un temps environ 3h et une concentration faible (0,1 mol/l).

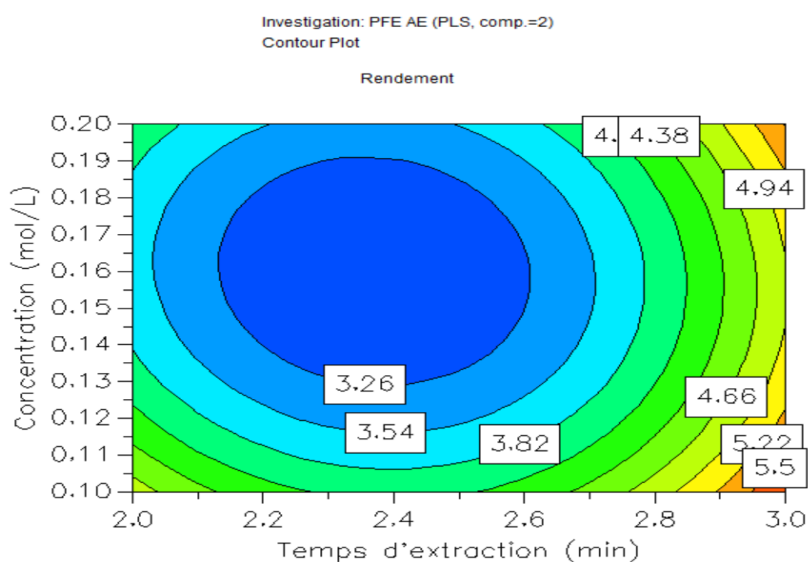


Figure IV.9: Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du temps d'extraction et de concentration d'HCl

9^{ème} contour : (interaction X1X5)

Les rendements les plus élevés (4,93%) sont atteints à un temps autour de 3h et un coefficient de partage élevé.

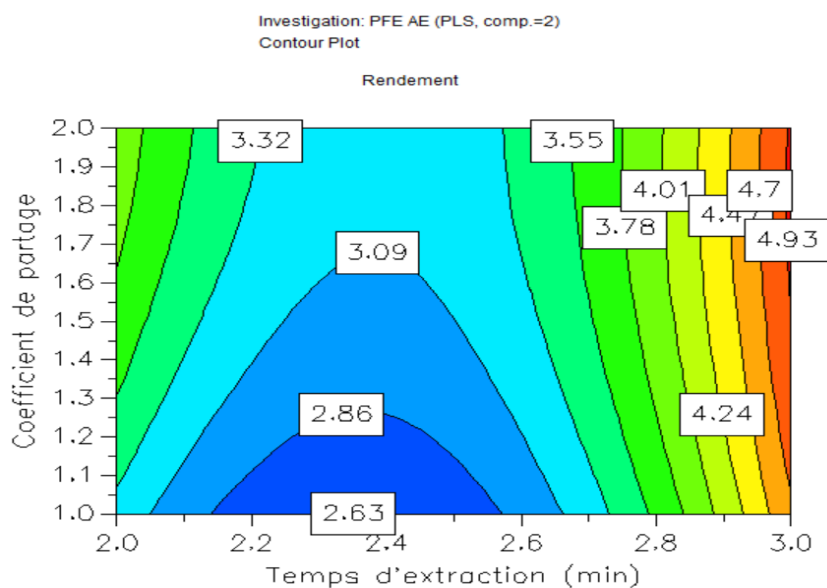


Figure IV.10: Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du temps d'extraction et du coefficient de partage

10^{ème} contour : (interaction X2X5)

Les rendements les plus élevés (3,33%) sont atteints à une température et le coefficient de partage élevés.

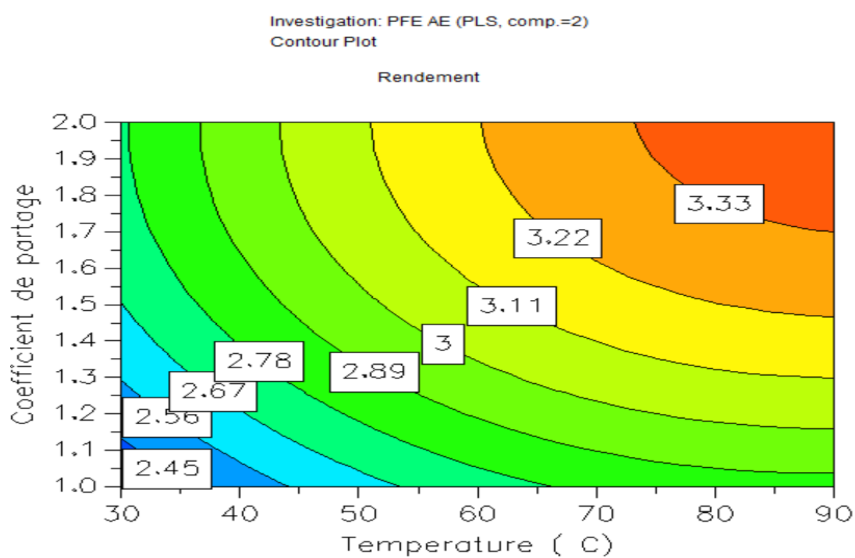
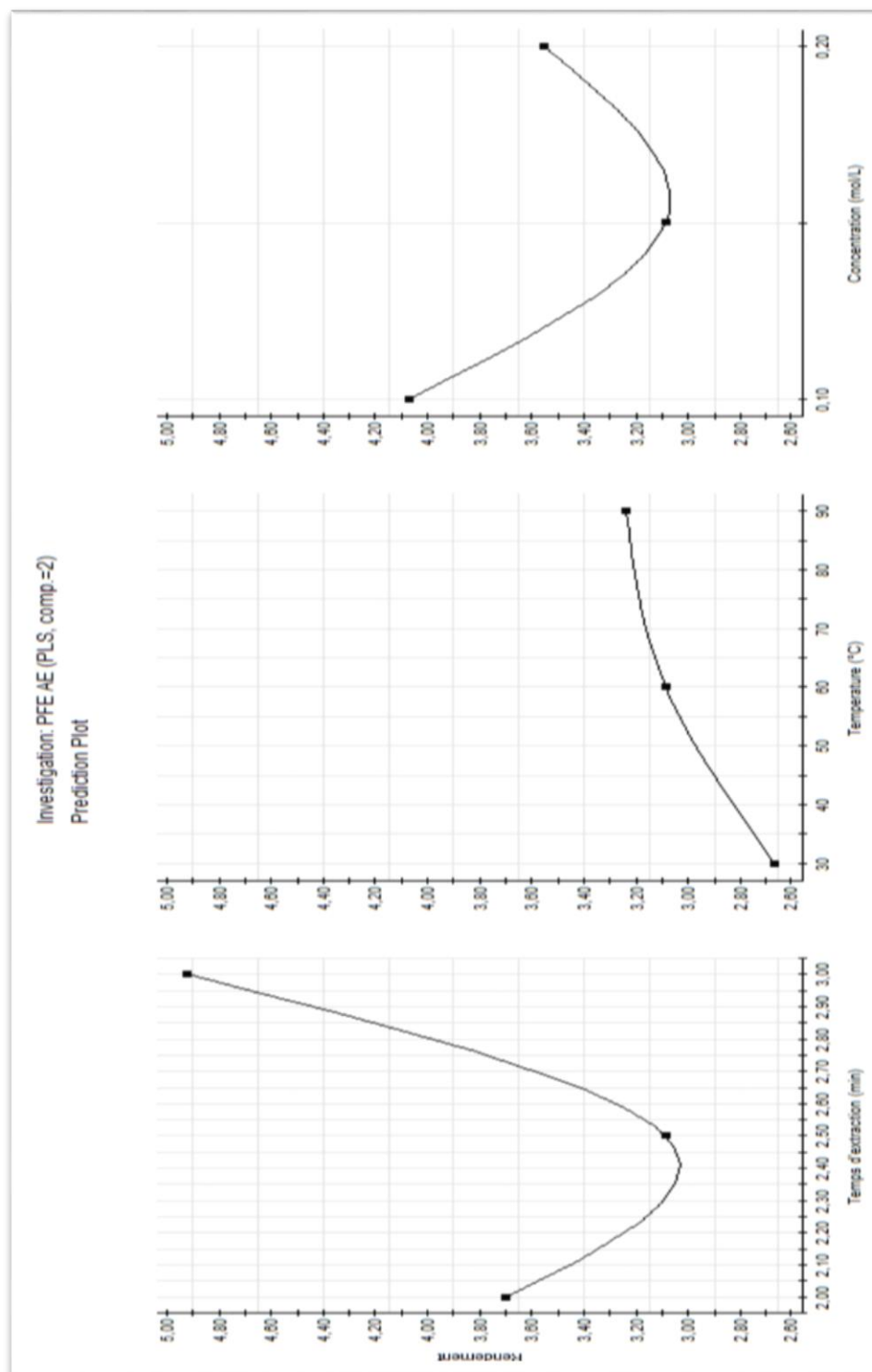


Figure IV.11 : Carte contours de la variation du Rendement en Fonction du température d'extraction et de coefficient de partage

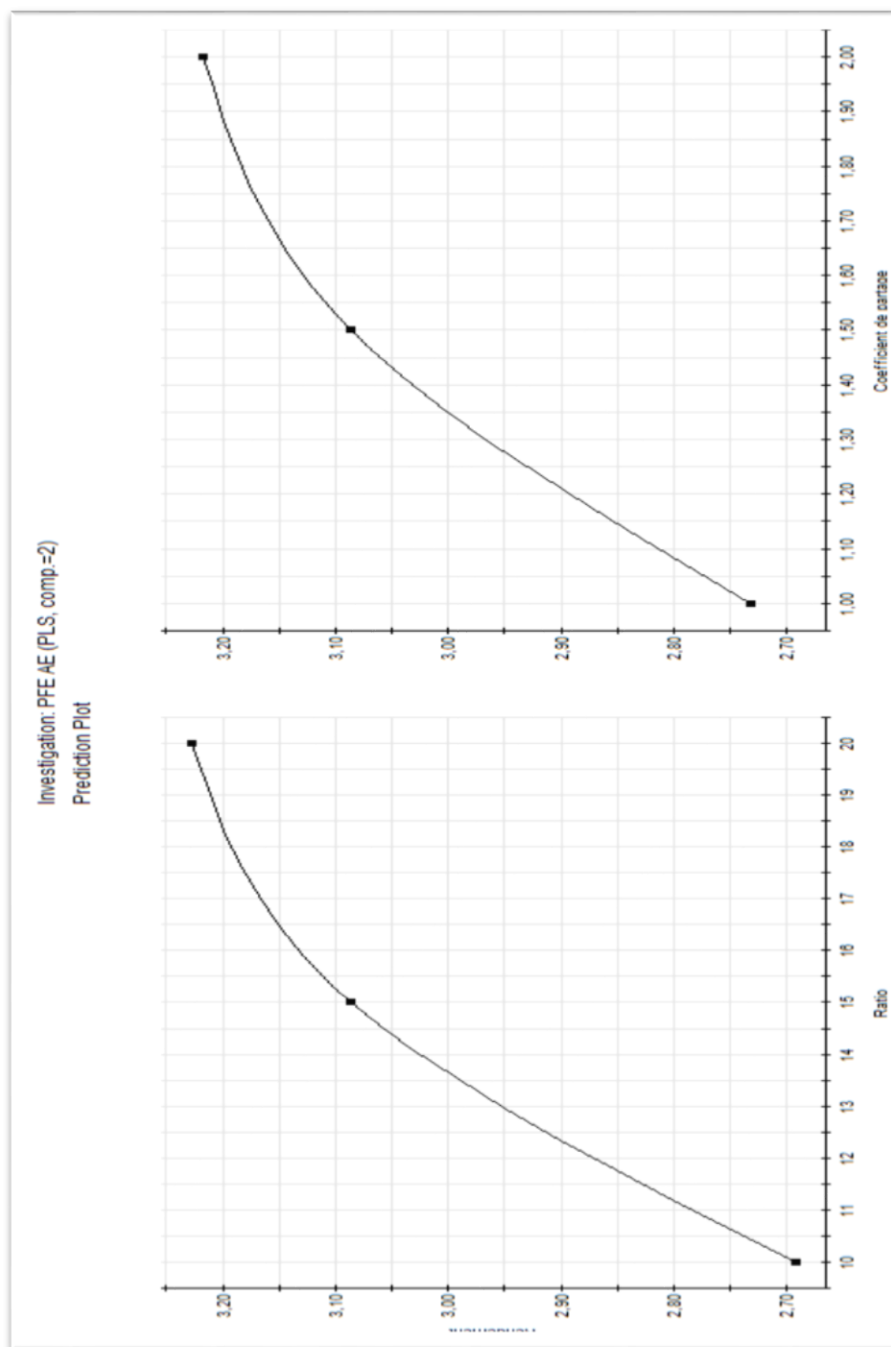
IV.8.2 La relation entre la réponse et les facteurs

Dans cette partie on va représentant l'évolution du rendement en fonction de chaque facteur :



Graphique IV.7: Courbes de variation du rendement en fonction de temps, température et la concentration

- 1^{er} graphe (Le graphe de la variation de rendement en fonction du temps) : on remarque que lorsque le temps augmente [2,5 h-3 h] le rendement augmente [3,1%-4,9%], et lorsque le temps augmente entre [2h-2,5 h] le rendement diminue [3,6%-3,1%].
- 2^{eme} graphe (Le graphe de la variation de rendement en fonction de la température) : on remarque que lorsque la température augmentent entre [30°C-60°C] le rendement augmente, et lorsque la température est entre [60°C-90°C] le rendement presque constant [3,10%-3,20%].
- 3^{eme} graphe (Le graphe de la variation de rendement en fonction de la concentration) : Lorsque la concentration augmentent entre [0,1M-0,15M] le rendement diminue [4,10%-3,10%], et lorsque la concentration augmentent entre [0,1M-0,2M] le rendement augment [3,10%-3,50%].



Graphique IV.8 : Courbes de variation du rendement en fonction de ratio et le coefficient de partage

- 4^{ème} graphe (Le graphe de la variation de rendement en fonction de ratio) : le rendement augmente lorsque le ratio augmente entre [10-20].

- 5^{ème} graphe (Le graphe de la variation de rendement en fonction de coefficient de partage) : le rendement augmente lorsque le coefficient de partage augmente entre [1-2].

IV.8 Matrice des optimums

Le logiciel MODE6 nous a permis de générer une matrice des optimums (Tableau IV.2). Les résultats obtenus montrent clairement que l'optimum est l'expérience numéro 26.

Tableau IV.2 : Matrice des optimums

| Temps d'extraction (min) | Température (C) | Concentration (mol/L) | Ratio | Coefficient de partage | Rendement |
|---------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------|-------------------------------|------------------|
| 2,0087 | 82,1299 | 0,1 | 20 | 2 | 6,0567 |
| 2,9998 | 84,2005 | 0,1 | 14,4337 | 1,9998 | 6,122 |
| 2 | 89,9925 | 0,1995 | 12,3247 | 1,5355 | 4,2278 |
| 3 | 30,0013 | 0,1982 | 19,9961 | 2 | 5,9788 |
| 3 | 88,6971 | 0,1 | 10,0113 | 1,3499 | 6,0562 |
| 3 | 42 | 0,1 | 20 | 2 | 6,4803 |
| 2 | 86,8963 | 0,1 | 20 | 2 | 6,1007 |
| 2,9936 | 51,6085 | 0,1004 | 19,9787 | 1,9975 | 6,4198 |

IV.9 Résultats des méthodes conventionnelles

Les résultats obtenus par ces techniques d'extraction conventionnelles (extraction par solvant en utilisant le montage de Soxhlet et par une deuxième méthode de macération) sont présentés dans le tableau. (Tableau IV.3).

Tableau IV.3 : Les résultats des différents techniques d'extraction

| Méthodes | Extraction par macération | Extraction par Soxhlet | extraction par l'eau acidifiée | |
|-----------|---------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------|
| | | | inferieur | supérieur |
| Rendement | 1,6% | 1,5% | 2,4% | 8,6% |

Ces résultats montrent que des rendements d'extraction par les méthodes conventionnelles sont nettement inférieures à ceux trouvés avec la méthode d'extraction optimisée par les plans d'expériences

IV. Discussion des résultats

- Le coefficient de partage influe positivement sur le rendement de l'extraction. Cette influence positivée est due à l'augmentation de la phase organique lors de l'extraction des alcaloïdes liquide –liquide par le chloroforme
- De même la température est un facteur positif favorisant l'extraction des alcaloïdes par l'eau acide il permet une meilleure solubilisation de la matière solide dans le milieu aqueux
- Le temps ainsi que la concentration de HCl ont une influence légère tandis que le ratio influe positivement sur cette extraction de ces alcaloïdes par l'eau acidifié.
- Le point comment entre ces facteurs est le contacte des alcaloïdes par les ions chlorures qui leurs permettent le passage dans l'eau acide sous forme de sels facilement récupérables. Né au moins ce passage peut engendrer la dégradation des alcaloïdes ce qui diminue le rendement d'extraction.

Conclusion générale

L'extraction des alcaloïdes est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin, ils auront ainsi le pouvoir d'être séparés des autres constituant de la matière végétale.

L'objectif de cette étude est l'optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes par la méthode des plans d'expériences à partir d'une plante algérienne saharienne de la région d'Oued Souf afin de valoriser cette espèce de la famille des Ephédrales.

- Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que la plante végétale contient une quantité importante d'alcaloïdes.
- L'optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes par la méthode des plans d'expériences nous a permis d'avoir les résultats fixant les valeurs optimums :
 - Temps d'extraction de 3 heures,
 - Température d'extraction 30°C
 - Le ratio (rapport matière végétale / solvant) égale à 1:20 ,
 - Concentration de HCL 0,1 mol/L
 - Un coefficient de partage égale à 2.

Conduisant ainsi à un rendement d'extraction égale à 6,8%

L'étude de l'effet de ces facteurs a montré qu'il y a une grande influence sur le procédé d'extraction.

L'extraction par les méthodes conventionnelles dans les solvants organiques polaires l'éthanol et le méthanol, nous ont permis d'extraire les alcaloïdes à des rendements égaux à 1,6 % et 1,5 % respectivement.

L'identification des composés d'alcaloïdes extraites par la chromatographie en phase liquide HPLC nous a permis de confirmer la présence d'un produit majoritaire, le chlorhydrate de pseudo Ephédrine à un temps de rétention égale à 1,99 min

Enfin l'ensemble des résultats obtenus ne consiste qu'un premier pas dans la recherche des meilleures méthodes et meilleurs paramètres d'extraction des substances naturelle ayant un

grand intérêt dans la chimie des molécules organiques. A cet effet plusieurs perspectives sont à envisager :

- Compléter l'optimisation en incluant d'autres paramètres comme la taille des particules
- Optimiser d'autres méthodes d'extraction par une étude d'extraction par ultrason.
- Caractérisation de ces alcaloïdes par la chromatographie en phase liquide couplée par la spectroscopie de masse pour déterminer tous les composants chimiques de ces alcaloïdes.
- Etude de l'activité pharmacologique des alcaloïdes qui pourraient être des produits de départ dans la formulation des produits médicaux.

Références bibliographiques

1. Fellous A. "la station d'élevage de la Gazelle dorcas (Gazelle dorcas) dans le sud-ouest algérien". IIème Séminaire Antilopes Sahelo Saharienne, 1-5 mai 2003, Agence Nationale pour la Conservation de la Nature, Agadir Maroc. 7 p.
2. Gomes C. et al. "Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, (2012), 481-487.
3. Mamadou B. Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur d'université. Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. 137 p.
4. Roy A. "A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants". *IJPB*, vol. 3, n° 2, (2017), 1-9.
5. Funayama S., Cordell G. A. *Alkaloids: a treasury of poisons and medicines*. Elsevier, 2014b.
6. Aniszewski T. *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*. Elsevier, 2015.
7. Mondal A., Gandhi A., Fimognari C., Atanasov A., Bishayee A. "Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives". *European Journal of Pharmacology*, 172472, (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>.
8. Babbar N. "An introduction to alkaloids and their applications in pharmaceutical chemistry". *The Pharma Innovation Journal*, vol. 4, (2015), 74-75.

9. Yang L., Stöckigt J. "Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids". *Natural Product Reports*, vol. 27, n° 10, (2010), 1469-1479. <https://doi.org/10.1039/c005378c>.
10. Goudjil M. B., Ladjel S., Bencheikh S. E., Zighmi S., Hamada D. "Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 7, n° 1, (2015), 379-385.
11. Bendahou M. Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest Algérien. Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaïd, Faculté des Sciences, Tlemcen, 2007.
12. Djama S., Karour T. Les alcaloïdes : Classification, extraction, criblage et activités biologiques.
13. Roberts M.F. *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
14. Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 4ème édition, Lavoisier Tec & Doc, 2009. 1268 p.
15. Krief S. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat "Ecologie et chimie des substances naturelles", Muséum national d'histoire naturelle, Paris, 2003. pp. 31-32.

16. Kar A. Terpenoids. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. New Age International (P) Limited, 2007. 215-328.
17. Zenk M. H., Juenger M. "Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds". *Phytochemistry*, vol. 68, n° 22-24, (2007), 2757-2772. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.009.
18. Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie des Plantes Médicinales*. 3ème édition, revue et augmentée, Tec & Doc, Paris, 1999.
19. Benslama A. *Substances d'origine végétale*. Université Mohamed Khider-Biskra, 2016. 68 p.
20. Popl M., Fahrnich J., Tatar V. *Chromatographic Analysis of Alkaloids*. Marcel Dekker, 1990. p. 66-67.
21. Jean B. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4ème édition, Lavoisier, 2009.
22. Tidjani S., Rhouati S. *Etude phytochimique et évaluation biologique de l'espèce Senecio delphinifolius Vahl*. 2016, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة.
23. Eguchi R., Ono N., Horai H., Amin M. A.-U., Hirai A. M., Kawahara J., Kanaya S. "Classification of alkaloid compounds based on subring skeleton (srs) profiling: On finding relationship of compounds with metabolic pathways". *Journal of Computer Aided Chemistry*, vol. 18, (2017), 58-75.

24. Yinyang J., Mpondo E. M., Tchatat M., Ndjib R., Ottou P. M., Dibong S. "Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun)". *Journal of Applied Biosciences*, vol. 78, (2014), 6600-6619.
25. Pharmacognosie B. J. Phytochimie, plantes médicinales. Revue et augmentée, Tec & Doc, Paris, 1999.
26. Jaber A. Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications, 2017.
27. Muniz M. N. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) -anatoxine-a et la (±) -camptothécine. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 2006. p. 11-29.
28. Ibn Hamadoush A. R. M. Revelation des enigmas dans l'exposition des drogues et des plantes. ed. Beirut, 1996. p. 63-64.
29. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. ed. 1993. p. 629-642.
30. Dih A., Belguendouz A. Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes extraits d'*Osyris alba* L, récoltée au niveau de la région de Beni-Snousse. Mémoire de Master en biologie, Université Abou-Bekr Belkaïd, Tlemcen, 2017. 39 p.
31. Ramanathan S., Parthasarathy S., Murugaiyah V., Magosso E., Tan S. C., Mansor S. M. "Understanding the physicochemical properties of mitragynine, a principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, for preclinical evaluation". *Molecules*, vol. 20, n° 3, (2015), 4915-4927.

32. Caraffa N. Se soigner par les plantes herboriste. Berti, 1999. p. 1-2.
33. Richter G. Métabolisme des végétaux. ed. France, 1993. p. 437-455.
34. Mohammad Mounir S. Département Génie des procédés Industriels. Université de La Rochelle, 2007.
35. Benabdallah H. Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Master Analyses biochimiques. Université Ferhat Abbas, Sétif, 2016. 75 p.
36. Bouzouita N. et al. "Oil Res". vol. 17, (2005), 584.
37. Toulemonde V. "Cinétique d'extraction liquide-liquide du nitrate d'uranyle et des nitrates d'actinides (III) et de lanthanides (III) par des extractions à fonction amide". Thèse de doctorat, Université de Paris VI, 1995. p. 15.
38. Ben amor B. Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée. Thèse pour obtenir le grade de Docteur, Université de La Rochelle, 2008. pp. 11.
39. Djilani A., Legseir B., Soulimani R., Dicko A., Younos C. "New extraction technique for alkaloids". Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 17, n° 3, (2006),
40. Zirena Marca, D. S. "Évaluation de l'effet escabicide de l'extrait *Lupinus Mutabilis* Sweet (Tarwi), pour le traitement de la gale humaine, en patients du 'Hôpital Régional Honorio Delgado'." (2015).

41. Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., & Gallo, M. "Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques." *Foods*, vol. 8, n° 7, (2019), p. 1-22.
42. Hamidi, A. Étude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de Magister en Chimie Organique, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 86 p., (2013).
43. Penchev, P. I. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. (2010).
44. Leybros, J. & Frémeaux, P. "Extraction solide-liquide aspects théoriques." *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés*, J1 077 06, (1990).
45. Groubert, A. *Techniques d'extraction végétale*. Montpellier, 1984. Pharmacie.
46. Gerin M. *Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution*. Paris, Ed. Masson, 2002.
47. Yilmaz, Y. & Toledo, R. T. "Oxygen radical absorbance capacities of grape/industry by-products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols." *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, (2006), p. 41-44.
48. Leybros, J. & Frémeaux, P. "Extraction solide-liquide - Aspects théoriques." *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés*, J 2780.
49. Aguilera, J. M. "Solid-liquid extraction." *Food Sciences and Technology*, vol. 128, (2003), pp. 35-55.

50. Sparr Eskilsson, C. & Bjorklund, E. "Analytical-scale microwave-assisted extraction." *Journal of Chromatography A*, vol. 49, (2000), p. 415-420.
51. Koller, E. *Génie chimique*. Paris, (2001), p. 433, 434, 440, 435.
52. Dibert, K. & Cros, E. "Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee, Part II: Kinetic data." *Journal of Food Engineering*, vol. 10, n° 3, (1989), p. 199-214.
53. Leybros, J. & Frémeaux, P. "Extraction solide-liquide aspects théoriques." *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*, (1990).
54. Lehtinen, P. & Laakso. "Effet of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber." *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, (1988), p. 4842-4845.
55. Mafarat, P. & Beliard, E. *Génie Industriel Alimentaire. Tome I, Ed Tech et doc*, Lavoisier, Paris, (1992).
56. Gao, L. & Mazza, G. "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls." *Journal of Food Science*, vol. 61, (1996), p. 600-603.
57. Poling, B. E., Prausnitz, J. M. & O'Connell, J. P. *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill, (2000).
58. Bimbenet, J., Duquenoy, A. & Trystram, G. "Génie des procédés alimentaires, Des bases aux applications." Ed DUNOD, Paris, (2003), p. 159-162.

59. Belkadi, Thanina & Maked, Ludmila. "Traitement des margines d'olives par co-précipitation en utilisant les plans d'expériences." Mémoire Master en chimie, Université de Tizi-Ouzou, Algérie, 74 p., (2016).
60. Belfegas, Houda & Djendi, Ahlem. "Protection de l'acier contre les effets de salinité Cl-." Mémoire Master, Université de Bordj Bou Arreridj, 89 p., (2020).
61. Saheb, Fares & Mahdjioub, Oumesaad. "Modélisation de conception de mélange pour évaluer l'effet de la nature de sable sur la propriété physico-mécanique de béton." Mémoire de Master Académique, Université Djelfa, 70 p., (2017).
62. Tinson, W. Plans d'expériences : constructions et analyse statistiques. Mathématiques et Applications, vol. 67, Springer, (2010), 532 p.
63. Linder, R. Les plans d'expériences : un outil indispensable à l'expérimentateur. Paris, (2005), p. 1, 15.
64. Boudjeniba-Bouzaouit, N. Étude par simulations numériques de la réactivité dans la réaction d'acylation enzymatique de substrats osidiques, (2012).
65. British pharmacopoeia commission, Great Britain Medicines commission, & General Medical Council (Great Britain). Bernan press (PA), (2000).
66. Sahraoui, W. Les alcaloïdes : Réaction de précipitation. Laboratoire de Pharmacognosie, p. 3.

67. Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibijbjen, J., & Nassiri, L. "Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica* : *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L." *Journal of Applied Biosciences*, vol. 87, (2015), p. 8094-8104.
68. Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. "Phytochemical screening of some species of Iranian plants." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (2003), p. 77-82.
69. Alli, K. Étude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse de doctorat, Université de Constantine, (2012), pp. 83-88.
70. Harborne, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. (3rd Ed.) London: Chapman & Hall, (1998), ISBN: 0-412-57270-2, 302 p.
71. Hisiger, S., & Jolicoeur, M. "Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC." *Phytochemistry Reviews*, vol. 6, n° 2-3, (2007), p. 207-234.