

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

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Option : Génie chimique

Intitulé du mémoire

Optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes à partir d'une matrice végétale

Présenté par :

BENCHERIF Maroua

SIAD Assia

Encadré par :

Dr.Z.CHEURFA

Co-Encadré par :

Dr.Y.NAIT BACHIR

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier à travers cet ouvrage les personnes auxquelles nous devons tout le respect pour leurs efforts fournis pour former et porter la bonne connaissance aux étudiants.

Nous tenons à saluer nos professeurs qui ont montré une grande patience et bonne volonté pour nous transmettre une culture enrichissante ajoutée à notre longue carrière et nous ont ressuscité de notre latence.

*Nous adressons notre sincères remerciements au **Dr.Cheurfa Zahia** enseignante à l'université Saad Dahleb BLIDA-1- notre promotrice d'avoir accepté de diriger ce travail aussi pour son aide, sa compétence, sa disponibilité et surtout pour sa patience ; qu'elle trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances et nos marques de respect, nous avons beaucoup appris de vous.*

*Nous exprimons également notre gratitude au **Dr.Nait Bachir** enseignant à l'université Saad Dahleb BLIDA-1-, qu'il trouve ici notre profonde reconnaissance pour son aide précieuse.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements au **Pr.H.BOUTOUMI** et **Mr H.LEUTRECHE** pour sa disponibilité et son aide et à tout le personnel du laboratoire pour leurs encouragements et leurs aides précieuses durant toute la période de formation.*

On n'oublie bien évidemment pas et les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.

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

Maroua et Assia

DEDICACES

D'un simple geste tracé par écrit mais qui jaillit d'un profond sentiment de reconnaissance, permettez-moi de citer des noms comme un mémorandum pour ceux qui ont une place particulière dans mon cœur.

En premier lieu, je remercie « Dieu », le tout puissant de m'avoir donné le courage, santé et volonté pendant mon cursus universitaire.

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie ; **Maman** que j'adore.*

*À mon deuxième papa, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de Joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Que dieu lui procure bonne santé et longue vie ; Mon frère **Sidali** Que j'aime ainsi que sa très chère femme **Fadia** et leurs enfants angéliques **Mohamed** et **Maramé**.*

*À mes deux chers frères mon cher jumeau **Abdou**, **Mahieddine** ainsi que sa femme **Latifa** je vous aime.*

*À ma famille du cœur, mes très cher(e)s ami(e)s **Madjda**, **Sarra**, **Fouad**, **Houssam**, **Assia**, **Rekia**, **Amine**, **Soumia** et **Nadjla**.
Tous les mots ne sauraient exprimer l'amour, la gratitude d'avoir donné le meilleur d'eux-mêmes, merci pour les moments inoubliables je vous adore.*

*Parce que la distance géographique n'a rien à voir avec la distance affective, à mon très chère amie loin des yeux, près du cœur **Hafsa** tu me manque tellement...*

*À mon très chère binôme combattante **Maroua** et toute la promo
2018/2019*

Assia

DEDICACES

D'un simple geste tracé par écrit mais qui jaillit d'un profond sentiment de reconnaissance, permettez-moi de citer des noms comme un mémorandum pour ceux qui ont une place particulière dans mon cœur.

En premier lieu, je remercie « Dieu », le tout puissant de m'avoir donné le courage, santé et volonté pendant mon cursus universitaire.

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et Source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive. , à toi
mon père.*

À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie

*Mes sœurs : **Romaïssa et Khadidja**, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A mes chers frères **Fares et Sami** Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour toute la spontanéité et tes élans chaleureux, Je te dédie ce travail. A mon très cher fiancé **Yacine** Quand je t'ai connu, j'ai trouvé mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

A mes ancres et mes tentes

*A ma soeur, que ma mère n'a pas enfantée ma belle cousine **Bouchra**.*

A ceux qui et donnent aux sources de la pure honnêteté à ceux avec qui j'étais heureux, et avec leurs bénédictions dans les chemins de la vie douce et triste je marchais à ceux qui étaient avec moi sur le chemin du succès et du bien

*Mes amis : **Nesrine, Fatiha et Maroua***

*A mon très chère binôme combattante **Assia**
A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible,
je vous dis merci.*

Maroua

الملخص

يتمثل هذا العمل في تحسين ظروف التشغيل لاستخراج قلويدات بواسطة الماء الحمضي. يتم إجراء الدراسة من خلال النمذجة السطحية للاستجابات التي تتيح تقييم الآثار الرئيسية.

لتحسين استخراج قلويدات بواسطة المياه الحمضية، اخترنا خمسة متغيرات: درجة الحرارة، ووقت الاستخراج، وتركيز الحمض، ونسبة ومعامل التقسيم. وجدنا أن أفضل تجربة هي التجربة رقم 20 مع عائد استخراج يصل إلى 10.75%.

لقد لاحظنا أن أفضل معامل يؤثر على الاستخراج هو معامل التقسيم وأفضل تفاعل هو بين درجة الحرارة والنسبة.

لضمان وجود قلويدات أجرينا تحاليل نوعية وكمية خلال دراستنا (HPLC, CCM, IR)

الكلمات المفتاحية: التحسين، الاستخراج، قلويدات، نمذجة الاستجابات السطحية

Résumé

Le présent travail consiste à optimiser les conditions opératoires de l'extraction des alcaloïdes par l'eau acide. L'étude est réalisée par la modélisation en surface de réponses qui permet l'évaluation des effets principaux.

Pour optimiser l'extraction des alcaloïdes par l'eau acide nous avons choisi cinq facteurs variables : la température, le temps d'extraction, la concentration d'acide, le ratio et le coefficient de partage ; nous avons trouvé que la meilleure expérience c'est l'expérience N°20 avec un rendement d'extraction qui atteint les 10.75%.

Nous avons notés le meilleur paramètre influençant l'extraction c'est le coefficient de partage et la meilleure interaction est entre la température et le ratio.

Nous avons procédé durant notre étude à des analyses qualitatives et quantitatives (HPLC, CCM, IR) permettons l'assurance de présence des alcaloïdes.

L'étude de l'activité antioxydant des extrais méthanolique des alcaloïdes sur le DPPH à montrer que la valeur de DL_{50} obtenu est égale à 1,37 mg/l, celle-ci est inférieure à celle de l'acide ascorbique qui est l'agent antioxydant de référence, de ce fait l'activité antioxydant des alcaloïdes est plus importante

Mots clés : optimisation, extraction, alcaloïdes, modélisation en surface de réponses.

Abstract

The present work consists of optimizing the operating conditions for the extraction of alkaloids by acidic water. The study was performed by the response surface modeling that allows the evaluation of major impacts.

To optimize the extraction of alkaloids by acidic water we have chosen five variable factors: temperature, extraction time, the acid concentration, the ratio and partition coefficient; we have found that the best experience is experiment N°20 with an extraction efficiency of 10.75%. We have noted the best parameter influencing extraction is the partition coefficient and the best interaction is between temperature and ratio.

During our study, we conducted qualitative and quantitative analyzes (HPLC, TLC, IR) to ensure the presence of alkaloids.

The study of the antioxidant activity of the methanolic extract of the alkaloids on the DPPH to show that the value of LD50 obtained is equal to 1.37 mg / l, this is lower than that of ascorbic acid which is the reference antioxidant, and therefore the antioxidant activity of alkaloids is more important.

Key words: Optimization, extraction, alkaloids, surface modeling of responses.

LISTE DES ABRIVIATIONS

AA	acide ascorbique
°C	Degré celsius
CCM	Chromatographie sur couche mince
D	Constante d'équilibre
DL	Dose létale
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
E	Poids de l'échantillon initial
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IR	Infrarouge
J	Flux
KHz	Kilo hertz
Kp	Coefficient de partage
M_h	Masse en g de la prise d'essai avant séchage
M_s	Masse en g de la prise d'essai après séchage.
P_0	Poids du bécher vide.
P_1	Poids du bécher après évaporation du solvant
PE	Plan d'expériences
pH	Potentiel hydrogène
PR	Le pourcentage de réduction
Rf	Rapport frontal
UV	Ultraviolet
ε	La porosité
∂	Différentiel partiel
Σ	Somme

TABLE DES MATIERS

Remerciements	
Dédicaces	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction général	1

CHAPITRE I : Généralités sur la plante et les alcaloïdes

I.	Généralités sur la plante	2
I.1	Ephédra	2
I.2	Ephédra Rollandii Maire	3
I.3	Distribution	4
I.4	Usages traditionnels	5
I.5	Les alcaloïdes	5
I.5.1	Définition	5
I.5.2	Classification et structures chimiques des alcaloïdes	6
I.5.2.1	Les pseudo-alcaloïdes	6
I.5.2.2	Les proto-alcaloïdes	7
I.5.2.3	Les alcaloïdes vrais	7
I.6	Nomenclature des alcaloïdes	8
I.7	Propriétés physico-chimiques	8
I.8	L'intérêt actuel des alcaloïdes	10

CHAPITRE II : Méthode d'extraction et optimisation des paramètres d'extraction

II.1	Principe de l'extraction des alcaloïdes	11
II.2	Mécanisme de l'extraction	11
II.3	Méthodes d'Extraction des alcaloïdes	12
II.3.1	Extraction par les solvants organiques non polaires	12
II.3.2	Extraction par les solvants organiques polaires	12
II.3.3	Extraction par l'eau acide	12
II.4	Aspects théoriques sur le transfert de matière	13
II.5	Paramètres influençant l'extraction	15
II.5.1	La température	15
II.5.2	Temps d'extraction	15
II.5.3	Rapport solvant-solide	16
II.5.4	Coefficient de partage	16
II.5.5	Influence du solvant	17
II.5.6	Influence de l'agitation	17
II.5.7	Influence du pH	18
II.5.8	Taille des particules	18
II.5.9	Le pouvoir extractant	18
II.5.10	La capacité de pénétration	18
II.6	Plan d'expériences	19
II.6.1	Les avantages des plans d'expériences	19

CHAPITRE III : Matériels et méthodes

III.1	Réactifs utilisés	21
III.2	Préparation du matériel végétal	22
III.2.1	Préparation de la poudre végétale	22
III.2.2	Détermination du taux d'humidité	22
III.3	Extraction des alcaloïdes	23
III.3.1	Principe d'extraction des alcaloïdes	23
III.3.2	Extraction des alcaloïdes assistée par ultrasons	25
III.4	Détermination du taux d'extraction	25
III.5	Plan d'expériences	26
III.5.1	Choix du plan d'expériences	26
III.5.2	La matrice des expériences	26
III.5.3	exploitation des résultats	28
III.6	Caractérisation des alcaloïdes	29
III.6.1	Réactions de précipitation	29
III.6.2	Caractérisation par chromatographie	29
III.6.2.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	29
III.6.2.2	Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	30
III.7	Activité antioxydant	31
III.7.1	Évaluation qualitative de la capacité antioxydant	32

III.7.2	Calcul des pourcentages d'inhibition	32
---------	--------------------------------------	----

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.1	Détermination de la teneur en eau de la plante <i>d'éphédra Rollandii</i>	33
IV.2	Optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes dans les feuilles de la plante <i>Ephédra rollandii</i>	34
IV.2.1	Étude statistique	35
IV.2.2	Modélisation mathématique	37
IV.2.3	Effets des facteurs étudiés sur le rendement d'extraction	37
IV.2.4	Prédiction des résultats	42
IV.2.5	Matrice des optimums	43
IV.2.6	Discussions des résultats	44
IV.2.7	Extraction des alcaloïdes assistée par ultrasons	45
IV.2.8	Analyses physiques des extraits d'alcaloïdes	45
IV.2.8.1	Réactions de précipitation	45
IV.2.8.2	Chromatographie sur couche mince	46
IV.2.8.3	Analyse infrarouge (IR)	47
IV.2.8.4	Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	48
IV.2.9	L'effet antioxydant des extraits d'alcaloïdes	49
IV.2.10	Protocole d'extraction optimisé	50
	Conclusion général	51
	Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Répartition géographique de l'Ephédra dans le monde	3
Figure I.2 : La plante <i>d'éphédra rollandii maire</i> .	4
Figure I.3 : structure des pseudos-alcaloïdes.	6
Figure I.4 : structure de la mescaline.	7
Figure I.5 : structure des alcaloïdes vrais.	7
Figure II.1 : variation de flux au bout de temps	13
Figure III.1 : Séchage des feuilles <i>d'éphédra rollandii</i> .	22
Figure III.2 : Dessin représentatif des étapes d'extraction effectuée.	23
Figure III.3 : Résidu sec des alcaloïdes.	24
Figure III.4 : bain ultrason.	25
Figure III.5 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH).	32
Figure IV.1 : Le pourcentage de la teneur en eau dans feuilles de la plante <i>Éphédra rollandii</i>	33
Figure IV.2 : Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction et la validité du modèle et la reproductibilité.	36
Figure IV.3 : comparaison entre les données expérimentales et le modèle prédiction de rendement.	37
Figure IV.4 : effets des facteurs et leurs interactions sur le rendement.	38
Figure IV.5 : évaluation du rendement en fonction de temps et de température pour des valeurs fixes de concentration [1.5] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5].	38

Figure IV.6 : évaluation du rendement en fonction de concentration et de température pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5]. 39

Figure IV.7 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de température pour des valeurs fixes de temps [3] et concentration [1.5] et coefficient de partage [1.5]. 39

Figure IV.8 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de la température pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5]. 40

Figure IV.9 : évaluation du rendement en fonction de temps et de concentration pour des valeurs fixes de température [60] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5]. 40

Figure IV.10 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de temps pour des valeurs fixes de température [30] et concentration [1.5] et coefficient de partage [1.5]. 41

Figure IV.11 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de temps pour des valeurs fixes de température [30] et concentration [1.5] et ratio [1.5]. 41

Figure IV.12 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de concentration pour des valeurs fixes de temps [3] et température [30] et coefficient de partage [1.5]. 42

Figure IV.13 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de concentration pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [1.5] et température [30]. 43

Figure IV.14 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de ratio pour des valeurs fixes de temps [3] et concentration [1.5] et température [30]. 44

Figure IV.15 : comparaison entre la méthode d'extraction par l'eau acide et 45

l'extraction assistée par ultrasons (essai N°17).	46
Figure IV.16 : Les précipités obtenus après l'ajout des réactifs de Mayer et Bouchardat	46
Figure IV.17 : Chromatogramme observé.	47
Figure IV.18 : Spectre IR caractéristique des extraits d'alcaloïdes de la plante <i>Ephédra rollandii</i>	48
Figure IV.19 : Chromatogramme en HPLC des alcaloïdes extraits de la plante <i>Ephédra rollandii</i>	49
Figure IV.20 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : La solubilité des alcaloïdes dans les solvants organiques.	9
Tableau III.1 : Réactifs utilisés dans ce travail.	21
Tableau III.2 : plan de la matrice expérimentale	26
Tableau III.3 : Matrice d'expérience.	27
Tableau IV.1 : matrice des essais de plan d'expériences	34
Tableau IV.2 : Matrice des optimums	42

Introduction générale

Historiquement, l'extraction solide-liquide est une opération très ancienne. L'homme a toujours cherché à exploiter les ressources naturelles dont il dispose. Cette opération était utilisée dans la préparation de produits alimentaires, pharmaceutiques, drogues, teintures ou parfums où elle prend des dénominations différentes. De la percolation à l'infusion en passant par la macération ou la concoction, chaque terme évoque une mise en œuvre domestique d'un procédé d'extraction solide-liquide. [1]

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. De ce fait, le modélisateur est contraint de considérer plusieurs hypothèses simplificatrices. [2]

Ce procédé étant basé sur des phénomènes de transfert de matière, sa mise en œuvre nécessite la résolution des problèmes délicats tels que la modélisation et la détermination de certains paramètres souvent inexistant dans les banques de donnée thermodynamiques.

Le présent travail consiste à optimiser et améliorer la technique d'extraction solide-liquide en milieu acide des alcaloïdes à partir de l'espèce végétale *Ephédra rollandii* Maire, originaire de la région de Oued Souf, en utilisant les plans d'expériences .

Le présent mémoire a été structuré en trois parties : la première partie est consacrée à l'étude bibliographique portant sur la matière végétale étudiée, des généralités sur les alcaloïdes et sur les différents paramètres qui influent sur la technique d'extraction solides –liquide.

Dans la seconde partie, on décrit on détails les modes opératoires et le matériel utilisés lors de l'extraction des alcaloïdes, ainsi que le plan d'expérience établis qui permet d'optimiser les différents paramètres d'extraction.

La troisième et dernière partie est réservée aux résultats expérimentaux obtenus ainsi que leurs interprétations, qui donnent lieu à une conclusion générale et à des recommandations en futures.

Introduction

Dans ce premier chapitre on parle sur la plante utilisé dans ce travail (*Ephédra Rollandii Maire*) et son usages traditionnels. Ainsi qu'un rappel sur les alcaloïdes, ses trois types (Les pseudo-alcaloïdes, Les proto-alcaloïdes, les alcaloïdes vrais) et leurs Propriétés physico-chimiques.

I. Généralités sur la plante

I.1 Ephédra

L'éphédra, connue sous le nom de "Ma-huang", est une des plantes médicinales les plus anciennes au monde. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise. L'Ephédra, appartient à la famille des Ephédraceae, contient plus de 50 espèces.

Les parties aériennes de Ephédra ont longtemps été utilisées comme diaphorétiques, anti-asthmatiques ainsi que pour le traitement de la bronchite et de l'œdème néphritique aigu.

Les composants actifs principaux sont trois paires d'alcaloïdes di-astéroisomériques optiquement actifs : l'éphédrine et pseudoéphédrine, méthylephédrine et méthyle pseudoéphédrine et noréphédrine pseudo noréphédrine.

De plus, les origines géographiques variées des plantes rendent la teneur totale en principaux alcaloïdes actifs très différente d'une plante à l'autre. [3]

L'éphédra est un petit arbuste presque toujours dioïques, très ramifiés, aux tiges minces articulées, vivaces rameaux, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètres de haut, verts jaunâtres, résistant à la sécheresse, à feuilles persistantes, à la valeur médicinale convaincante. [4]

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes. [5]

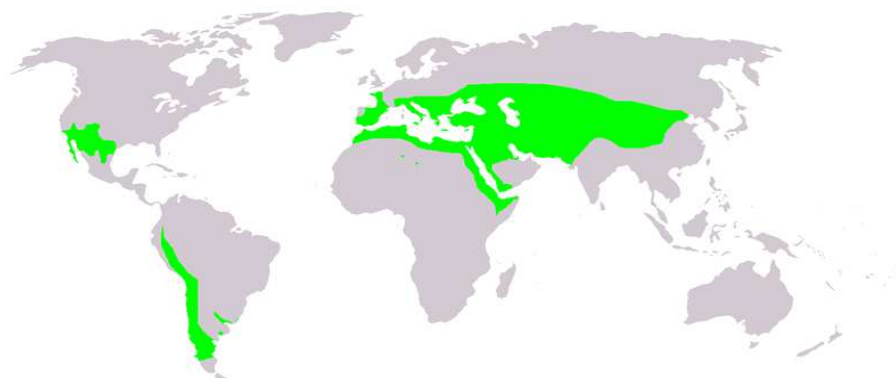


Figure I.1 : Répartition géographique de l'Ephédra dans le monde [6]

Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde : certes, elles peuvent parfois contenir un composé très majoritaire (comme l'hyoscyamine de la feuille de belladone), mais, le plus souvent, elles livrent un mélange complexe. Il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même plante. En règle générale tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine biogénétique commune même si leurs structures peuvent paraître assez différentes. [7]

I.2 Ephédra Rollandii Maire

Il s'agit de l'un des rares arbustes dioïque des zones sahariennes, hauteur de 0.5 à 1.5 m. *E. rollandii* Maire décrit du Sahara occidental mauritanien, sur du matériel immature [8], rameux, diffus ou prostré, non grimpant, rameaux rigides, cannelés-striés, vert grisâtre, glauque, se désarticulant à la dessiccation, courte, fine et hyaline. *E. rollandii* a été assimilé à *E. foliata* Mey. Décrit antérieurement. *E. foliata* est un élément de la flore désertique orientale. [9]



Figure I.2 : La plante d'*éphédra rollandii* maire.

I.3 Distribution

Le genre est originaire des régions tempérées et latitudes subtropicales de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique, et pousse surtout dans le nord et l'ouest de la Chine, Inde du Nord et Espagne. Aux États-Unis, l'éphédra les plantes poussent le long des montagnes Rocheuses [10]. *Ephédra foliata* : originaire d'Afrique du Nord et en Asie du Sud-Ouest, il est distribué en Asie (Afghanistan, Inde, Pendjab, Iran, Irak, Jordanie, Palestine, Koweït, Qatar, Bahreïn, Arabie Saoudite, Émirats arabes unis, Oman et Yémen) et dans Afrique (Tchad, Algérie, Egypte, Mauritanie, Maroc, Somalie, Djibouti et Ethiopie) [11-12].

Distribution générale : Nord et Est de l'Afrique, Sahara, Arabie, Asie occidentale jusqu'en Inde ;

Collection : herbier de l'Afrique du nord ;

Famille : Ephédraceae ;

Genre : Ephédra ;

Espèce : Ephédra rollandii ;

Nom : Ephédra rollandii Maire ;

Pays d'origine : Sahara Occidental ;

Localité : Aïn-Chegga, dans l'oued- Algérie.

I.4 Usages traditionnels

Le dispensatoire chinois écrit en 1569 mentionne que Les espèces d'éphédra étaient utiles comme antipyrétique, diaphorétique, stimulant circulatoire et sédatif pour la toux.

Cependant, l'éphédra a été utilisé dans la médecine chinoise pour traiter les allergies, l'asthme, les poumons congestion, frissons, rhumes, rhume des foins, toux, œdème, fièvre, grippe, maux de tête et congestion nasale. La plante était également traditionnellement utilisée en Russie pour le traitement respiratoire troubles et rhumatismes pendant de nombreux siècles. Le Amérindiens et Espagnols du sud-ouest États-Unis ont utilisé l'éphédra pour divers médicaments fins, en particulier les maladies vénériennes [13-14].

Un principe actif a été isolé pour la première fois par Yamanashi en 1885. En 1887, il obtient l'alcaloïde sous forme pure et la nommé éphédrine. Investigation pharmacologique indiqué que le médicament était toxique, mydriatique et sympathomimétique [15].

I.5 Les alcaloïdes

I.5.1 Définition

Plusieurs définitions du terme alcaloïde ont pu être données depuis son apparition en 1819, où W. Meissner a défini les alcaloïdes comme étant des substances dérivées de plantes qui réagissent comme des alcalis. Cette définition est aujourd'hui très réductrice car les alcaloïdes ne sont pas isolés simplement des plantes mais également des champignons et du règne animal [16].

Au 20^{ème} siècle, des tournures différentes sont utilisées, la plus récente étant celle de S. W. Pelletier en 1983 : un alcaloïde est un composé organique cyclique contenant un atome d'azote dans un degré d'oxydation négatif [17].

Dans son livre, M.Hesse définit les alcaloïdes comme étant des substances organiques d'origine naturelle contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort [18].

I.5.2 Classification et structures chimiques des alcaloïdes

A ce jour, plus de 15 000 alcaloïdes différents ont été isolés. La définition des alcaloïdes étant déjà difficile, la classification de ceux-ci n'est pas plus simple.

La classification des alcaloïdes tient compte de deux paramètres distincts : la position de l'atome d'azote au sein de la structure et les différentes fonctions qui en découlent, et la famille de plantes dont ils sont extraits (90% des alcaloïdes sont issus de plantes). On distingue trois types d'alcaloïdes :

I.5.2.1 Les pseudo-alcaloïdes

Ne possèdent pas d'azote intra cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale : exemple la cocaïne.

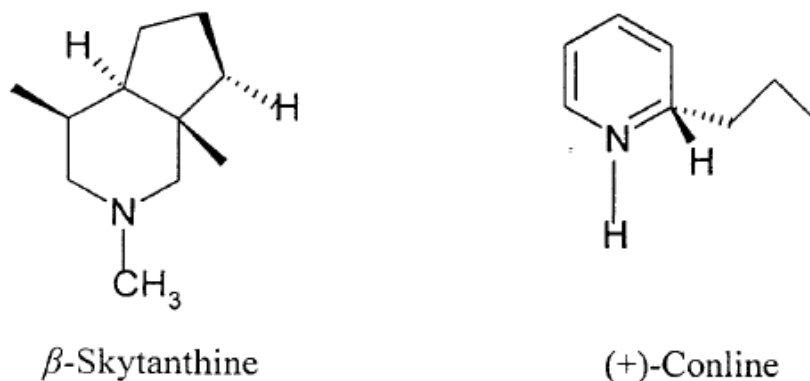


Figure I.3 : structure des pseudos-alcaloïdes.

I.5.2.2 Les proto-alcaloïdes

L'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés, exemples : mescaline, hordéine, éphédrine, colchicine.

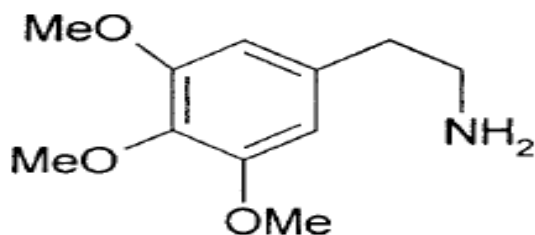


Figure I.4 : structure de la mescaline.

I.5.2.3 Les alcaloïdes vrais

On les classe suivant la nature de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle ; Bio synthétiquement formés à partir d'acides aminés ; possèdent une activité pharmacologique marquée [19].

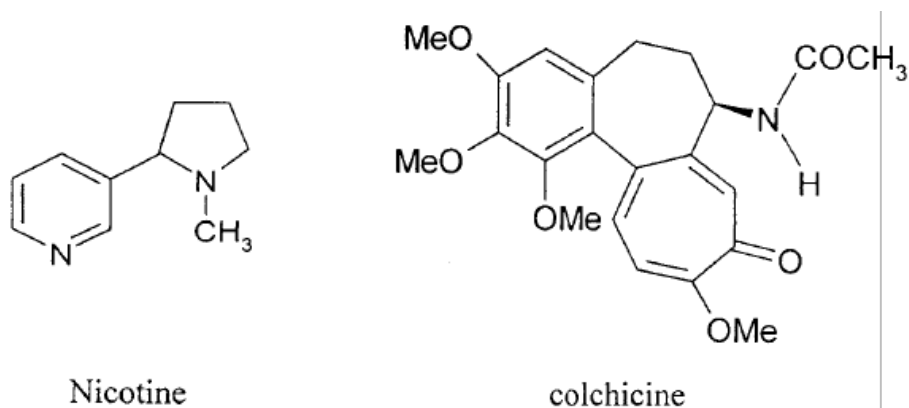


Figure I.5 : structure des alcaloïdes vrais.

I.6 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 spégazine 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.7 Propriétés physico-chimiques

- Les alcaloïdes sont des corps de masses moléculaires faibles et de fonction basique [21]. Cette dernière est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène [22].
- Les alcaloïdes non oxygénés (nicotine), sont des liquides huileux volatils, fréquemment odorants, par contre les alcaloïdes oxygénés sont en général solides, cristallisés, inodores et de saveur amère.
- Ils peuvent être fixés sur certains agents adsorbants tels que les charbons actifs ou les argiles du type bentonite [23].
- Ils se combinent avec les acides et forment des sels, généralement solubles dans l'eau [24].
- La solubilité des alcaloïdes dans les solvants organiques tels que: l'alcool, l'éther, le benzène et le chloroforme est en général élevée par rapport à la solubilité dans l'eau, puisque la plupart de ces substances sont insolubles ou peu solubles dans l'eau [19].

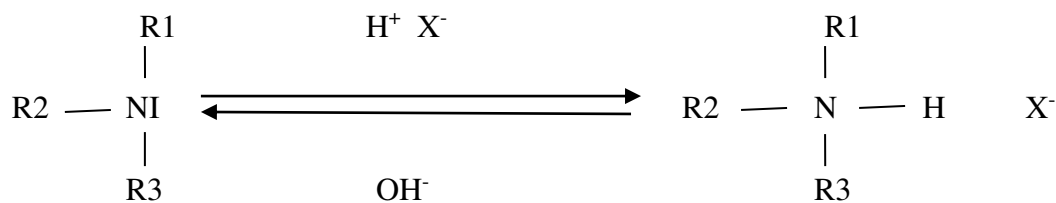


Tableau I.1 : La solubilité des alcaloïdes dans les solvants organiques.

PHASE FORME	Eau	Solvants organiques polaires (méthanol, éthanol)	Solvants organiques apolaires (hexane, chloroforme...)
Base	Insoluble	Soluble	Soluble
Sel	Soluble	Soluble	Insoluble

- Les procédés d'extraction des alcaloïdes sont basés sur la solubilité différentielle dans divers solvants [25].
- Les alcaloïdes précipitent avec certains réactifs spécifiques appelés « réactifs des alcaloïdes ». Les plus importants sont les réactifs iodés tels que :
 - 1)- Solution neutre de mercuriodure de potassium ou réactif de Mayer (précipité blanc jaunâtre).
 - 2)-Solution acide d'iodobismuthate de potassium ou réactif de Dragendorff (précipité rouge orangé).
 - 3)-Solution d'iodure de potassium iodé ou réactif de Bouchardat (précipité brun) [26].

I.8 L'intérêt actuel des alcaloïdes

Du fait de leurs rôles physiologiques ou de leurs activités biologiques spécifiques, les molécules alcaloïdes restent des importants réactifs biologiques. Elles présentent un intérêt toujours actuel en thérapeutique. Si la recherche des principes actifs continue activement en ce qui concerne les plantes médicinales et/ou toxiques.

La nicotine est un insecticide végétal naturel. Ses effets sont multipliés si le composé toxique est ajouté à une émulsion d'huile végétale, dite huile blanche. L'ensemble est assez vite biodégradable. La ryanodine a été employée comme insecticide végétal. [27]

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.
- Spasmolytiques : tubocurarine et papaverine.
- Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine.
- Emétiques : émétine.
- Antitussifs : codéine.
- Antiarythmiques : quinidine et ajmaline.
- Antipaludiques : quinine.
- anti-tumeur, sympathomimétique : éphédrine. [28]
- Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine.

Introduction

Ce chapitre décrit brièvement le principe et le mécanisme d'extraction des alcaloïdes. Il décrit d'un point de vue génie chimique l'aspect théorique sur le transfert de matière et les trois méthodes générales d'extraction (Extraction par les solvants organiques non polaires, extraction par les solvants organiques polaires, extraction par l'eau acide). Ainsi que les différents paramètres influençant l'extraction. Ainsi qu'un rappel sur les plans d'expériences et leurs avantages.

II.1 Principe de l'extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques à caractère basique, existent dans les plantes à l'état de combinaisons salines, le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques, donc leur extraction à partir de la matière végétale est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin. [29]

- ❖ 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. [30]

II.2 Mécanisme de l'extraction

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.

II.3 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

Il existe trois types généraux d'extraction :

- Extraction par les solvants organiques non polaires.
- Extraction par les solvants organiques polaires.
- Extraction par l'eau acide. [31]

II.3.1 Extraction par les solvants organiques non polaires

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. [31]

II.3.2 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. [31]

II.3.3 Extraction par l'eau acide

La poudre végétale pulvérisée est épuisée par l'eau acide. On obtient alors une solution aqueuse acide de sel d'alcaloïdes. Un agent alcalin est alors ajouté, on obtient ainsi un précipité d'alcaloïdes basique qu'on peut extraire par un solvant organique apolaire, après un lavage par de l'eau distillée et séchage par un agent déshydratant. [31]

II.4 Aspects théoriques sur le transfert de matière

Le transfert de matière désigne le passage de toute espèce moléculaire d'une phase à une autre tendant à amener le système à l'équilibre thermodynamique. Si, par conséquent, un constituant prend naissance ou disparaît localement dans le mélange, il se produira un transfert de ce constituant de la partie la plus concentrée vers la partie la moins concentrée [32].

Lors de l'extraction solide liquide, les particules solides constituent la phase interne, alors que le liquide est considéré comme phase externe, la matière est alors le siège de deux types de transfert :

- transfert externe : en régime permanent, le soluté est entouré d'une couche laminaire immobile, plus ou moins épaisse qu'il doit franchir pour accéder à la surface externe du solide. Ce film laminaire ou film limite oppose donc une résistance au passage des molécules et provoque une diminution de concentration, qui est la force motrice de la diffusion. Si la phase fluide est agitée, le transfert de matière a lieu par transport.
- transfert interne : il s'effectue de l'interface au centre géométrique du solide (ou en sens inverse). Il obéit alors à la loi de Fick. [33]

Le concept de vitesse de diffusion à l'intérieur d'une matrice solide est difficile à étudier. Dans les situations pratiques, on a des conditions non stationnaires, avec une concentration du soluté qui varie selon le temps et la position dans la particule. Cette diffusion est généralement décrite par la seconde loi de Fick :

Considérons un volume de matière compris entre x et $x+dx$, comme indiqué ci-dessous, et exprimons la conservation de l'espèce diffusante pendant un temps dt .

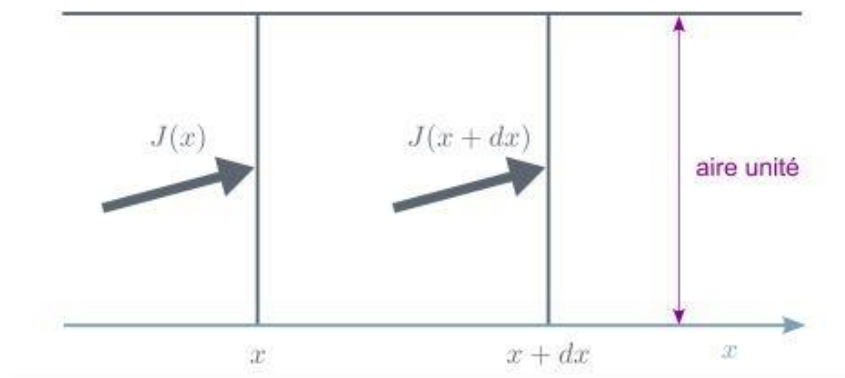


Figure II.1 : variation de flux au bout de temps

La somme algébrique des flux entrant est égale à la variation de la concentration de l'espèce diffusante dans le volume considéré :

$$[J(x) - J(x+dx)] \cdot dt = \frac{\partial c}{\partial t} \cdot dt \cdot dx \quad (1)$$

$$- \frac{\partial J}{\partial x} \cdot dx \cdot dt = \frac{\partial c}{\partial t} \cdot dt \cdot dx \quad (2)$$

$$- \frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (3)$$

Cette équation est valide pour la diffusion d'un soluté dans un corps poreux rigide sous la condition que la structure soit considérée comme quasi homogène et macroscopiquement isotrope.

Dans le cas de la matière végétale, le coefficient de diffusion moléculaire doit être un coefficient de diffusion apparent qui tient compte de la porosité et de la tortuosité de la matrice solide [34].

La matière végétale a une microstructure complexe formée de cellules, d'espaces intercellulaires, de capillaires et de pores. Sa description par les outils classiques du génie chimique n'est pas toujours aisée. On peut toutefois tenter de définir et de mesurer les caractéristiques suivantes :

- la porosité,
- la tortuosité,
- la taille et la forme des particules,
- la surface spécifique d'échange. [1]

La porosité \mathcal{E} de la matière végétale est généralement élevée. En outre, la taille des pores n'est pas uniforme compte tenu de la complexité de la structure végétale. Elle comprend des cavités de tailles variables, d'autres éléments constitués de contours solides et un intérieur liquide ou entièrement vide. La tortuosité τ est donc très variable. De plus, elle est difficilement accessible à la mesure contrairement à la porosité.

II.5 Paramètres influençant l'extraction

II.5.1 La température

L'élévation de la température augmente la solubilité et la diffusivité de la solution et réduit sa viscosité. Mais elle augmente aussi la perméabilité des parois cellulaires et donc diminue la sélectivité. La température opératoire est limitée par les risques de dégradation thermique des produits et par la sécurité de l'installation en présence de solvants. 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. [35]

II.5.2 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. [36]

II.5.3 Rapport solvant-solide

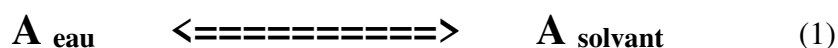
Le rapport solvant-solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est grand, la quantité totale de composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide importants, l'utilisation 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. [37]

II.5.4 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. [38]

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 [39].

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

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.5.5 Influence du solvant

Les solvants souvent utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO₂ supercritique. 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 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 [40].

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 [41]

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [42] :

- 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.

II.5.6 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. [43]. Elle a un effet toujours favorable sur l'opération de transfert, 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. [44.45]

II.5.7 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 [46]. 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 [47]. 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.5.8 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 [49].

II.5.9 Le pouvoir extractant

L'estimation de l'efficacité d'un solvant ne peut être réduite aux seules propriétés chimiques de polarité et d'affinité vis à vis de l'eau. Nous devons également tenir compte des propriétés physiques déterminant la capacité du solvant à pénétrer dans une matrice poreuse, nous parlons alors du pouvoir extractant qui est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale de telle sorte qu'il rencontre et entraîne les molécules cibles.

II.5.10 La capacité de pénétration

Plus la tension superficielle d'un liquide dans lequel on immerge un solide poreux tel qu'un substrat végétal est faible, mieux est assuré le mouillage des pores, et ce, d'autant plus que ces pores sont de petite dimension ; c'est ainsi qu'est assurée une efficacité dans la pénétration du liquide, notamment dans le cas d'une matière à organisation cellulaire. Plus la viscosité est faible, mieux le liquide s'écoule dans les pores et mieux il circule dans les espaces intercellulaires. [50]

II.6 Plan d'expériences

Les études réalisées sur l'extraction suivaient souvent la méthode conventionnelle d'expérimentation où l'un des facteurs est varié à la fois et les autres restent constants, alors que les plans d'expériences permettent de varier les différents paramètres simultanément.

II.6.1 Les avantages des plans d'expériences

- Obtention du maximum d'informations avec une consommation minimale de temps et de ressources.
- Facilité d'optimisation.
- Evaluation des interactions entre les différents facteurs.
- Offre de l'information plus précise et plus complète avec le même nombre d'essais que la méthode conventionnelle.
- Evaluation des effets des facteurs sur les réponses.

Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés.

En résumé, les avantages les plus connus des PE sont : [51]

- L'efficacité.
- L'exactitude.
- L'évaluation des interactions.

II.7 Méthodes d'extraction des Alcaloïdes par les ultrasons

- **Principe :**

Le procédé d'extraction par ultrasons est basé sur le principe de la cavitation. La propagation d'une onde ultrasonore dans le milieu donne lieu à des régions de compression et de dépression, à cause des oscillations mécaniques des éléments de matière. Les micro-jets produits par ce phénomène aident à détruire les parois de la matrice végétale. Cette dernière facilite la pénétration du solvant dans les cellules et permet le contact entre le solvant et les substances emprisonnées dans la matière végétale. [52]

Il existe deux conceptions générales des extracteurs assistés par ultrason : les bains ultrasoniques ou les extracteurs fermés équipés d'un capteur ultrasonique. Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires et améliorent le transfert de masse. Les ultrasons dans l'extraction peuvent également perturber les parois cellulaires, facilitant la libération de leur contenu. Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique. [53]

Introduction

Ce chapitre décrit le procédé adopté pour l'extraction des alcaloïdes en présentant en premier lieu les réactifs et la matière végétale utilisée. Il décrit d'un point de vue physico-chimique les différentes techniques de caractérisation qualitative et quantitative des alcaloïdes, et d'un point de vue microbiologique l'activité antioxydant des alcaloïdes extraits.

III.1 Réactifs utilisés

Tableau III.1 : Réactifs utilisés dans ce travail.

Nom usuel	Formule brute	Rôle	La firme
Hexane	C ₆ H ₁₄	Délipidation	BIOCHEM Chemopharma
Méthanol	CH ₃ OH	Conservation des alcaloïdes	WWR Chemicals
Acide chlorhydrique	HCl	Préparation de la phase aqueuse	BIOCHEM Chemopharma
Chloroforme	CHCl ₃	Extraction liquide liquide	BIOCHEM Chemopharma
Hydroxyde d'ammonium	NH ₄ OH	Ajustement de pH	BIOCHEM Chemopharma
sulfate de sodium anhydre	Na ₂ SO ₄	Sécher La phase organique	Panreac

III.2 Préparation du matériel végétal

La matière végétale utilisée est *Ephédra rollandii maire*. Elle a été récoltée dans la région d'Oued Souf. Les feuilles de cette plante ont été séchées à l'ombre et à température ambiante dans un endroit aéré pendant 30 jours.

Voir ci-dessous la figure qui montre les feuilles sèches de cette plante



Figure III. 1 : Séchage des feuilles *d'éphédra rollandii*.

III.2.1 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 conservées à l'abri de la lumière dans des boites 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.

III.2.2 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. [54]

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

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{(M_h - M_s)}{M_s} \times 100$$

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.3 Extraction des alcaloïdes

III.3.1 Principe d'extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques à caractère basique qui existent habituellement dans les plantes à l'état de combinaisons salines et dont l'extraction est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin. Les alcaloïdes, à pH basique, sont sous forme de bases insolubles ou peu solubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires.

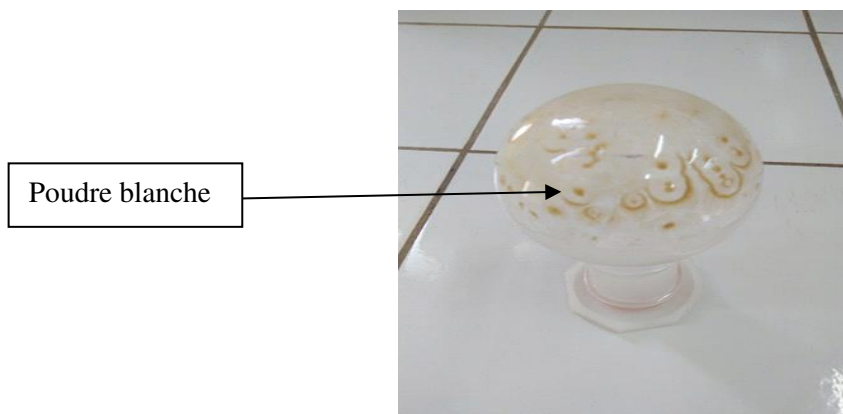
En milieu acide, les alcaloïdes sont à l'état de sels fortement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont par contre insolubles dans les solvants organiques apolaires.

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 : FigureIII.2



FigureIII.2 : Dessin représentatif des étapes d'extraction effectuée.

- 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 sont différents.
- Après un temps précis d'agitation une filtration est réalisée, le filtrat récupéré est alcalinisé jusqu'au pH=10 avec quelques gouttes d'hydroxyde d'ammonium concentré. [55]
- Une extraction (liquide/liquide) des alcaloïdes est réalisée par l'ajout du chloroforme dans une ampoule à décanter jusqu'à épuisement total des alcaloïdes dans la phase aqueuse. [56]
- En lave la phase organique récupérer par de l'eau distillée. Ce lavage est réalisé en trois fois pour éliminer toute sorte d'impuretés.
- La phase organique est alors séchée par l'ajout de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis évaporée à sec à l'évaporateur rotatif.
- Après refroidissement, nous récupérons une poudre blanchâtre d'alcaloïdes (Figure III.3).
- Le résidu sec obtenu est pesé et récupéré par le méthanol puis conservé au réfrigérateur dans des flacons bruns.



FigureIII.3 : Résidu sec des alcaloïdes.

III.3.2 Extraction des alcaloïdes assistée par ultrasons

Les conditions optimales obtenue lors des essais d'extraction par l'eau acidifiée sont prises et reproduites par extraction assistée par ultrason dans un bain ultrason (Figure III.4) pour faire une comparaison entre les deux méthodes. L'essai a été réalisé avec une fréquence de 35 KHz et une température de 25°C pendant 15min. Une fois filtrée, la solution subit les mêmes étapes d'extraction avec l'eau acidifié jusqu'à l'obtention de l'extrait d'alcaloïdes.



Figure III.4 : bain ultrason.

III.4 Détermination du taux d'extraction

Les extraits récupérés après l'évaporation à sec sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant ; 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).

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \frac{(P_1 - P_0)}{E} \times 100$$

D'où :

P₀ : poids du bécher vide (g).

P₁ : poids du bécher après évaporation du solvant (g).

E : poids de l'échantillon initial (g).

III.5 Plan d'expériences

III.5.1 Choix du plan d'expériences

Afin d'étudier notre procédé d'extraction nous avons utilisés un plan factoriel complet à deux niveaux, cinq facteurs et trois points au centre.

Les facteurs étudiés sont :

- Temps d'extraction (X_1)
- Température (X_2)
- Concentration d'HCl (X_3)
- Rapport sol/liq (X_4)
- Coefficient de partage (X_5)

Les niveaux hauts (+1) et bas (-1) pour chaque facteur sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau III.2 : plan de la matrice expérimentale

Facteurs	Codes	Niveaux hauts (+1)	Niveaux bas (-1)
Temps d'extraction(h)	X_1	4	2
Température °C	X_2	90	30
Concentration d'HCl mol/l	X_3	0.2	0.1
Rapport sol/liq	X_4	20 :1	10 :1
Coefficient de partage	X_5	2	1

III.5.2 La matrice des expériences

Le nombre d'expériences pour la présente étude est déterminé par l'équation suivante :

$$N = l^p + c$$

Sachant que :

N : le nombre d'expériences.

L : le nombre de niveaux.

P : nombre de facteurs.

C : nombre de points au centre.

Donc pour notre cas le nombre d'expériences que nous devons réaliser pour étudier le procédé d'extraction est de 35 expériences.

Les essais et les différents paramètres d'extractions sont alors rapportés dans le tableau III.3

Tableau III.3 : Matrice d'expérience.

N°	Temps (h)		Température (°C)		Concentration de HCL		Ratio		Coefficient de partage	
	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur
1	-1	2	-1	30	-1	0.1	-1	10 :1	-1	1
2	+1	4	-1	30	-1	0.1	-1	10 :1	-1	1
3	-1	2	+1	90	-1	0.1	-1	10 :1	-1	1
4	+1	4	+1	90	-1	0.1	-1	10 :1	-1	1
5	-1	2	-1	30	+1	0.2	-1	10 :1	-1	1
6	+1	4	-1	30	+1	0.2	-1	10 :1	-1	1
7	-1	2	+1	90	+1	0.2	-1	10 :1	-1	1
8	+1	4	+1	90	+1	0.2	-1	10 :1	-1	1
9	-1	2	-1	30	-1	0.1	+1	20 :1	-1	1
10	+1	4	-1	30	-1	0.1	+1	20 :1	-1	1
11	-1	2	+1	90	-1	0.1	+1	20 :1	-1	1
12	+1	4	+1	90	-1	0.1	+1	20 :1	-1	1
13	-1	2	-1	30	+1	0.2	+1	20 :1	-1	1
14	+1	4	-1	30	+1	0.2	+1	20 :1	-1	2
15	-1	2	+1	90	+1	0.2	+1	20 :1	-1	2
16	+1	4	+1	90	+1	0.2	+1	20 :1	-1	2
17	-1	2	-1	30	-1	0.1	-1	10 :1	+1	2
18	+1	4	-1	30	-1	0.1	-1	10 :1	+1	2

19	-1	2	+1	90	-1	0.1	-1	10 :1	+1	2
20	+1	4	+1	90	-1	0.1	-1	10 :1	+1	2
21	-1	2	-1	30	+1	0.2	-1	10 :1	+1	2
22	+1	4	-1	30	+1	0.2	-1	10 :1	+1	2
23	-1	2	+1	90	+1	0.2	-1	10 :1	+1	2
24	+1	4	+1	90	+1	0.2	-1	10 :1	+1	2
25	-1	2	-1	30	-1	0.1	+1	20 :1	+1	2
26	+1	4	-1	30	-1	0.1	+1	20 :1	+1	2
27	-1	2	+1	90	-1	0.1	+1	20 :1	+1	2
28	+1	4	+1	90	-1	0.1	+1	20 :1	+1	2
29	-1	2	-1	30	+1	0.2	+1	20 :1	+1	2
30	+1	4	-1	30	+1	0.2	+1	20 :1	+1	2
31	-1	2	+1	90	+1	0.2	+1	20 :1	+1	2
32	+1	4	+1	90	+1	0.2	+1	20 :1	+1	2
33	0	3	0	60	0	0.15	0	15 :1	0	1.5
34	0	3	0	60	0	0.15	0	15 :1	0	1.5
35	0	3	0	60	0	0.15	0	15 :1	0	1.5

III.5.3 exploitation des résultats

Les valeurs obtenus 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.

L'équation générale du modèle mathématique d'un plan factoriel complet est donnée par l'équation polynomiale :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Où : « Y » est la réponse, « β_0 » est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, « β_i » est l'effet du facteur i, « β_{ij} » est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j, « x_i » est le niveau attribué au facteur i.

III.6 Caractérisation des alcaloïdes

III.6.1 Réactions de précipitation

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 : [57]

- **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.

III.6.2 Caractérisation par chromatographie

III.6.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie en couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après avoir déposé l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Généralement, en chromatographie en couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

- **Mode opératoire**
 - Un échantillon des sels d'alcaloïdes récupérés dans la solution aqueuse acidifiée après extraction
 - Le témoin utilisé est chlorhydrate du pseudo éphédrine obtenue à partir du médicament RHUMAFED.
 - Pour la séparation nous avons utilisé des plaques de gel de silice déposé sur la cellulose (plaque POLYGRAM gel 300 5x20 cm).

- **Choix de la phase mobile**

Parmi plusieurs systèmes de solvants cités en bibliographie [58] nous avons choisi le système suivant :

Nous avons utilisés la phase mobile suivante :

Méthanol / chloroforme / Ammoniaque (80/20/45) (V/V/V)

Chaque substance qui migre est caractérisée par son rapport frontal ou facteur de retardement (R_f), ou encore facteur de rétention dont la valeur est comprise entre 0 et 1.

$$R_f = d / D$$

d : Distance parcourue par la substance ;

D : Distance parcourue par le solvant ;

III.6.2.2 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. [59]

- **Phase mobile**

Le solvant d'élution 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. [59]

• 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. [59]

III.7 Activité antioxydant

Les antioxydants sont substance en faible concentration par rapport au substrat sont susceptible d'être oxydé. Elles préviennent ou ralentit l'oxydation de ce substrat. Ce sont des molécules qui fixent les radicaux libres, protègent les protéines et diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques.

III.7.1 Évaluation qualitative de la capacité antioxydant

Les méthodes qualitatives sont utilisées pour repérer, mais surtout pour dépister l'activité antioxydant des composés. Ces méthodes sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant. De multiples études antérieures ont ciblé l'activité antioxydant de différentes espèces de *Ephédra*, alors qu'aucune étude n'a évalué le potentiel antioxydant des extraits de *Ephédra rollandii*.

• Le principe

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydant. Le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux du DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

• Mode opératoire

- A 3 ml de la solution du DPPH (0.004%) préparée dans du méthanol, on ajoute 0,1 ml de chaque extrait à différente concentration (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml).
- Pour le contrôle négatif, on mélangeant 0,1ml du méthanol avec 3 ml de DPPH.
- Le blanc de l'appareil est le méthanol.
- incubation 30 minutes à température ambiante.

- La lecture se fait à 517 nm, comparée au standard qui contient l'acide ascorbique à différentes concentrations : 0,01 : 0,02 : 0,04 : 0,06 : 0,08 : 0,1 : 0,12 : 0,14 : 0,16 : 0,18 : 0,2 mg/ml. [60]

III.7.2 Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage de réduction du DPPH est donné par la formule suivante :

$$A\% = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100$$

D'où :

- $A\%$: pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.
- A_0 : densité optique du DPPH seul.
- A_s : densité optique de DPPH contenant l'échantillon à analyser.

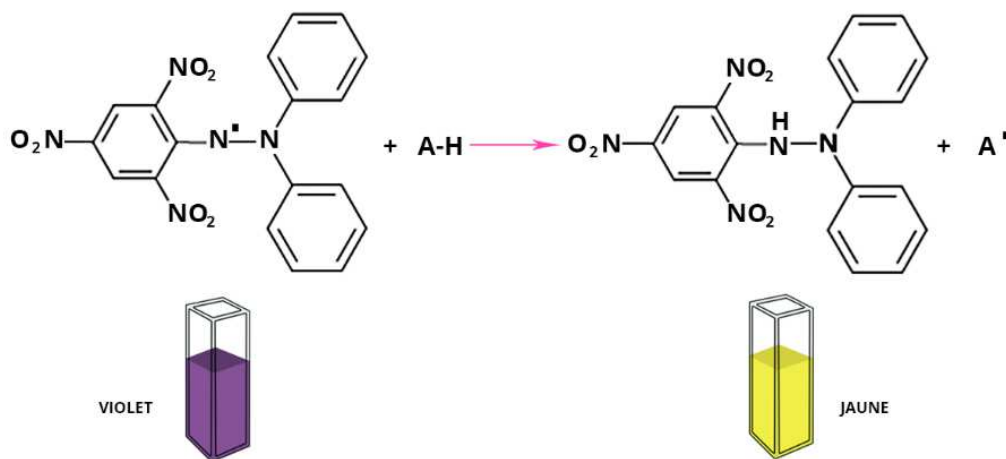


Figure III.5 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH).

Introduction

Dans ce chapitre nous allons présenter les différents résultats auxquels cette présente étude a pu aboutir.

Les principaux résultats s'articulent autour de :

- ✓ Optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes dans les feuilles de la plante *Ephédra rollandii*.
- ✓ Caractérisation avec des analyses physico-chimique des extraits d'alcaloïdes.
- ✓ L'effet antioxydant des extraits d'alcaloïdes.

IV.1 Détermination de la teneur en eau de la plante *d'éphédra rollandii*

Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminé le taux d'humidité de notre plante *Ephédra rollandii*. 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 9.46%. Figure IV.1

Dans les organes végétaux, la teneur en eau est généralement très supérieure à 1% et dépasse souvent les 10%. [61]

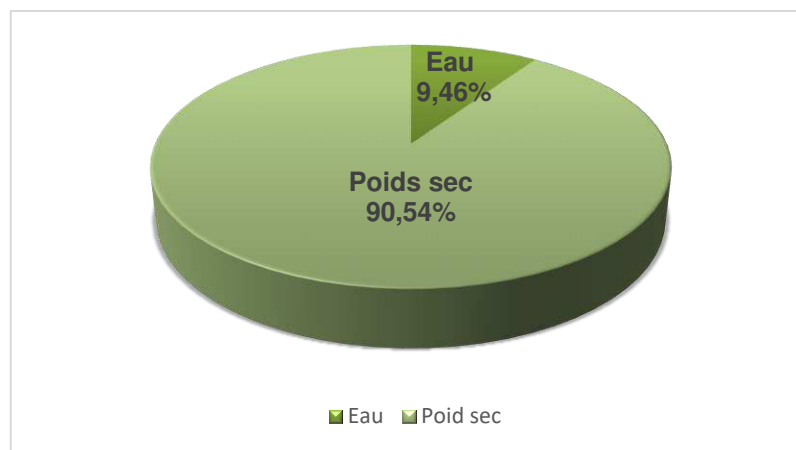


Figure IV.1 : Le pourcentage de la teneur en eau dans feuilles de la plante *Éphédra rollandii*.

IV.2 Optimisation des paramètres d'extraction des alcaloïdes dans les feuilles de la plante *Ephédra rollandii*

Dans cette partie, on a choisi d'extraire les alcaloïdes de la poudre végétale de notre plante par macération dans l'eau acidifiée sous agitation, en variant la concentration de la solution d'acide, en variant la température et le temps d'extraction, et aussi en faisant varier le rapport de masse (poudre végétale/solution acides: Ratio), ainsi que le coefficient de partage lors de l'extraction des alcaloïdes dans la phase organique. Pour ce là une matrice des essais de plan d'expériences est établie.

Les rendements et les différents paramètres d'extractions sont alors rapportés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : matrice des essais de plan d'expériences

N°	Temps (h)	Température (°C)	Concentration de HCl (mol/l)	Ratio	Coefficient de partage	Rendement (%)
1	2	30	0,1	10 :1	1	5,4
2	4	30	0,1	10 :1	1	4,33
3	2	90	0,1	10 :1	1	6,91
4	4	90	0,1	10 :1	1	7,22
5	2	30	0,2	10 :1	1	6,25
6	4	30	0,2	10 :1	1	4,4
7	2	90	0,2	10 :1	1	5,4
8	4	90	0,2	10 :1	1	4,8
9	2	30	0,1	20 :1	1	6,97
10	4	30	0,1	20 :1	1	5,53
11	2	90	0,1	20 :1	1	5,5
12	4	90	0,1	20 :1	1	3,97
13	2	30	0,2	20 :1	1	5,96
14	4	30	0,2	20 :1	1	6,05
15	2	90	0,2	20 :1	1	5,06

16	4	90	0,2	20 :1	1	3,47
17	2	30	0,1	10 :1	2	3,25
18	4	30	0,1	10 :1	2	5,5
19	2	90	0,1	10 :1	2	6,25
20	4	90	0,1	10 :1	2	10,75
21	2	30	0,2	10 :1	2	6,02
22	4	30	0,2	10 :1	2	5
23	2	90	0,2	10 :1	2	7
24	4	90	0,2	10 :1	2	8,5
25	2	30	0,1	20 :1	2	5,32
26	4	30	0,1	20 :1	2	5,25
27	2	90	0,1	20 :1	2	6
28	4	90	0,1	20 :1	2	6,2
29	2	30	0,2	20 :1	2	7,21
30	4	30	0,2	20 :1	2	7,02
31	2	90	0,2	20 :1	2	6,2
32	4	90	0,2	20 :1	2	5,63
33	3	60	0,15	15 :1	1,5	5,81
34	3	60	0,15	15 :1	1,5	2,75
35	3	60	0,15	15 :1	1,5	5

Le tableau montre que le domaine de variations des rendements est entre 2.75% et 10,75% pour les limites choisies de température, temps, concentration de l'acide, ratio, et du coefficient de partage.

IV.2.1 Étude statistique

Pour évaluer la fiabilité d'un modèle obtenu par les plans d'expériences, les valeurs de quelques coefficients sont exigées. La figure IV.13 représente le coefficient de corrélation, le coefficient de prédiction, la validité du modèle et la reproductibilité.

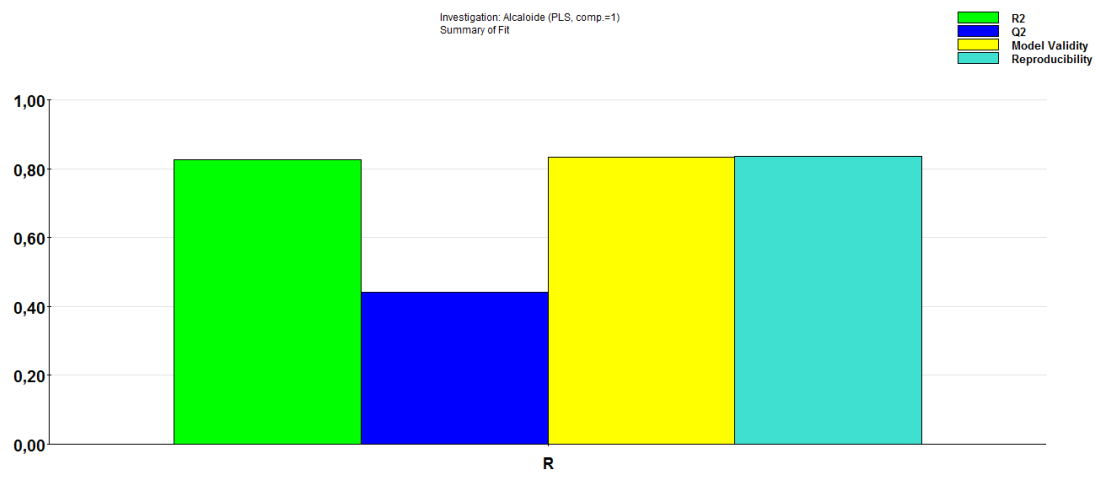


Figure IV.2 : Histogramme représentant le coefficient de corrélation et le coefficient de prédiction et la validité du modèle et la reproductibilité.

La validité du modèle ainsi que la reproductibilité des expériences sont excellentes. Afin d'estimer le degré d'ajustement du modèle par rapport à la réponse mesurée, le coefficient de corrélation R^2 est demandé.

Pour le rendement la valeur de R^2 est égale à 0.827, cette valeur proche de 1 nous permis de dire qu'il y a une bonne corrélation entre les résultats obtenus.

La valeur du coefficient de prédiction Q^2 est de l'ordre de 0.44, cette valeur loin de 1 montre que la prédiction des rendements à l'intérieur des intervalles étudiés reste très difficile.

La difficulté de prédiction peut être expliquée par la figure IV.14 comparant les données expérimentales et le modèle de prédiction du rendement. La plus part des points sont suivant la ligne médium à part certaines expériences comme l'expérience 13 et 20.

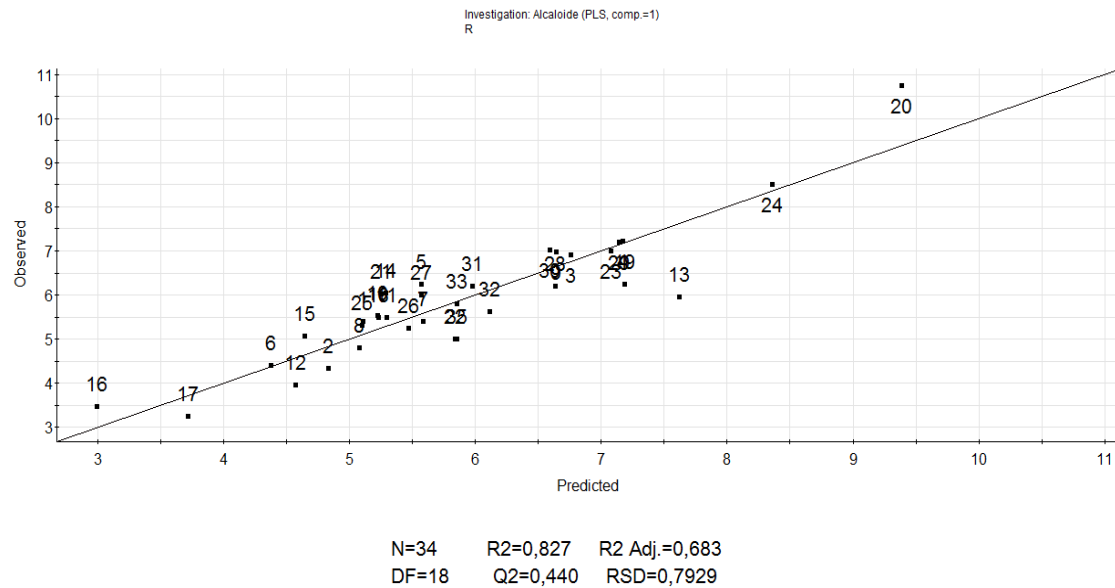


Figure IV.3 : Comparaison entre les données expérimentales et le modèle prédiction du rendement

IV.2.2 Modélisation mathématique

Le modèle mathématique liant la réponse (le rendement, Y) avec les cinq facteurs du procédé d'extraction étudié est le suivant :

$$Y = -0,0332347X_1 + 0,289265X_2 - 0,0116937X_3 - 0,173559X_4 + 0,427127X_5 + 0,167273X_1X_2 - 0,223636X_1X_3 - 0,276364X_1X_4 + 0,432727X_1X_5 - 0,39697X_2X_3 - 0,726061X_2X_4 + 0,44X_2X_5 + 0,124242X_3X_4 + 0,257576X_3X_5 - 0,0375758X_4X_5 + 5,8567$$

IV.2.3 Effets des facteurs étudiés sur le rendement d'extraction

La représentation des effets des facteurs est d'une grande importance dans le but d'estimer les variables ayant plus d'influence sur la réponse : le rendement R (%).

- Tous les facteurs influent positivement mais le rapport sol/liq influence négativement par contre le coefficient de partage a l'influence la plus importante sur le rendement.
- L'interaction entre la température et le ratio X_2X_4 a un effet négatif important.
- L'interaction entre la température et le coefficient de partage (X_2X_5) influent positivement.

- L'interaction entre le temps et le coefficient de partage (X_1X_5) influent positivement.
- L'interaction entre le temps et le ratio (X_1X_4) influent négativement.
- L'interaction entre la température et la concentration (X_2X_3) influent négativement.
- L'interaction entre la concentration et le coefficient de partage (X_3X_5) influent positivement.
- L'interaction entre le temps et la concentration (X_1X_3) influent négativement.
- L'interaction entre le temps et la température (X_1X_2) influent positivement.
- L'interaction entre le ratio et le coefficient de partage (X_4X_5) influent négativement.
- L'interaction entre la concentration et le ratio (X_3X_4) influent positivement.

Tous ces résultats sont réunis dans la figure IV.2.

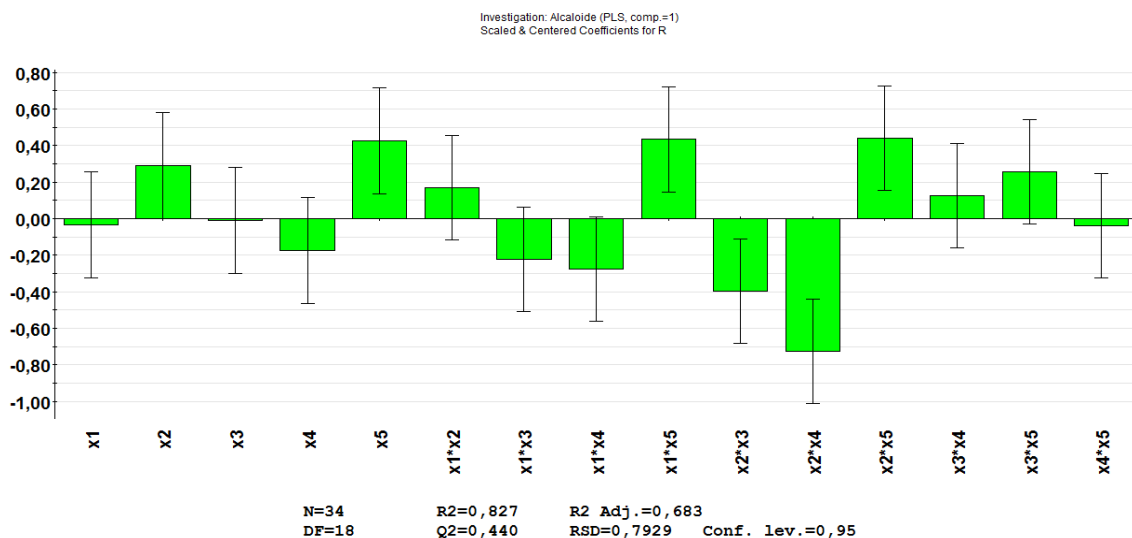


Figure IV.4 : effets des facteurs et leurs interactions sur le rendement.

IV.2.4 Prédiction des résultats

Les contours représentant l'évolution du rendement en fonction de deux facteurs et en fixant les trois facteurs restants au centre sont de l'ordre de dix contours de prédiction. Ces derniers vont être présentés un à un dans cette partie du travail.

Le 1^{er} contour (Figure IV.3) montre que lorsque le temps et la température augmentent le rendement augmente. Donc ces deux facteurs influencent positivement sur la réponse étudiée (R%).

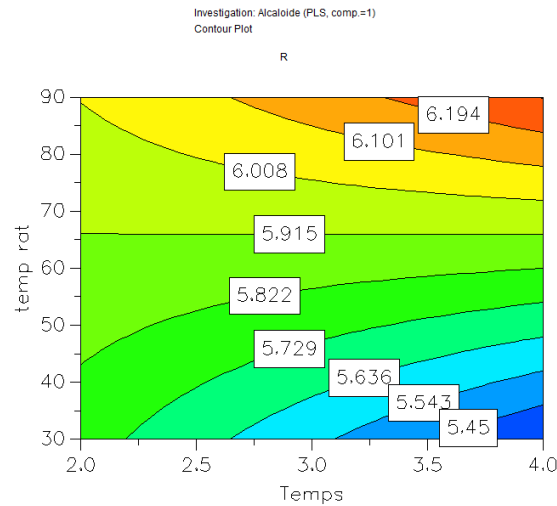


Figure IV.5 : évaluation du rendement en fonction de temps et de température pour des valeurs fixes de concentration [1.5] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5].

Le 2^{ème} contour (Figure IV.4) montre que à basse température le rendement est proportionnel à la concentration, par contre à des températures élevés le rendement est inversement proportionnel.

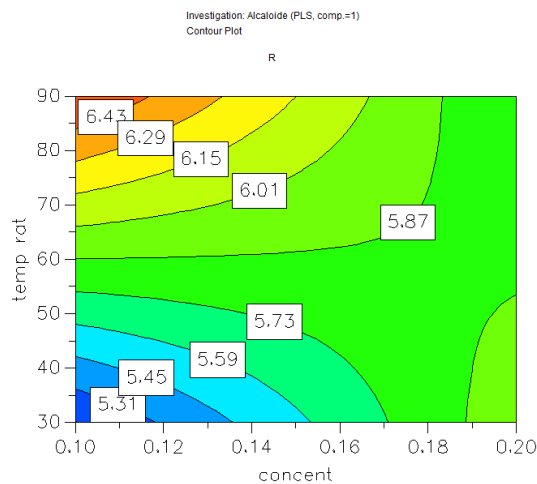


Figure IV.6 : évaluation du rendement en fonction de concentration et de température pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5].

Le 3^{ème} contour (Figure IV.5) montre que à basse température le rendement augmente avec l'augmentation du ratio par contre, a des températures élevées le rendement diminue avec l'augmentation du ratio.

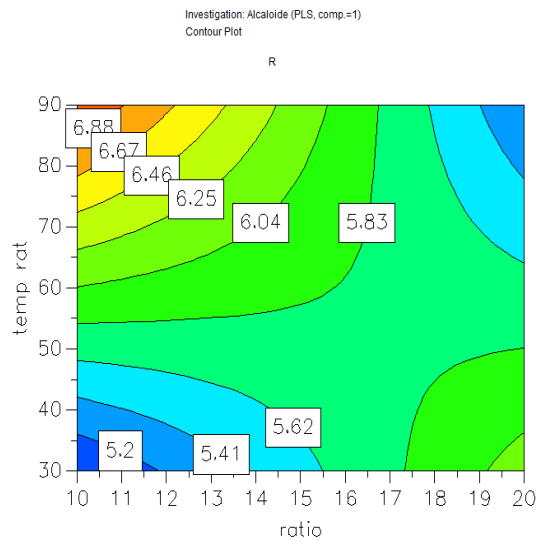


Figure IV.7 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de température pour des valeurs fixes de temps [3] et concentration [1.5] et coefficient de partage [1.5].

Le 4^{ème} contour (Figure IV.6) montre que lorsque le coefficient de partage augmente le rendement augmente, donc le coefficient e partage est un paramètre très important.

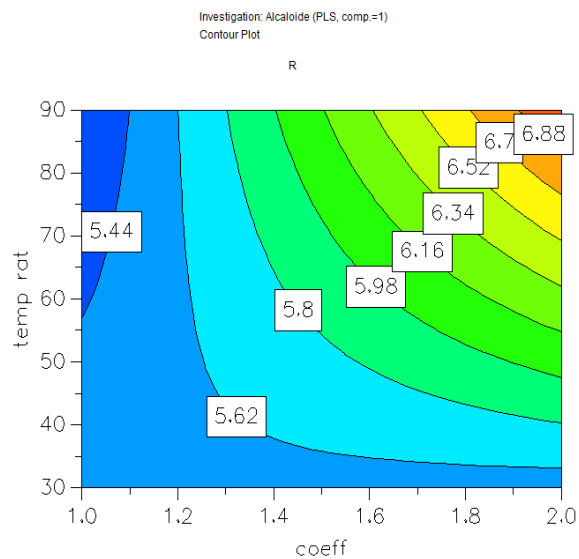


Figure IV.8 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de la température pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5].

Le 5^{ème} contour (Figure IV.7), montre que l'influence de l'interaction entre la concentration et le temps est la plus importante sur le rendement que les facteurs indépendants. Elle est observée dans les premiers heurs d'extraction.

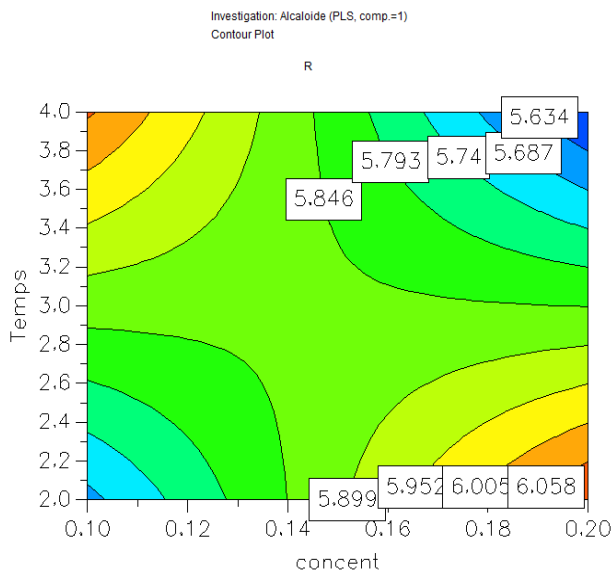


Figure IV.9 : évaluation du rendement en fonction de temps et de concentration pour des valeurs fixes de température [60] et ratio [15] et coefficient de partage [1.5].

Le 6^{ème} contour (Figure IV.8) montre que le rapport sol/liq dans les premières heures d'extraction est proportionnel au rendement, par contre il est inversement proportionnel lorsque le temps augmente.

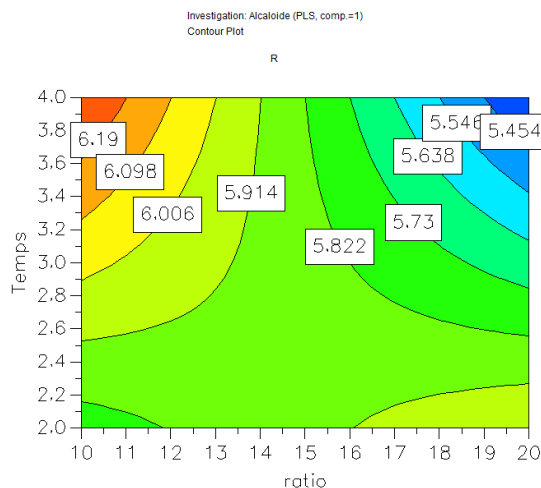


Figure IV.10 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de temps pour des valeurs fixes de température [30] et concentration [1.5] et coefficient de partage [1.5].

Le 7^{ème} contour (Figure IV.9) montre que le rendement augmente lorsque le coefficient de partage augmente. La nature du contour non habituel est dus à la grande différence entre les effets des deux facteurs, effectivement le coefficient de partage a une plus grande influence que la température c'est pour cela que l'effet de cette dernière n'apparait pas dans le contour.

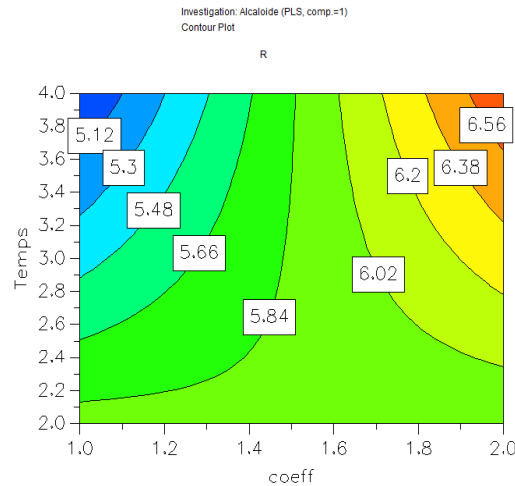


Figure IV.11 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de temps pour des valeurs fixes de température [30] et concentration [1.5] et ratio [1.5].

Le 8^{ème} contour (Figure IV.10) montre que le rendement diminue en fonction de l'augmentation de ratio et de concentration.

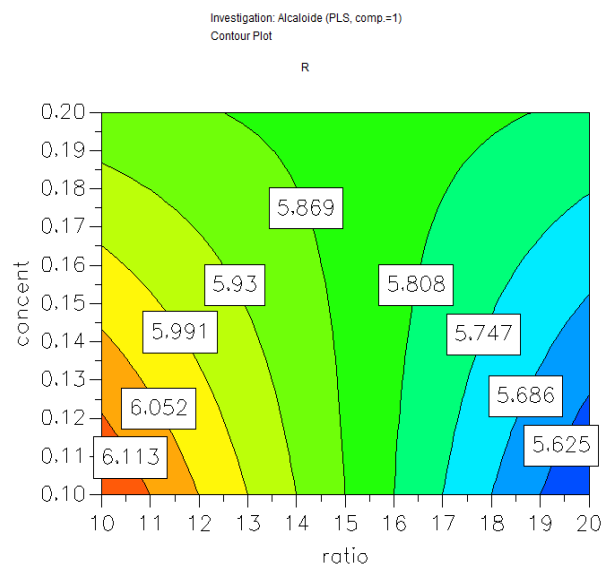


Figure IV.12 : évaluation du rendement en fonction de ratio et de concentration pour des valeurs fixes de temps [3] et température [30] et coefficient de partage [1.5].

Le 9^{ème} contour (Figure IV.11) montre que le rendement augmente avec l'augmentation du coefficient de partage. L'effet HCl n'apparaît pas convenablement à cause de la différence importante entre la grande influence de coefficient de partage et la faible influence d'HCl.

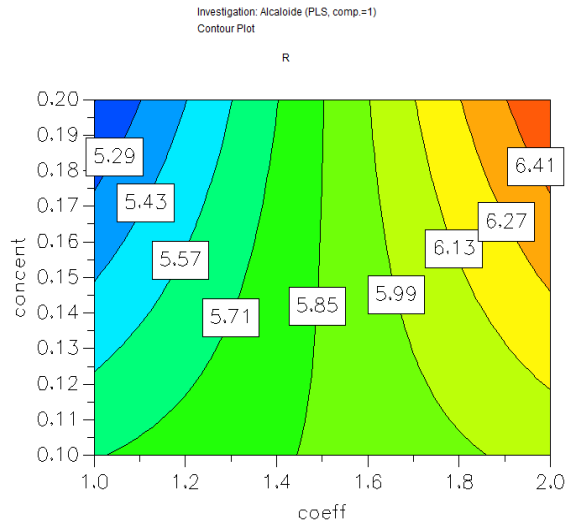


Figure IV.13 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de concentration pour des valeurs fixes de temps [3] et ratio [1.5] et température [30].

Le 10^{ème} contour (Figure IV.12) montre qu'avec l'augmentation du coefficient de partage et la diminution du ratio, le rendement augmente.

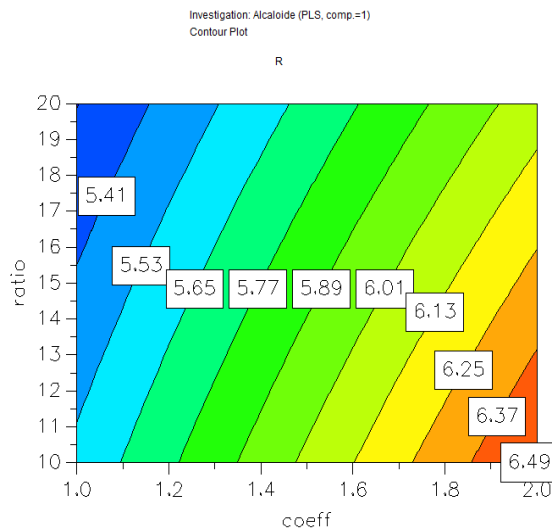


Figure IV.14 : évaluation du rendement en fonction de coefficient de partage et de ratio pour des valeurs fixes de temps [3] et concentration [1.5] et température [30].

IV.2.5 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 20

Tableau IV.2 : Matrice des optimums

Temps	Température	concentration	ratio	Coefficient de partage	R%
2	30	0,2	19,9998	1	7,622
2,0015	30,0001	0,1982	19,9897	1	7,6008
3,9993	89,9857	0,126	10,0001	1,9999	9,1173
3,9056	89,9995	0,1	10,0027	1,9884	9,2568
3,9998	89,9993	0,1778	10	1,983	8,5334
2	30	0,2	20	1	7,6224
4	90	0,1	10	2	9,3861
3,9986	89,8862	0,1	10,0001	1,9998	9,3762

IV.2.6 Discussions des résultats

Le coefficient de partage influence positivement sur le rendement d'extraction et d'une manière très importante, cette influence positive est due à l'augmentation de la quantité de la phase organique (chloroforme) comparé à la phase aqueuse.

L'augmentation du coefficient de partage favorise le transfert de matière des alcaloïdes de la phase aqueuse vers la phase organique tout en évitant le phénomène de saturation de cette dernière. [62]

La température influence positivement sur le rendement d'extraction, elle permet une meilleure solubilisation de la matière solide dans le milieu aqueux et donc une meilleure diffusion des alcaloïdes à travers la matrice cellulosique de la plante. [63]

Le temps ainsi que la concentration d'HCl ont une influence légèrement négative, tandis que le ratio solide liquide influe très négativement. Le point en commun entre ces trois facteurs est le contact des alcaloïdes avec les ions chlore. Effectivement les alcaloïdes peuvent réagir avec les ions chlore en milieu acide ce qui provoque la dégradation des alcaloïdes et donc une diminution du rendement. [64]

IV.2.7 Extraction des alcaloïdes assistée par ultrasons

Comparée aux techniques d'extraction conventionnelles (extraction par solvants ou par la vapeur d'eau ou encore par macération et l'extraction en mode batch par agitation etc.), l'extraction assistée par les ultrasons a l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction à basse température, ce qui fait d'augmenter significativement le rendement. Ceci est en accord avec le résultat obtenu. (Figure IV.15).

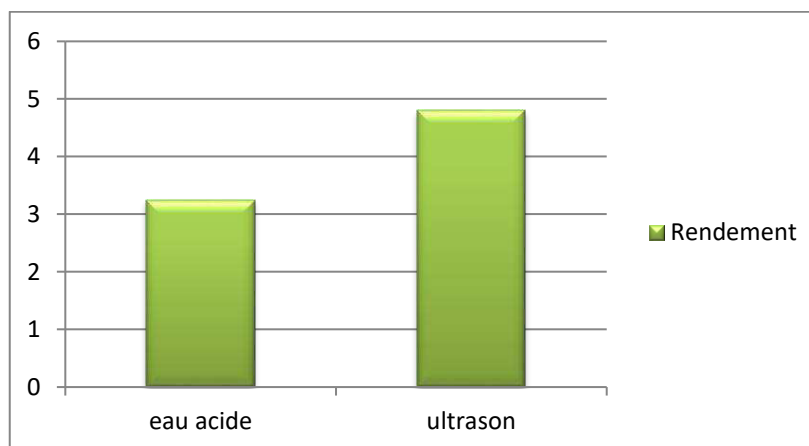


Figure IV.15 : comparaison entre la méthode d'extraction par l'eau acide et l'extraction assistée par ultrasons (essai N°17).

Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à l'atténuation des ondes ultrasonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité de l'émetteur d'ultrasons. Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus. L'étape limitant est la filtration et le rinçage après l'extraction. [65]

IV.2.8 Analyses physico-chimiques des extraits d'alcaloïdes

IV.2.8.1. Réactions de précipitation

Les alcaloïdes peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat)

L'ajoute de quelques gouttes de réactif de Mayer dans la solution des alcaloïdes extraite a provoqué un précipité blanc, cependant l'ajoute des gouttes de réactif de Bouchardat donne un précipité brun, ce qui indique la présence des alcaloïdes Figure IV.16

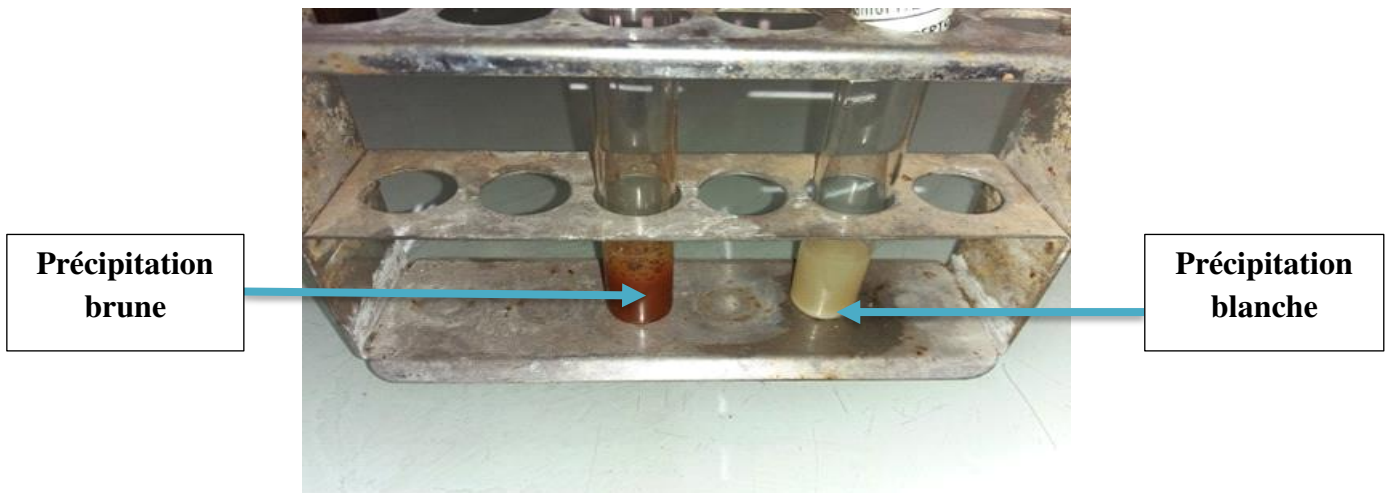


Figure IV.16 : Les précipités obtenus après l'ajout des réactifs de Mayer et Bouchardat

IV.2.8.2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer un composant de l'extrait des alcaloïdes de *l'éphédra rollandii* et deux composants de témoin. Ces composants sont apparus sous forme des spots marron après révélation par l'iode. Un spot en bas de la plaque de notre solution d'extraction est situé au même niveau que celui de médicament (témoin). Ces 2 spots correspondent donc au chlorhydrate de pseudo éphédrine qui est l'alcaloïde majoritaire dans la plante d'*éphédra rollandii*. (FigIV.17).

Le rapport frontal de spot de médicament est égal à celui de notre solution d'extraction.

$$R_f(\text{témoin}) = R_f(\text{solution}) = 0.125$$

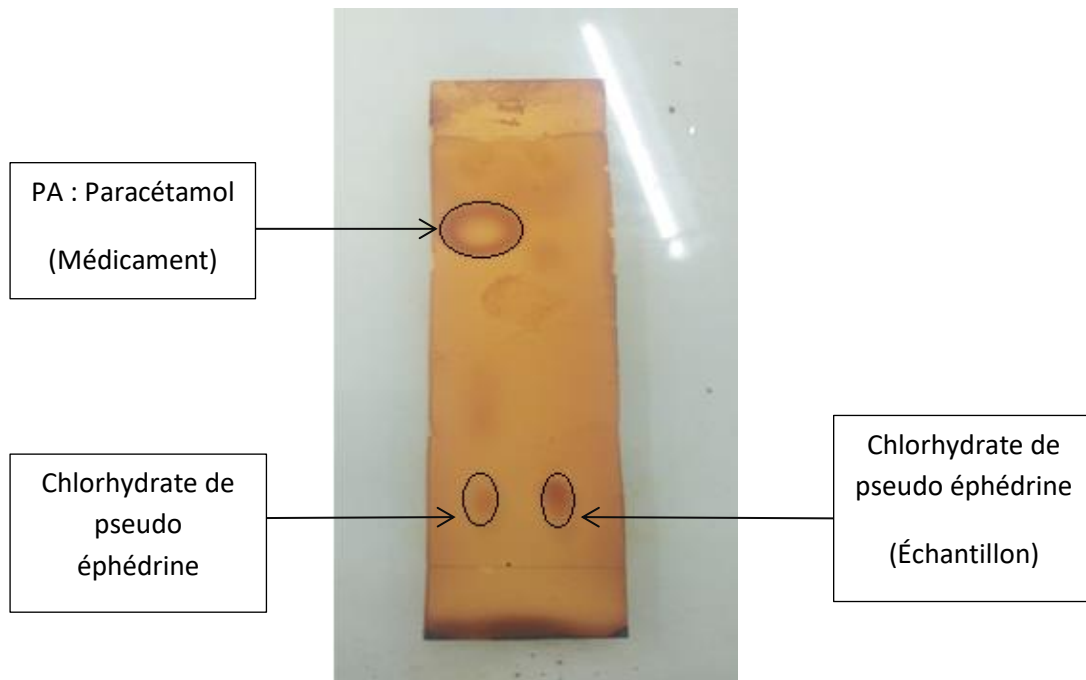


Figure IV.17 : Chromatogramme observé.

- Phase mobile : Méthanol / chloroforme / Ammoniaque (80/20/45 (V/V/V)).
- Témoin : Rhumafed.
- Révélateur : Iode.

IV.2.8.3. Analyse infrarouge (IR)

Le spectre IR montre les modes vibrationnels d'élongation des liens NH entre 3480-3200 cm^{-1} et du groupement OH entre 3400-3200 cm^{-1} . Entre 1767 et 1620 cm^{-1} apparaissent les bandes d'absorptions caractéristiques du groupement C=O, entre 1660-1490 cm^{-1} apparaissent des faibles bandes d'élongation caractéristiques du groupe C=N, à 3120 cm^{-1} apparait le pic d'absorption caractéristique des sels de chlorhydrates.

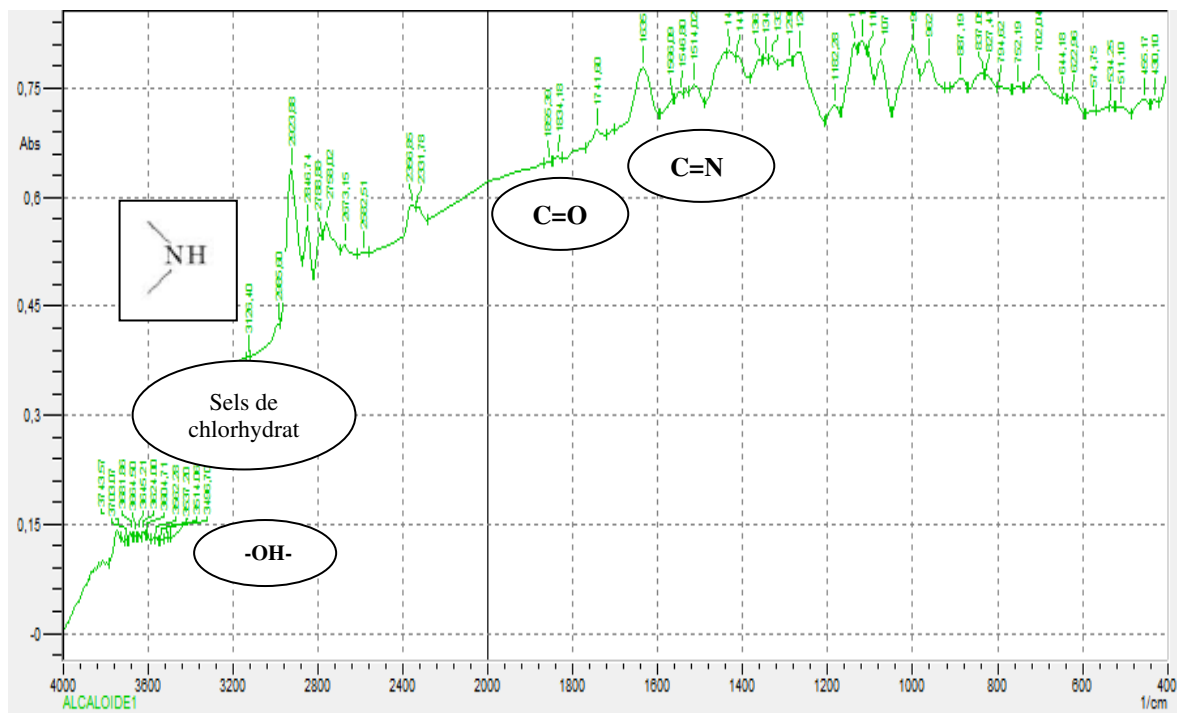


Figure IV.18 : Spectre IR caractéristique des extraits d'alcaloïdes de la plante *Ephedra rolandii*

IV.2.8.4. Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'identification des composés de l'extrait des alcaloïdes totaux majoritaires de la poudre de plante *d'éphedra rolandii* 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. Figure (IV.19).

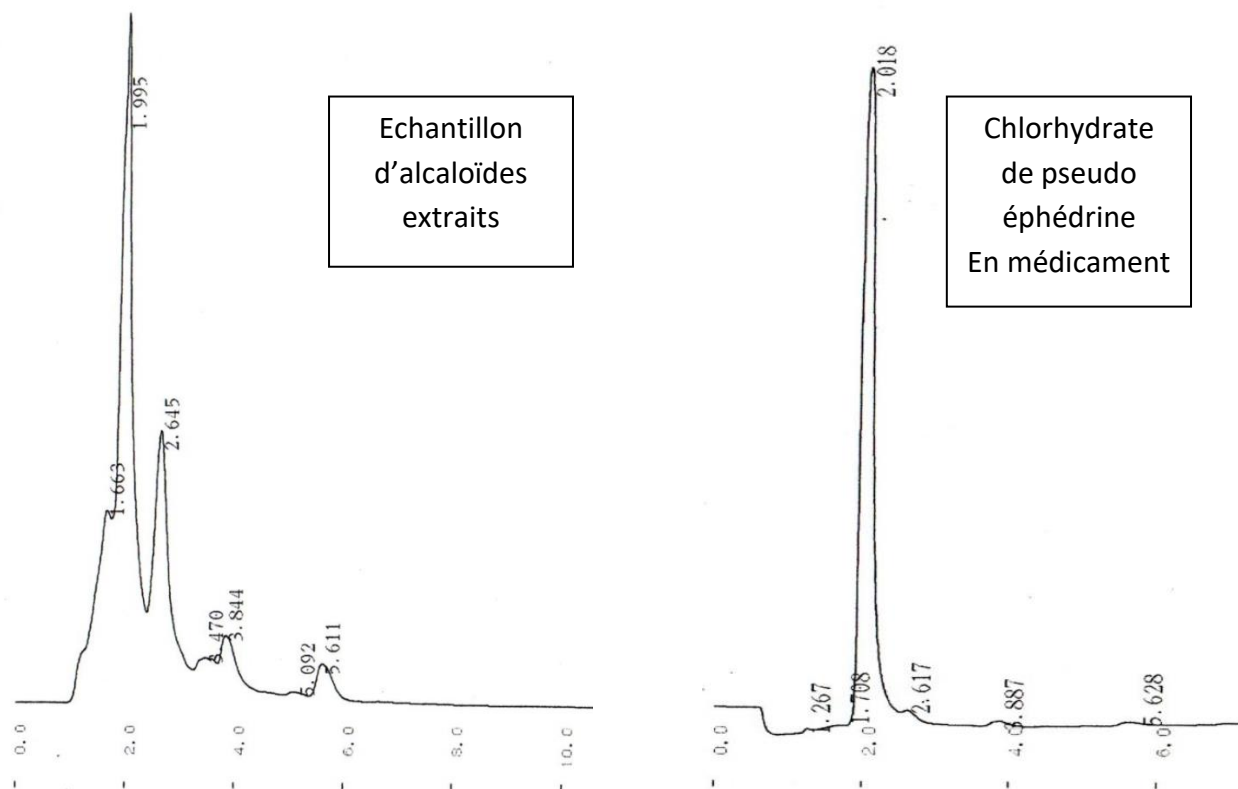


Figure IV.19 : Chromatogramme en HPLC des alcaloïdes extraits de la plante *Ephedra rollandii*

IV.2.9 L'effet antioxydant des extraits d'alcaloïdes

L'activité antioxydant des extraits méthanoïques d'*éphedra rollandi* a été évalué vis-à-vis le radical DPPH à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires.

Par définition la valeur DL_{50} est la valeur de l'extrait qui peut réduire 50% du DPPH.

On peut la calculer par : $Y=32.82X+4.958$ lorsque $Y=50$ $X= 1,37$ mg/l

Plus la valeur de DL_{50} est petite, plus l'activité antioxydant de l'extrait testé est grande celons la bibliographie [66]. La valeur obtenue est inférieur à celle de l'acide ascorbique qui est l'agent antioxydant de référence.

DL_{50} de l'acide ascorbique est égale à 4,716 mg/l, donc l'activité anti-oxydante des alcaloïdes est plus importante que celle de l'acide ascorbique.

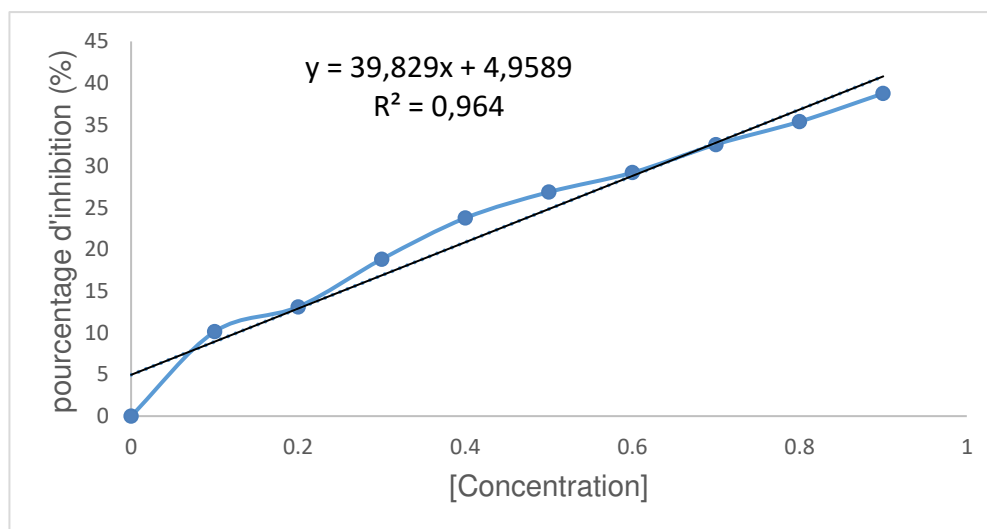


Figure IV.20 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait

IV.2.10. Protocole d'extraction optimisé

L'extraction des alcaloïdes à partir de la poudre végétale *d'Ephédra rollandii* sont obtenues par une extraction solide-liquide, basée sur la différence de leur solubilité en milieu acide.

5 g de la poudre végétale finement broyées sont délipidée par l'hexane par macération et sous agitation mécanique à température ambiante, pendant 3 heures. Après filtration la poudre est séchée à l'étuve toute une nuit. La poudre est alors suspendue dans 50 mL d'eau distillée au quelle on ajoute 1 mL de solution d'acide chlorhydrique 0.1M. Le mélange est porté sous agitation mécanique à la température de 90°C pendant 2 heures. Après filtration la solution d'alcaloïdes obtenue est alcalinisée pour libérer les alcaloïdes extraits sous forme organique. Ces derniers sont alors récupérés par une extraction liquide-liquide par le chloroforme. L'extrait recueilli est évaporé à sec au vaporisateur rotatif.

Conclusion

L'extraction solide-liquide est une technique d'extraction par solvant qui consiste à extraire une espèce chimique se trouvant dans un solide pour la transférer dans un solvant choisi judicieusement.

C'est une opération de transfert de matière entre la phase solide qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction. [67]

L'objectif de ce travail est d'optimiser les paramètres d'extraction des alcaloïdes à partir d'*Ephédra rollandii* afin de contribuer à la valorisation de cette espèce de la famille des Ephedraceae de la région d'Oued-Souf. Ce travail nous a permis d'aboutir à des résultats intéressants qu'on peut résumer comme suit:

- Les résultats obtenus montrent que la plante *d'éphédra rollandii* contient une quantité importante des alcaloïdes.
- L'optimisation des conditions opératoires par le plan d'expériences nous a permis de fixer la meilleure expérience parmi les 35 expériences réalisées.
- L'expérience N° 20 (temps : 4h, température : 90°C, concentration de HCL : 0.1mg/l, Ratio 10:1, coefficient de partage : 2) nous a donné un meilleur rendement qui atteint les 10.75%.
- L'étude de l'effet de ces facteurs a montré que le coefficient de partage a une grande influence sur le procédé d'extraction.
- La chromatographie sur couche mince a permis de séparer un composant majoritaire de l'extrait des alcaloïdes de *l'éphédra rollandii* situé au même niveau que celui du témoin le chlorhydrate de pseudo éphédrine
- La caractérisation par IRTF à montrer la présence des groupements fonctionnels caractéristique des molécules organiques des alcaloïdes extraites.
- L'identification des composés de l'extrait des alcaloïdes de *l'éphédra rollandii* nous a permis de confirmer la présence d'un alcaloïdes majoritaire, le chlorhydrate de pseudo éphédrine à un temps de rétention de 1, 99 min.
- L'étude de l'activité antioxydant des extrais méthanolique des alcaloïdes sur le DPPH à montrer que la valeur de DL₅₀ obtenu est égale à 1,37 mg/l, celle-ci est inférieur à celle de l'acide ascorbique qui est l'agent antioxydant de référence, de ce fait l'activité antioxydant des alcaloïdes est plus importante.

Pour compléter notre travail, d'autres perspectives sont envisageables :

- Perspectives dans le domaine de génie chimique et génie des procédés :
 - Compléter l'optimisation en incluant les paramètres : taille des particules, taux d'humidité.
 - Etude détaillée de l'extraction des alcaloïdes assistée par ultrason.
 - Réaliser une étude technico-économiques des procédés d'extraction des alcaloïdes en milieu aqueux acide, comparativement à l'extraction traditionnelle (par solvant).

- Perspectives dans le domaine biomédical :
 - Etudier la composition exacte des alcaloïdes contenus dans la plante *éphédra rollandii*, par les méthodes chromatographiques et spectroscopiques.
 - Etudier l'activité pharmacologique des alcaloïdes extrait.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Rachel Poirot. Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de TOULOUSE. 2007.
- [2]. Mebrouk Kaissa. Modélisation de transfert de matière lors de l'extraction solide liquide. 2009.
- [3]. Federica Pellati, Stefania Benvenuti. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol: 48, p 254–263.
- [4]. Derbel S., Touzard B., Triki M et Chaieb M., - Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata ssp. alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. Flora.2010. Vol: 205, p 471–474.
- [5]. Limburger R.P., Jacques ALB, Schmitt GC. et Arbo MD. Pharmacological Effects of Ephedrine. Natural Products.2013. p 1218- 1237.
- [6]. Caveny S., Charlet D.A., Freitqg H., Maier-Stolete M. et Starratt A. N. New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). American Journal of Botany.2001. Vol : 88, N°7, p 1199–1208.
- [7]. Bruneton, J. Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed. Tec & Doc, Paris. 1999.
- [8]. Maire R coll. Flore de l'Afrique du Nord. Vol : 1, p 156-158, Le chevalier éd., Paris. 1952.
- [9]. Base de l'Herbier Afrique du Nord MPU Montpellier Université 2.
- [10]. Ebadi M. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. Second ed. CRC Press, Taylor & Francis Group 2007. P 311-318.
- [11]. Bell, A. & Bachman, S. *Ephedra foliata*. The IUCN red list of threatened species 2011.UK <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN>.
- [12]. Dobignard A and Chatelain C. Index synonymique de la flore d'Afrique du nord 3: 1-449. Éditions des conservatoires et jardin botaniques, Genève 2011.
- [13]. Al-Snafi AE. Nutritional and pharmacological importance of *Ficus carica* - A review. IOSR Journal of Pharmacy 2017; Vol 7(3) p 33-48.

- [14]. Bell, A. & Bachman, S. 2011. *Ephedra alata*. The IUCN red list of threatened Species. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN>. UK.2011
- [15]. Ebadi M. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. Second ed. CRC Press, Taylor & Francis Group 2007: p 311-318. 31. U.S. National.
- [16]. Meissner, W. J. Chem. Phys. 1819, 25, 379.
- [17]. Pelletier, S. W. Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives, Ed. S. W. Pelletier, John Wiley and Sons, New York, 1983.
- [18]. Hesse, M. Alkaloids. Nature's Curse or Blessing? Wiley-VHC, Zürich, 2002, 413 p., ISBN 3-906390-24-1.
- [19]. Merghem R ; Livre des éléments de biochimie végétale. 2009. p23-98-107-111-112-113-115-116-118-120-121-124-127-135-137-143-144-152-153-157-158.
- [20]. Popl M., Fahrnich J. et Tatar V., Chromatographic Analysis of Alkaloids. Marcel Dekker. 1990. P 66-67.
- [21]. Facchini P.J., St-Pierre B. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Current Opinion in Plant Biology, 2005. 8:657–666.
- [22]. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Edition tec & doc, Paris, 1999. p783-823.
- [23]. Fabre R., Truhaut R. Précis de toxicologie. Tome 2. Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, 1961. p 379-454.
- [24]. Badiaga M. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de docteur d'université, Mali.2012.
- [25]. Awa N. Etude de l'activité antidiabétique des extraits acétoniques, méthanoliques et hexaniques de *vernonia colorata* (willd/ drake) composées chez des rats wistar. Thèse de docteur en pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.2003.
- [26]. Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1. Masson, Paris, 1981. P 256-284.

- [27]. Dominique et Michèle Frémy, *Quid 2007*, éditions Robert Laffont, édité en 2006, 2090 pages.
- [28]. Badiaga M. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologique de *Nauclea latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat.2011.
P : 20-22.
- [29]. Bruneton, J ; Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales ; 3ème Ed ; Tec & Doc, Paris.1999.
- [30]. Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4eme Ed.), 2009. 1268 p.
- [31]. Bouthaina Ben Amor. Maitrise De L'Aptitude Technologique De La Matière Végétale Dans Les Operations D'Extraction De Principes Actifs ; Texturation Par Détente Instantanée Contrôlée. Thèse Pour Obtenir Le Grade De Docteur L'Université De La Rochelle.2008. pp11.
- [32]. J.P.Moulin, D.Pareau, M.Stambouli. Cinétique de Transfert de Matière entre deux phases. Techniques de l'ingénieur J1075, 1998. p1-20.
- [33]. R.Amari (Epouse Derriche). Extraction des essences de bois de cèdre de l'atlas Algérien. Thèse de Doctorat d'état, Ecole Nationale Polytechnique, Alger, 1997.
- [34]. Wongkittipong R., Prat L., Damronglerd S., Gourdon C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants experimental study, kinetic reaction and model. Separation and Purification Technology, Vol: 4, p 147-154, 2004.
- [35]. Leybros J, Fremeaux P ; Extraction solide-liquide Techniques et appareillage ; Techniques de l'ingénieur (traité Génie des procédés), J 2782.
- [36]. Groubert A ; techniques d'extraction végétale ; Montpellier, 1984. Pharmacie.
- [37]. Sparr Eskilsson C & Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography A, 2000. Vol: 49, p 415-420.
- [38]. B; E; Poling, J; M; Prausnitz, J; P; O'Connell, The properties of gases and liquids; Mcgraw-Hill; 2000.
- [39]. J ; Bimbenet, A ; Duquenoy, G ; Trystram, " Génie des procédés alimentaires, Des bases aux applications ; Ed DUNOD, PARIS, 2003. 159-162.

- [40]. LEYBROS J, FREMEAUX P ; Extraction solide-liquide- Aspects théoriques ; Techniques de l'ingénieur (traité Génie des procédés), J 2780.
- [41]. Yilmaz Y, & Toledo R, T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, Journal of Food Composition and Analysis, 2006. Vol: 19; p 41-44.
- [42]. Aguilera J.M. Solid-liquid extraction .Food Sciences and Technology, 2003.128, p 35-55.
- [43]. E.Koller, Génie chimique, Paris. 2001, p 433, 434,440, 435.
- [44]. Dibert K, Cros E. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee, Part II: Kinetic data, Journal of Food Engineering, 1989. 10(3): p 199-214.
- [45]. Leybros J, Frémeaux P. Extraction solide-liquide aspects théorique, Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés. 1990.
- [46]. Lehtinen P & Laakso. Effet of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber,Journal of the Agricultural and Food Chemistry,1988. Vol : 46, p 4842-4845.
- [47]. P.Mafarat et E.Beliard, Génie Industriel Alimentaire. Tome I, Ed Tech et doc, Lavoisier, Paris, 1992.
- [48]. J.Lebros, P.Fremeaux. Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédé), J 2780.
- [49]. Gao, L. and G. Mazza. 1996. "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflowerhulls." J. Food sci. 1996. Vol: 61, p600-603.
- [50]. Luque-Garcia, J. L. and M. D. Luque de Castro. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. Journal of Chromatography A 2004.1034: 237-242.
- [51]. Z.Lasic, Design of experiment in chemical engineering, Wiley-VCH, Allemagne, 2004.
- [52]. Veillet S., Tomao V et Chemat F. Ultrasound Assisted Extraction of Aromas and Antioxidants. In: Essential oil and aromas green extractions and applications. Chemat F. Ed. HKB, New Delhi.2009.

- [53]. Mason, T. J., L. Paniwnyk, et al. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* .1996. Vol: 3; p 253-260.
- [54]. British pharmacopoeia commission, Great Britain Medicines commission, & General Medical Council (Great Britain). Bernan press (PA). 2000.
- [55]. Filipiak-Szok, A., Kurzawa, M., & Szlyk, E. Simultaneous Determination of Isoquinoline Alkaloids in Medicinal Asiatic Plants by Ultrasound-Assisted Extraction and High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with Principal Component Analysis. *Analytical Letters*, 2018. 51(16), 2577-2587.
- [56]. Jaber-Vazdekis, N. E., Gutierrez-Nicolás, F., Ravelo, Á. G., & Zárate, R. Studies on tropane alkaloid extraction by volatile organic solvents: dichloromethane vs. chloroform. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 2006.17(2), 107-113.
- [57]. Dr Sahraoui.W, Les alcaloïdes ; Réaction de précipitation. *Laboratoire de Pharmacognosie* P : 3.
- [58]. L. Bouzidi A, Mahdeb N, Kara N et Benouadah Z. *Analyse Qualitative Et Quantitative Des Alcaloïdes Totaux Des Graines De *Datura Stramonium**.
- [59]. Hisiger, S., & Jolicoeur, M. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochemistry Reviews*, 2007. 6(2-3), 207-234
- [60]. Nait Bachir, Y., Zafour, A., & Medjkane, M. Formulation of stable microcapsules suspensions content *Salvia officinalis* extract for its antioxidant activity preservation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018. 42(2), e13446.
- [61]. Parcevaux S et Laurent Huber L. *Bioclimatologie : Concepts et applications*. Ed. Quae. 2007
- [62]. Zhang, W., Zhu, D., Fan, H., Liu, X., Wan, Q., Wu, X., & Tang, J. Z. Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system. *Separation and Purification Technology*, 2015.141, 113-123.

- [63]. Konan, K. V., Le, T. C., & Mateescu, M. Enhanced Solubility of Alkaloids by Complexation with Polycarboxylic Materials for Controlled Release Formulations: Case of *Peschiera fuchsiaefolia*. *AAPS PharmSciTech*, 2019. 20(3), 108.
- [64]. Hafner, M., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Crews, C., & Krska, R. Stability and epimerisation behaviour of ergot alkaloids in various solvents. *World Mycotoxin Journal*, 2008. 1(1), 67-78.
- [65]. 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 – Petko Ivanov PENCHEV – 07/2010
- [66]. Chaerunisa, A. Y., Ramadhani, F. N., Nurani, T. D., Najihudin, A., Susilawati, Y., & Subarnas, A. Hepatoprotective and antioxidant activity of the ethanol extract of *Cassia fistula* L. Barks. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2018. 10(6), 1415-1417.
- [67]. Leybros J., Fremeaux P. Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur (traité Génie des procédés)*, J 2780.

ANNEXES

Annexe III.1 :



Figure III.1 : Extraction des feuilles d'Ephédra *rollandii*

Annexe III.2 :



Figure III.2 : décantation : séparation de la phase organique et la phase aqueuse.

Annexe III.3 :



Figure III.3 : Rotavapeur : évaporation à sec des extraits organiques.

Annexe IV.1 : Chromatogramme en HPLC d'origine des alcaloïdes extraits de la plante *Ephédra rollandii*.

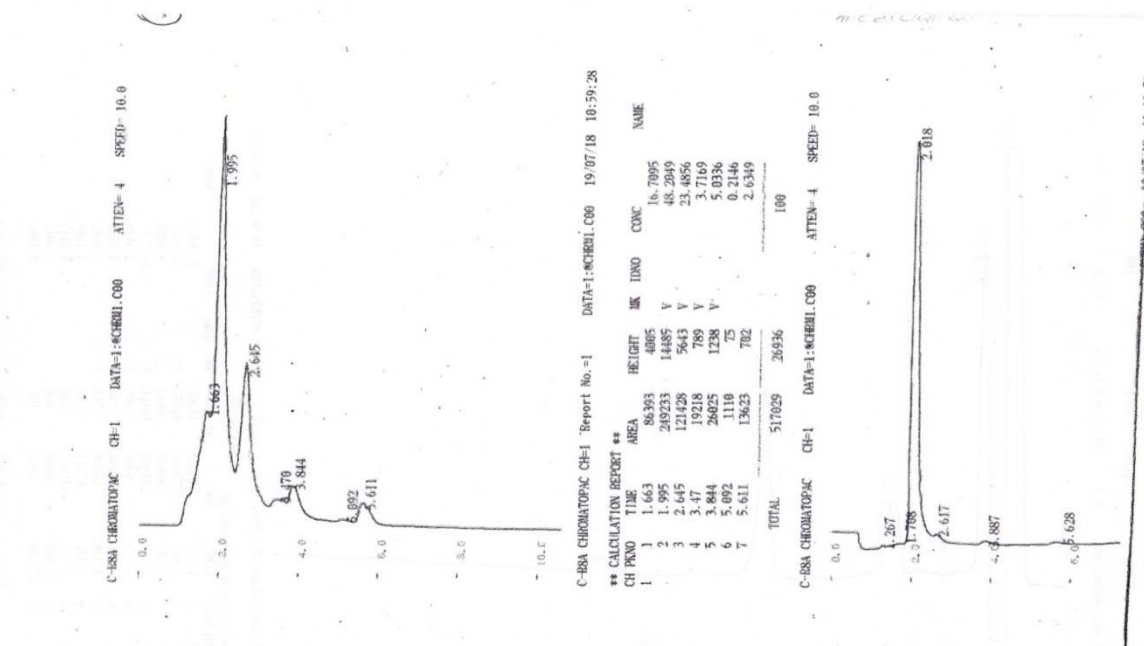
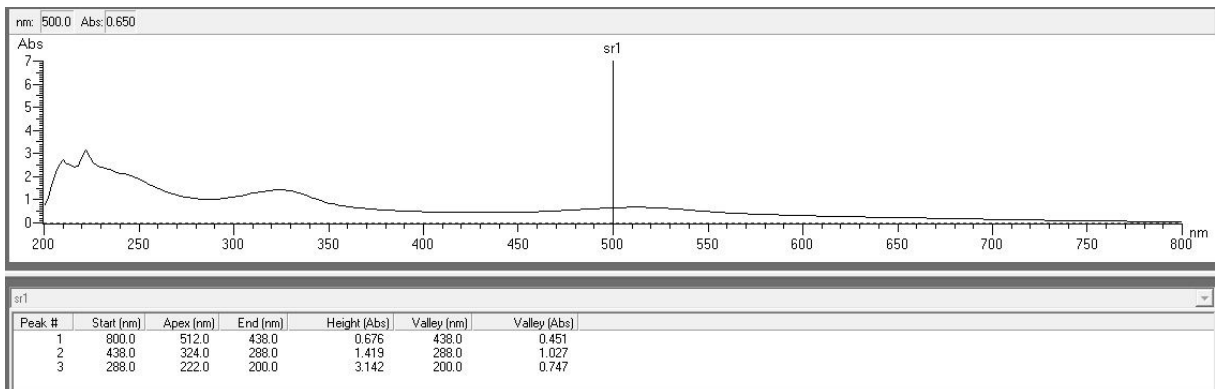


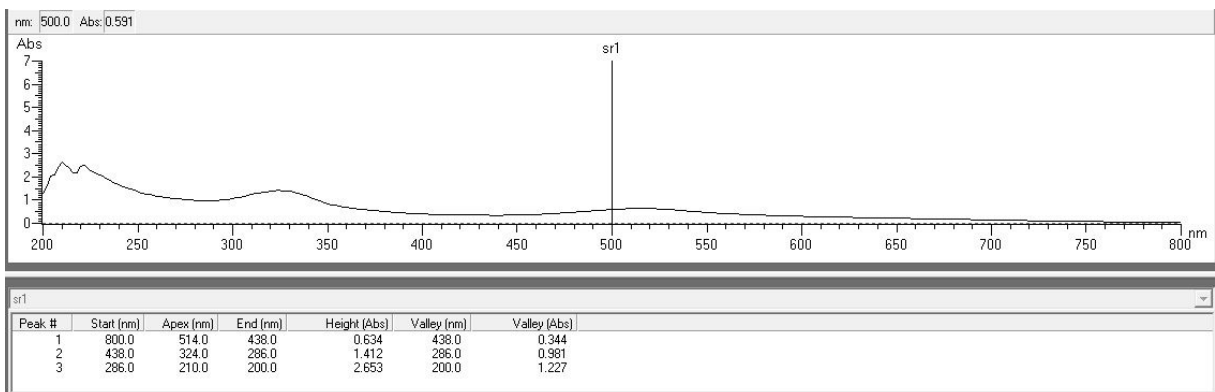
Figure IV.1 : Chromatogramme en HPLC d'origine des alcaloïdes extraits de la plante *Ephédra rollandii*

Annexe IV.2 : les spectres de balayage de chaque échantillon pour le test antioxydant.

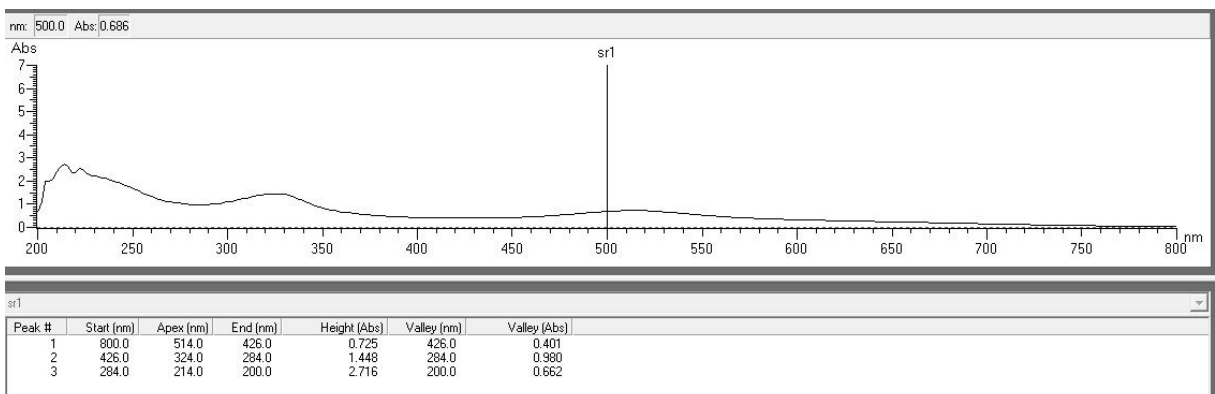
Témoin :



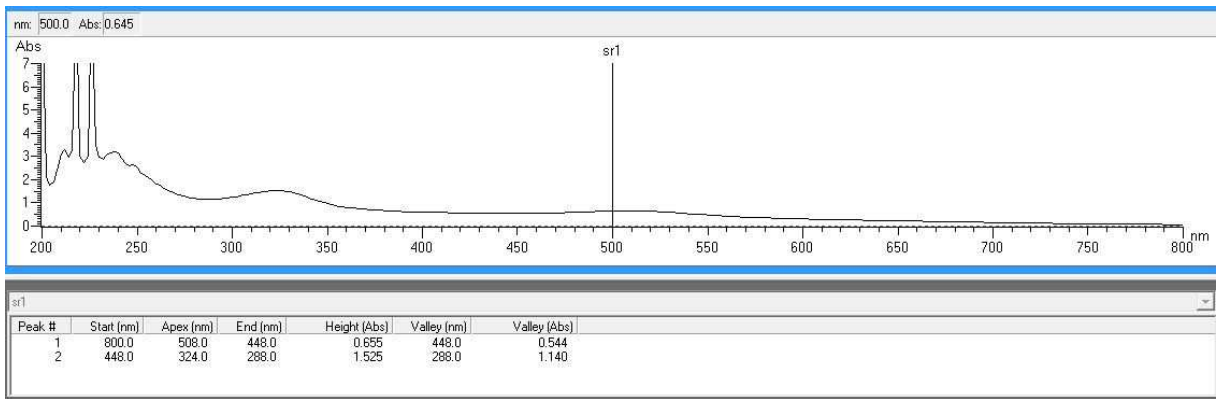
Echantillon N°1 :



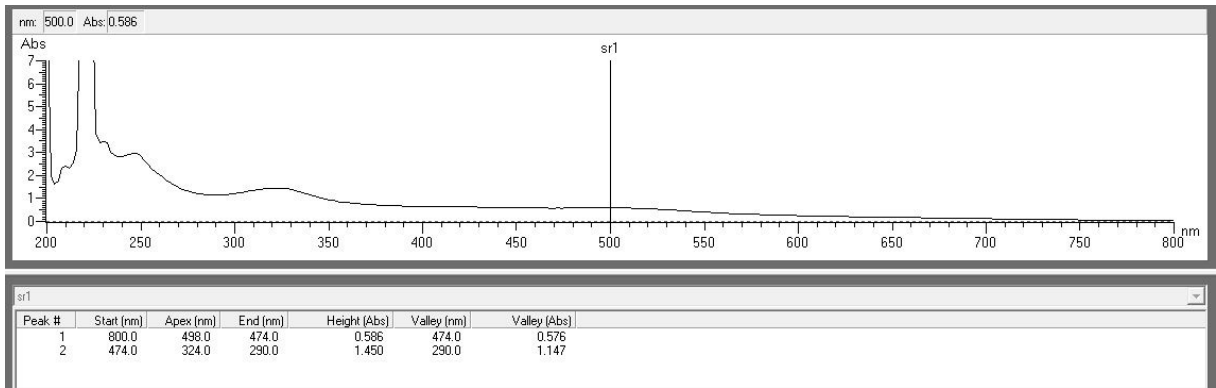
Echantillon N° 2 :



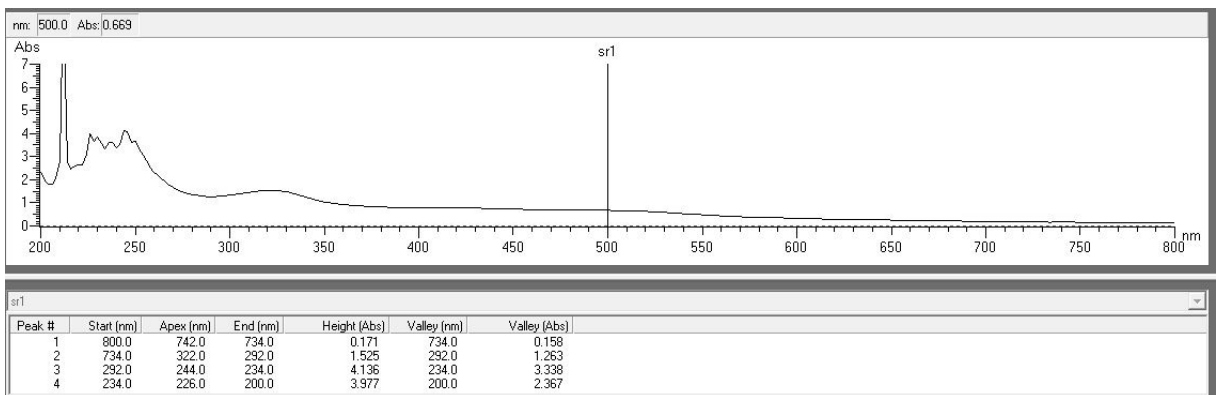
Echantillon N°3 :



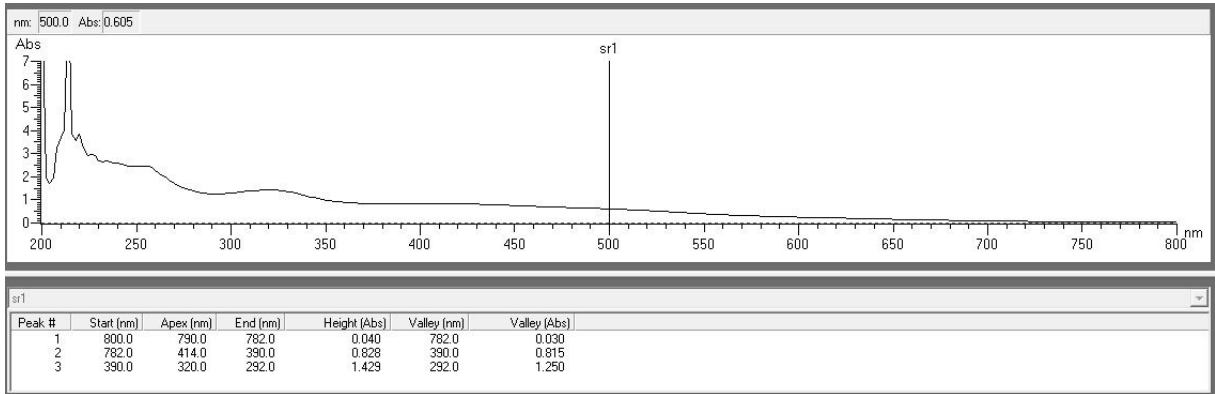
Echantillon N°4 :



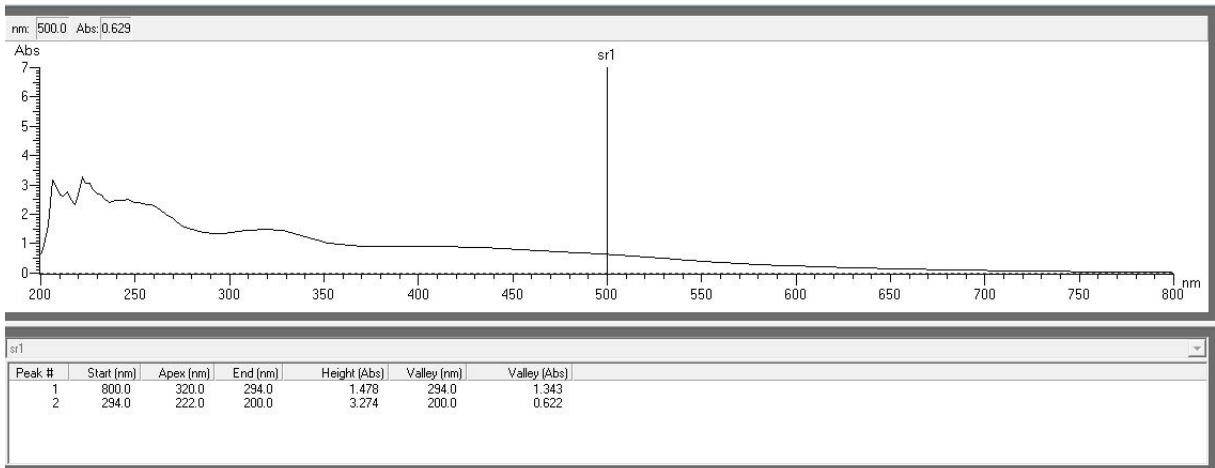
Echantillon N° 5 :



Echantillon N°6 :



Echantillon N°7 :



Echantillon N°8 :

