



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

الكيمياء الحيوية البيولوجيا الخلوية الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

Etude extractive des alcaloïdes et évaluation de leur l'activité antimicrobienne du champignon *Pleurotus eryngii*

Présenté et soutenue par : BOUTERA KENZA

Le : 14/06/2016

HAMMOUDI ILHEM

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr BENSEGUENI A Pr. Université des Frères Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mme. TENIOU S M.A.A. Université des Frères Mentouri Constantine.

Examineurs : Mme. BOUTAGHANE N M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine.

Année universitaire

2015 - 2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier ALLAH.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur **M^{me} TENIOU SOUMIA**, qui nous a encadrées et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordées nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous remercions aussi, Mr « Bensegueni A » Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions Mme BOUTAGHANE.N maitre de conférences classe B, Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté d'examiner notre travail et de nous avoir aidé pendant notre travail.



UN GRAND MERCI A TOUS

Dédicaces

Je dédie mon travail à :

*Ma très chère mère **NEDJAI HASINA** et mon père **BOUTERA AMAR** en reconnaissance de leurs divers sacrifices dans cette vie juste pour me hisser vers le savoir.*

À mes chers sœurs et mon frère:

*« **AMINA, SAMIRA, WIDAD, ABDE ALMALAK** »*

*À tous mes collègues : «**ZEROUAL CHARAF EDDINE, ZEROUAL SARAB, BOUTERA IBTISEM, ANANA HADIL, MNADJLIA AMIRA, MNADJLIA AMANI**»*

KENZA

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....01

Partie Bibliographique.

1. Les champignons	03
1.1. Les différents types de champignons	03
1.1.1. Les champignons saprophytes.....	03
1.1.2. Les champignons parasites.....	03
1.1.3. Les champignons symbiotiques.....	03
1.1.4. Les champignons mycorhiziens.....	04
1. 2. Les Pleurotes.....	04
1.3. <i>Pleurotus eryngii</i>	04
1.3.1. Classification	06
1.3.2. Description d'espèce	06
1.3.3. Confusion dangereuse	07
1.3.4. Propriétés médicinales	07
2. Les métabolites secondaires	
2.1. Alcaloïdes	10
2.2. Nature et présence des alcaloïdes.....	10
2.3. Biosynthèse des alcaloïdes.....	11
2.4. Les différentes classes des alcaloïdes.....	11
2.4.1. Les alcaloïdes vrais.....	11
2.4.2. Les pseudo-alcaloïdes.....	12
2.4.3. Proto alcaloïdes.....	12

2.5. Propriétés biologiques des alcaloïdes	13
2.6. Intérêt thérapeutique	13

3. Activités biologiques

3.1. Activités antibactérienne	14
3.1.2. Souches antibactérienne utilisées	
3.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.1.2.3. <i>Proteus sp</i>	15
3.1.2.4. <i>Listeria</i>	16
3.1.2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
3.1.2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3.2. Définition Antifongique.....	17
3.2.1. Description des souches utilisées	
3.2.1.1. <i>Chaetomium spp</i>	17
3.2.1.2. <i>Trametes sp</i>	18

Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes

1.1. <i>Pleurotus eryngii</i>	19
1.2. Récolte du Matériel	19
1.3. Conservation du champignon	20
1.4. Détection et caractérisation des alcaloïdes.....	20
1.4.1. Préparation des réactifs	20
➤ Réactif de Mayer	20
➤ Réactif de Wagner.....	20
➤ Réactif de Hager	20
➤ Réactif de Dragendorff	21
1.4.2. Préparation de la solution a analyses.....	21
1.4.3. Mise en évidence des alcaloïdes.....	21
1.5. Extraction les alcaloïdes.....	21
1.6. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	24

1.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
1.7.1. Matériels bactériologiques utilisés.....	24
1.7.2. Test de l'activité inhibitrice.....	24
1.7.2.1. Préparation des disques et Stérilisation du matériel.....	25
1.7.2.2. Milieu.....	25
1.7.2.3. Préparation des l'inoculum.....	25
1.7.2.4. Ensemencement et dépôt des disques.....	25
1.7.2.5. Lecture des antibiogrammes.....	27
1.8. Activité Antifongique.....	27

Résultats et discussion

1. <i>Screening</i> des alcaloïdes.....	28
2. Extraction des alcaloïdes totaux.....	29
2.1. Détermination des rendements d'extraction.....	29
2.2. Chromatographie sur couche mince.....	30
3. Test Activités biologiques	
3.1. Test Activités antibactérien.....	31
3.2. Test Activités antifongique.....	34

Conclusion.....	36
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des Figures

Figures	Titres	Pages
1	Champignon <i>Pleurotus eryngii</i>	04
2	Classification du champignon <i>Pleurotus eryngii</i>	05
3	Description d'espèce <i>Pleurotus eryngii</i>	06
4	Champignon dangereux	07
5	Alcaloïdes vrais	11
6	Pseudo-alcaloïdes	12
7	Proto-alcaloïdes	12
8	<i>Escherichia coli</i>	14
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
10	<i>Proteus sp</i>	15
11	<i>Listeria</i>	16
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
14	<i>Chaetomium sp</i>	18
15	<i>Trametes sp</i>	18
16	Zones de récolte	19
17	Schéma représentant les étapes de l'extraction des alcaloïdes	23
18	Les différentes étapes de l'activité antibactérienne.	26
19	Extrait sec obtenu après évaporation	29
20	Figure représentant les deux chromatogrammes après révélation sous UV (1) et par le réactif DragenDorff (2).	30
21	Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait contre différentes bactéries	33

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	Résultats de recherche des alcaloïdes chez le <i>Pleurotus</i> <i>eryngii</i>	28
2	Rendement de l'extraction	29
3	Résultats de l'activité antibactérienne	31
4	Résultats de l'activité antifongique	34

Liste des abréviations

Abréviations et symboles	Symboles utilisée pour les composés mentionnés dans la littérature
AT	Alcaloïdes totaux
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CHU	Centre hospitalier universitaire
FSNV	Faculté des sciences de la nature et de la vie
H₂SO₄	Acide sulfurique
MH	Mueller – Hinton
NH₄OH	Ammoniaque
TSST-1	la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique et des toxines exfoliatives.
OGA	Gélose glucosée à l'oxytétracycline

Introduction



Introduction

Dans le domaine de la santé, l'usage des champignons n'est pas encore très répandu. L'on a encore tendance à considérer le champignon sous l'angle de sa toxicité ou de sa comestibilité, ou encore à mettre en avant les risques de pollution, bien réels cependant, qui peuvent atteindre les champignons. Mais c'est là une vision bien réductrice. Au Japon, en Russie, aux Etats-Unis, les champignons sont étudiés depuis plus ou moins longtemps pour leurs propriétés thérapeutiques. En Asie du Sud Est, les champignons sont même utilisés depuis bien longtemps, puisque les pharmacopées chinoises en citent des usages depuis plus de deux mille ans.

D'après Alain tardif [1] une étude japonaise, près de 700 espèces de champignons possèdent des propriétés anticancéreuses, ce simple chiffre démontre à l'envie l'essor que devrait prendre la mycothérapie dans le monde des thérapies naturelles. Parmi ces espèces on trouve *Pleurotus eryngii*, qui est reconnue par sa qualité richesse nutritive, et ses propriétés curatives particulières bénéfiques pour la santé humaine [2-3-4]. A la lumière de ces données, nous avons choisi d'étudier l'une des familles chimiques les plus importantes du métabolisme secondaire du champignon *Pleurotus eryngii* du nord-est d'Algérie les alcaloïdes.

Les alcaloïdes constituent le nom générique de près d'un millier de substances naturelles ou synthétiques appartenant à la chimie des substances organiques, ayant des propriétés thérapeutiques ou toxique remarquables (surtout à l'état pur) même a faible dose [5]. Ces substances sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale. Les alcaloïdes utilisés comme « médicaments » ont conduit à des tests concluants dans le traitement aussi en médecine traditionnelle qu'en médecine moderne de certaines pathologies aiguës comme le cancer, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hépatite [6-7].

Par ailleurs, lors de ces dernières années, la résistance microbienne aux antibiotiques pose un problème de santé public majeur, ce qui a amené les scientifiques à explorer de nouvelles substances naturelles dotées d'activités antibactérienne et antifongique.

Introduction

Notre travail est orienté vers une étude extractive des alcaloïdes du champignon *Pleurotus eryngii* une évaluation de leurs activités antibactérienne et antifongique. Pour atteindre ces objectifs, une étape primordiale de réaliser le travail en quatre étapes :

- Mise en évidence des alcaloïdes dans l'espèce *Pleurotus eryngii*.
- Extraction liquide-liquide des alcaloïdes totaux, selon la méthode générale.
- Evaluation qualitative des alcaloïdes totaux dans l'extrait, par une chromatographie analytique sur couche mince.
- Evaluation des activités antibactérienne et antifongique des alcaloïdes totaux extraits du champignon.



**Partie
bibliographique**

1 .Les champignons :

Les Champignons, ou Fungi, sont des organismes nucléés (Eucaryotes), constituant un groupe autonome au sein du monde vivant, indépendant des Bactéries, des organismes naguère regroupés sous le nom de « Protistes », des Végétaux et des Animaux. Leur structure primordiale est un thalle dépourvu de pigment assimilateur, dénommé « mycélium » chez les Champignons. Ils se comportent donc nécessairement en hétérotrophes vis-à-vis du carbone et utilisent les matières organiques comme source d'énergie. Ils sont consommateurs, décomposeurs, saprobiontes ou exceptionnellement parasites obligatoires (essentiellement sur des Végétaux) [8], actuellement les champignons sont divisés en trois règnes séparés et distincts basés sur une connaissance étendue de leur biochimie et leur forme génétique établie particulièrement pendant les 30 dernières années [9].

1.1. Les différents types de champignons :

Les champignons font partie de règne Fungi, ils vivent toujours au dépens des matières organiques vivantes ou mortes. Nous avons quatre types de champignons :

1.1. 1. Les champignons saprophytes :

Les champignons saprophytes se nourrissent de matières organiques mortes ou inertes. On les appelle Parfois plantes de pourriture, car ils décomposent les tissus putréfiés afin de les absorber et sont donc très utiles dans la nature.

1.1.2. Les champignons parasites :

Les champignons parasites s'attaquent aux matières vivantes. Ils vivent aux dépens des plantes, des arbres et des animaux.

1.1.3. Les champignons symbiotiques :

Les champignons symbiotiques vivent en relation étroite avec des algues microscopiques. Dès lors, on les considère comme des organismes à part, connus sous le nom de lichens. Le champignon semble contribuer le plus à cette symbiose, mais sa survie dépend de la présence de l'algue qui produit des nutriments au moyen de la photosynthèse.

1.1.4. Les champignons mycorhiziens :

Les champignons mycorhiziens vivent en association avec les racines d'une plante supérieure: le bolet du mélèze [10].

- ✚ Parmi les différentes variétés des champignons, les Pleurotes retiennent d'avantage notre attention, spécifiquement *Pleurotus eryngii*, classe d'Agaricomycetes.

1.2. Les Pleurotes :

Il existe plus d'une trentaine de variétés de Pleurotes. La plupart d'entre elles sont comestibles. Le pleurote représente environ 25 % de la production mondiale de champignons, dont les plus recherchés sont le Pleurote corne d'abondance, le Pleurote en huitre et le Pleurote de panicaut [11-12].

1.3. *Pleurotus eryngii* :

Pleurotus eryngii (DC: FR) Quél aussi appelée Pleurote du panicaut, amande pleurote, ombelle pleurotes, champignons pétoncle et Boletus des steppes, est un champignon typique de la flore des régions subtropicales et les steppes, il attaque les racines de *Eryngium campestre* [13].

Pleurotus eryngii est un champignon largement cultivé, dont la teneur en humidité est d'environ 90% dans les champignons frais [4] (Figure.1).



Figure.1: Champignon *Pleurotus eryngii*.

1.3.1. Classification :

La classification classique de *Pleurotus eryngii* est représentée dans la Figure suivante [4] :

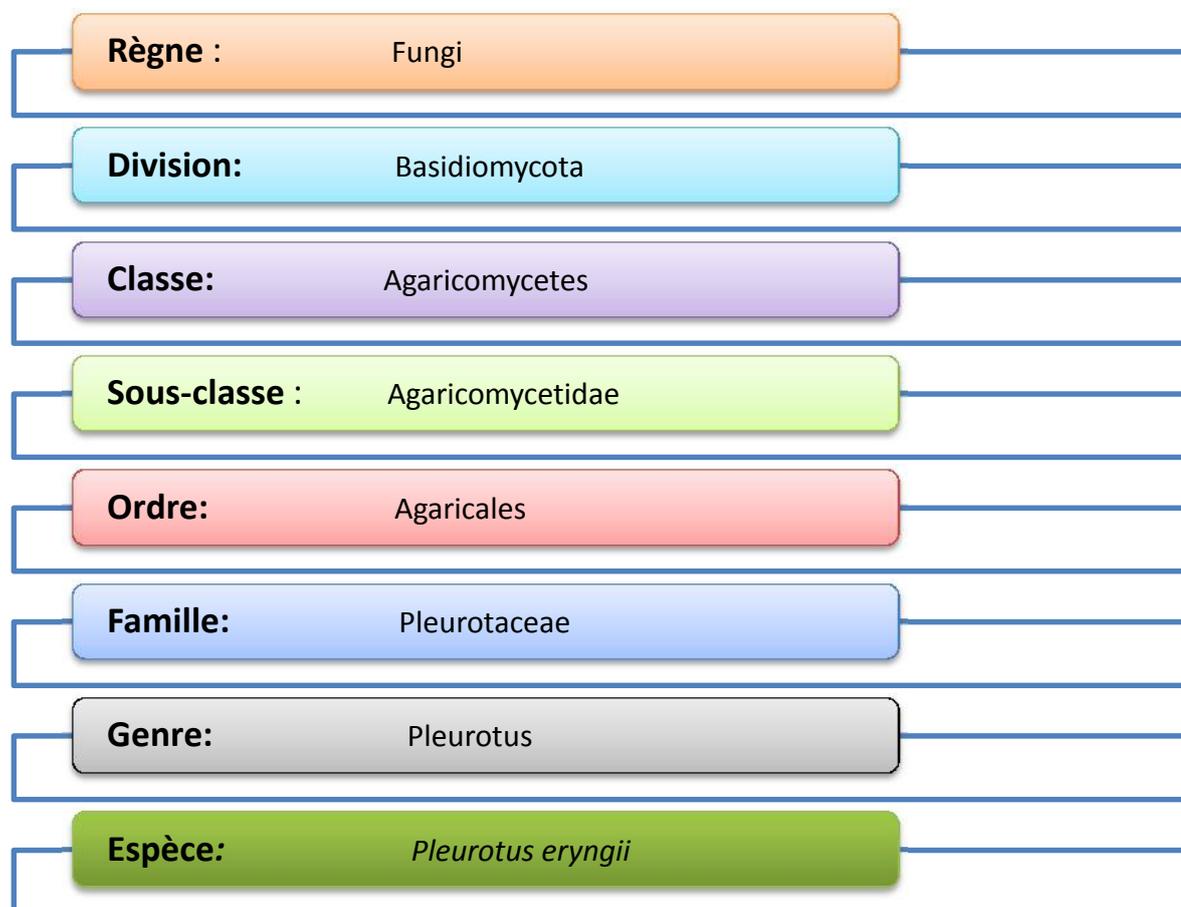


Figure.2: Classification du champignon *Pleurotus eryngii*.

1.3.2. Description d'espèce :

Le *Pleurotus eryngii* comprend :

Chapeau:

4 à 12 cm. Gris-brun à brun-clair, palissant avec l'âge, d'abord légèrement duveteux mais vite glabre et lisse. Convexe puis étalé se déprimant au centre. Irrégulier, assez charnu et épais. Marge enroulée et restant presque toujours tournée vers le bas.

Lamelles:

Blanchâtres se teintant de grisâtre ou d'ocre. Très décurrentes, assez espacées et larges.

Pied:

3 à 10 cm. blanchâtre, généralement un peu excentrique et en fuseau, plein, ferme, robuste (Figure.3).

Chair:

Blanche, ferme, épaisse. Odeur faible mais agréable, saveur douce.

Spores:

Blanches.

Habitat:

Lignicole, printemps-automne, dans les endroits sablonneux incultes, les pâtures, sur les restes en décomposition de certaines ombellifères comme le Panicaut des champs (*Eryngium*) ou le Panicaut maritime ou Chardon bleu (*Heracleum*). Il est commun dans le Midi de la France et très estimé dans certaines régions: les Grands Causses, le littoral Languedocien, provençal et atlantique [11].

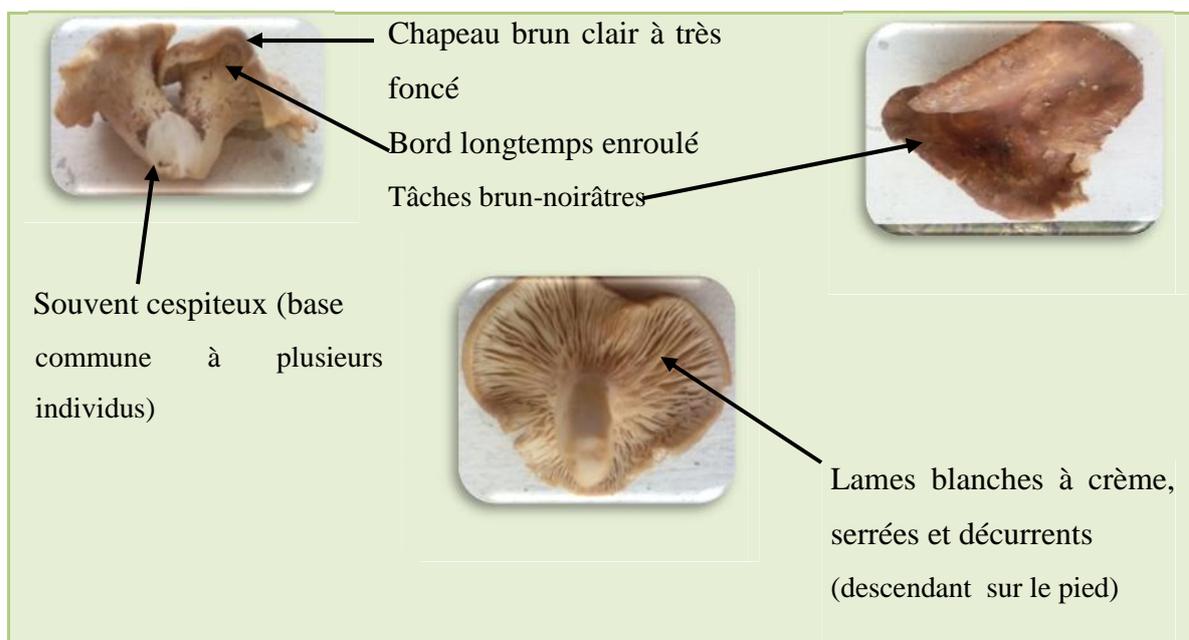


Figure.3: Description d'espèce *Pleurotus eryngii*.

1.3.3. Confusion dangereuse :

Le pleurote du panicaut peut être confondu:

- avec les inocybes tous très toxiques!
- avec plusieurs espèces de clitocybes blancs (marron-crème en vieillissant)

Communs dans les dunes et le marais.

- avec deux espèces de petites lépiotes communes sur la dune, lépiote brun-lilas (*Lepiota bruneolilacea*) et l'arrière dune, lé-piote brun-incarnat (*Lepiota bruneoincarta*). On les dit « petits » mais leur chapeau peut atteindre 10 cm. Ce sont des champignons mortels (Figure.4) [14].



Figure.4: Champignon dangereuse

1.3.4. Propriétés médicinales :

Pleurotus eryngii a des antioxydants qui aident à garder la maladie loin. L'antioxydant dans ce champignon se présente sous la forme d'un acide aminé appelé ergothionéine, quand une personne consomme le champignon, l'ergothionéine trouve

son chemin vers les zones vulnérables du corps et déclenche leur nettoyage. Ces zones sensibles comprennent les yeux, les reins et le foie. Les antioxydants sont des éléments que l'oxydation inverse [3-4], ce champignon porte également les statines, qui sont des composés de lutte contre les maladies, le composé particulier trouvé dans *Pleurotus eryngii*, est appelée lovastatine. Il est un composé qui aide à éliminer le cholestérol du système circulatoire, une fois que le sang est exempt de cholestérol, la circulation sanguine est améliorée et le corps se sent plus sain. Une recherche effectuée et confirmé par Richard Sullivan sur des souris en 2009 a indiqué que *Pleurotus eryngii* a pour effet de contrôler l'insuline dans le corps aussi [3-2], ce champignon est aussi un booster d'énergie excellente. *Pleurotus eryngii* est également crédité de l'amélioration des niveaux de sang. Ceci est important à une époque où le nombre de personnes souffrant d'anémie est en augmentation. Les nutriments contenus dans ce champignon qui aident à augmenter le taux d'hémoglobine sont considérés comme une valeur inestimable dans le domaine médical, il est également rapporté que le *Pleurotus eryngii* a des propriétés antibactériennes. Il devient d'autant plus important, car un remède naturel comme un champignon a rarement des effets secondaires indésirables, d'autre part ce champignon avec de généreuses quantités de nutriments, y compris les glucides, les protéines, les vitamines, minéraux et fibres, cela ressemble beaucoup à une alimentation équilibrée [3-4].

Pour ces raisons, *Pleurotus eryngii* retient d'avantage notre attention. Ceci révèle l'importance de réaliser une étude sur une classe très importante des métabolites secondaires qui est les alcaloïdes, qui n'ont pas être étudié sur le Pleurote du panicaut d'après notre connaissance.

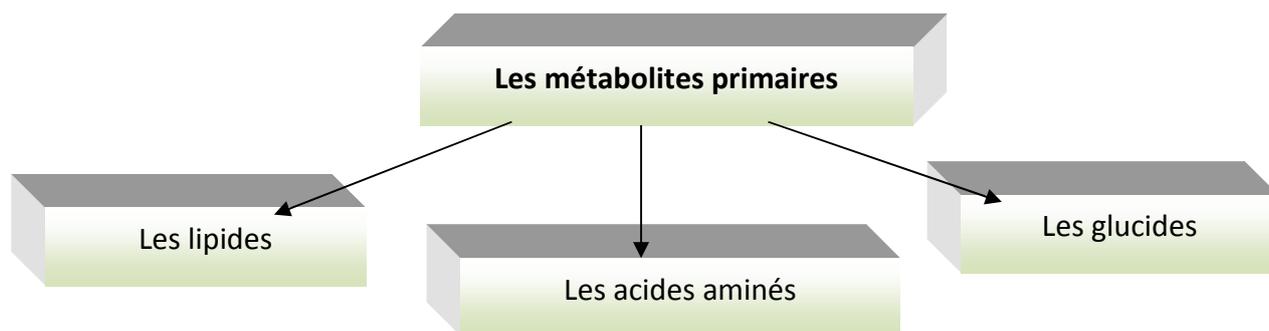
2. Les métabolites secondaires :

Les métabolismes sont les molécules issues du métabolisme des végétaux (ou d'animaux). On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires [15].

Métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme :

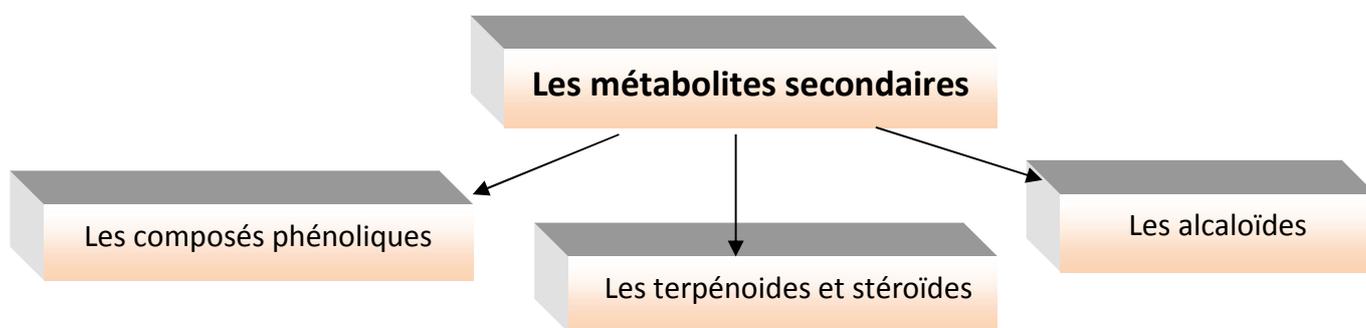
Partie bibliographique

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (celluloses).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines.



Métabolites secondaires ne sont pas, par définition, nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme. Ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Elles ont de nombreuses applications pharmaceutiques. De façon générale, les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ces métabolites secondaires sont repartis en trois grandes familles chimiques.

- Les composés aromatiques (phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).
- Les terpénoïdes et stéroïdes.
- Les composés azotés ou alcaloïdes.



Les alcaloïdes sont une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologiques [16].

2.1. Alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (Ils sont rare dans le règne animal), éventuellement reproductibles par synthèse, azotées, de réactions alcalines plus ou moins prononcées et douées à faible dose de propriétés pharmacodynamiques marquées. Leurs noms se terminent souvent par "ine".

Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent, en plus, de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre). Les alcaloïdes donc sont des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain [17-18-19].

La plus part des alcaloïdes contient plus d'un hétérocycle. L'atome d'azote de cet Hétérocycle est une amine secondaire ou tertiaire. La présence des atomes d'azote dans la chaîne linéaire est très rare. Notons que plusieurs alcaloïdes contiennent deux atomes et plus d'azote dans des hétérocycles différents à l'image de la nicotine et la réserpine. La caféine à son tour contienne quatre atomes d'azote répartis dans les différents hétérocycles [17].

Hiérarchiquement, les alcaloïdes sont les uns des premiers produits organiques Synthétisés à une haute qualité de pureté vue leur importance notamment dans le secteur pharmacologique [20].

2.2. Sources des alcaloïdes:

La source principale des alcaloïdes était auparavant les plantes florales mais Plusieurs composés de cette famille ont été récemment extraits des règnes animaux à savoir les insectes et les poissons. Malgré cet avancement, les alcaloïdes floraux restent les plus importantes par rapport aux autres [17-21].

La présence des alcaloïdes est généralement associée à un acide organique ou à Une autre entité avec un pourcentage variant entre 1 et 3 % du poids sec de la plante. Dans des cas très particuliers, notamment dans les quinquinas, ils dépassent les 10 %

[18-22-23], le rôle des alcaloïdes reste encore moins clair. Probablement ils sont considérés comme une réserve d'azote en cas de son manque dans le sol [24-23].

2.3. Biosynthèse des alcaloïdes:

L'étude de ces biosynthèses a commencé avec l'utilisation des marquages radioactifs. Les résultats ont montré que les alcaloïdes dérivent des acides aminés (Tryptophane, tyrosine, phénylalanine, lysine, arginine...) qui sont d'abord décarboxylés. En plus il y a d'autres composantes de la molécule qui dérivent soit des stéroïdes soit des terpénoïdes [25].

2.4. Les différentes classes des alcaloïdes :

On distingue trois grandes classes des alcaloïdes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct, et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle [26] :

2.4.1. Les alcaloïdes vrais :

Substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure complexe azotée (N inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique. Ils existent dans la plante sous forme de sels. Ayant pour origine biosynthétique un acide aminé, ils sont dotés d'une activité pharmacologique significative (Figure .5).

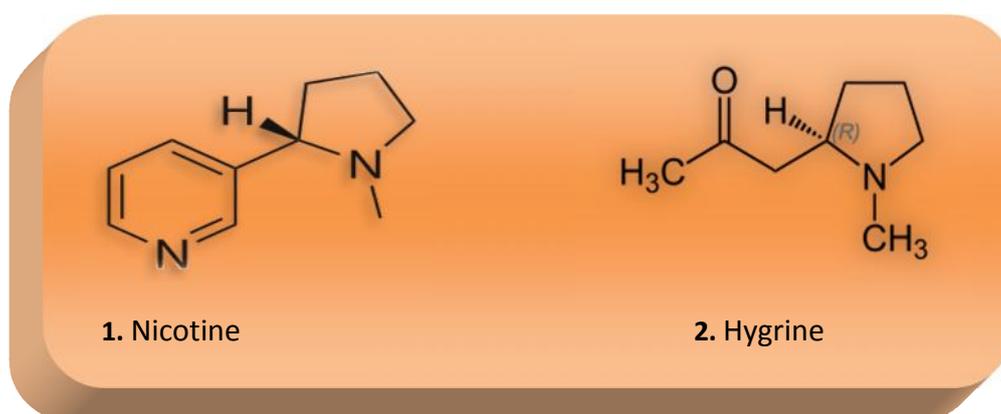


Figure .5 : Exemples d'alcaloïdes vrais.

2.4.2. Les pseudo-alcaloïdes :

Même caractéristiques que les vrais, excepté l'origine biosynthétique.

Partie bibliographique

-Dérivés isoprénoïdes, alcaloïdes terpéniques, **Ex** : Aconitine (diterpénique) de l'aconit.

-dérivés de l'acétate, **Ex** : Coniine de la ciguë.

Ils ne possèdent pas d'azote intra-cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale, quelques exemples de ces alcaloïdes sont indiqués dans la (Figure.6).

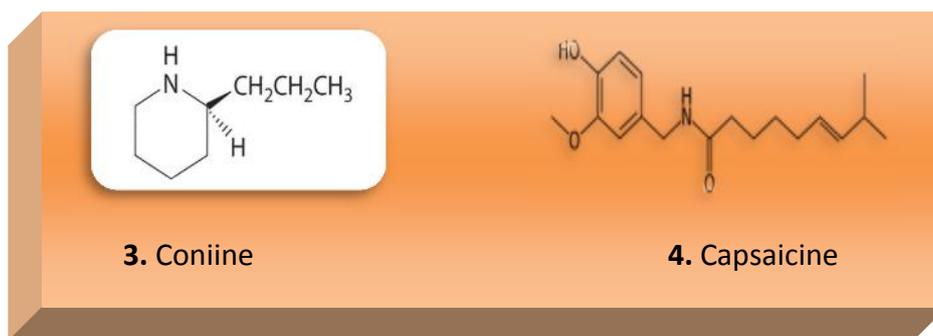


Figure.6 : Exemples de Pseudo-alcaloïde.

2.4.3. Proto alcaloïdes :

Amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, basiques, élaborés in vivo à partir d'acide aminé (Figure7).

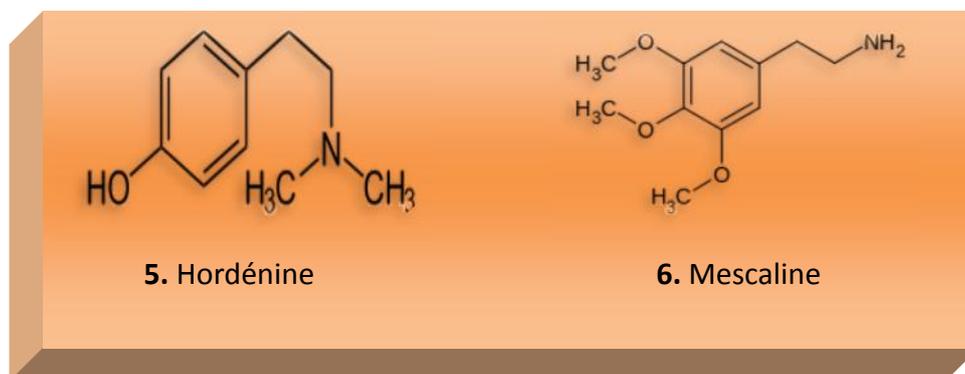


Figure.7: Exemples de Proto-alcaloïdes.

2.5. Propriétés biologiques des alcaloïdes :

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques, ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique

locale ou analgésique et narcotique [21], leurs propriétés sont généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques par exemple, céphéline (antifongique, antibactérien) émétine (amoebicide, antiprotozoaire, amibiase)[22].

2.6. Intérêt thérapeutique :

Les alcaloïdes ont un rôle important, comme principes actifs des médicaments, Ils sont utilisés soit tels quels, soit sous forme de dérivés plus actifs, ou manifestant des effets différents. Ils ont souvent servi de modèle pour imaginer de nouvelles molécules de synthèse. Par exemple la morphine reste le produit de référence des analgésiques (médicaments de la douleur). Son dérivé, la codéine (méthylmorphine), est un analgésique mais surtout un calmant de la toux. À la morphine se rattachent également des alcaloïdes hémisynthétiques comme la naloxone, utilisée dans le traitement des toxicomanies [27].

Les propriétés médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) [28], Le groupe des alcaloïdes de l'ergot de seigle conserve une place privilégiée avec l'ergotamine, son dérivé dihydrogène, vasodilatateur cérébral indiqué dans le traitement des migraines, et la bromocriptine, inhibiteur de la lactation, également prescrite dans certains types de stérilité [27].

3. Activités biologiques :

3.1. Activité antibactérienne :

➤ Définition :

Les antibiotiques sont des médicaments fabriqués à partir de cultures de micro-organismes ou sont entièrement synthétisés. Ils ont la propriété de tuer des bactéries (bactéricides) ou d'empêcher leur prolifération (bactériostatiques) [27].

Dans notre étude, six souches bactériennes ont été utilisées, afin de tester l'activité d'alcaloïdes totaux extraire à partir du champignon « Pleurote panicaut » vis-à-vis de ces souches.

3.1.2. Souches antibactérienne utilisées :

3.1.2.1. *Escherichia coli* :

E. coli, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. Coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou sepsis [30].



Figure.8 : *Escherichia coli*.

3.1.2.2. *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* [31]. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (sauf *S. aureus anaerobius*) ; il est habituellement disposé en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique (TSST-1) et des toxines exfoliatives. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau [32].

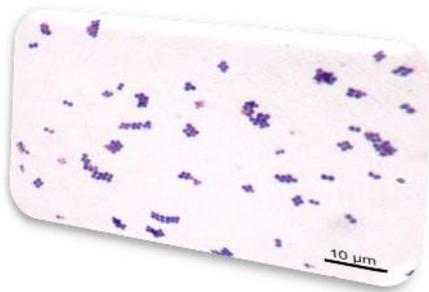


Figure.9 : *Staphylococcus aureus*.

3.1.2.3. Proteus sp :

Proteus est un bacille Gram négatif, présent dans l'intestin de l'homme .Ils est pathogène opportuniste. Notamment chez les individus hospitalises, cathétérismes ou présentant des anomalies des voies urinaires [33].

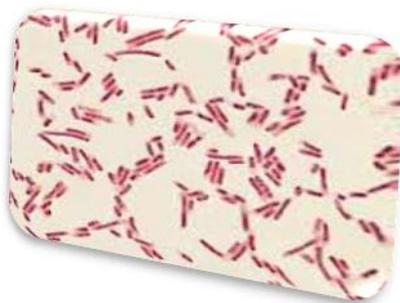


Figure.10 : *Proteus sp*

3.1.2.4. Listeria :

Le genre *Listeria* comporte 8 espèces dont l'espèce monocytogenes, pathogène pour l'homme et les animaux et l'espèce ivanovii, pathogène pour les animaux et rarement pour l'homme. *Listeria monocytogenes* est responsable d'une maladie touchant l'homme et les animaux (zoonose) appelée la listériose [34].

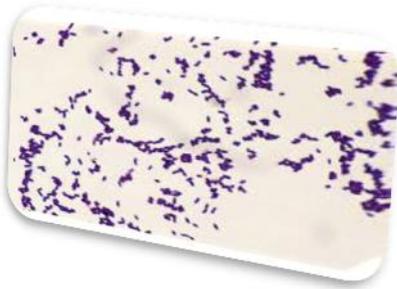


Figure.11: *Listeria*.

3.1.2.5. *Klebsiella pneumoniae* :

K. pneumoniae est une bactérie commensale de l'homme et des animaux ; elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies avec choc, ...) [35].



Figure.12: *Klebsiella pneumoniae*.

3.1.2.6. *Pseudomonas aeruginosa* :

Est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme que l'on peut retrouver dans les sols et les milieux aquatiques. Elle peut provoquer des infections pulmonaires chez des patients sous respirateur artificiel ou ceux souffrant d'affections chroniques telles que la mucoviscidose. Elle peut également provoquer des infections chez des sujets sains [36].



Figure.13 : *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Activité antifongique :

3.2.1. Définition :

Les antifongiques sont des substances qui détruisent les champignons responsables de mycoses, infection par des champignons microscopique (fongicides) ou qui empêchent leur croissance et leur multiplication (fongistatique).

Ils sont largement utilisés en agriculture pour lutter contre les champignons des végétaux sous la forme de sulfate de cuivre etc. Chez l'homme l'iode est souvent employé comme antifongiques pour lutter ou prévenir les candidoses cutanées [33].

Pour ce travail deux souches on été utilisées :

3.2.1.1. Chaetomium sp :

Espèces de Chaetomium sont ascomycètes et sont généralement trouvés dans le fumier, de la paille, du papier, des plumes d'oiseaux, les graines, les débris végétaux, le sol et l'air. Certains Chaetomium spp. Sont thermophile et neurotrophe dans la nature et sont parmi les champignons responsables Phaeohyphomycose chez l'homme, avec des présentations cliniques allant des abcès du cerveau, la péritonite, des lésions cutanées, onychomycose, pour mycoses profondes fatales [37].



Figure.14 : *Chaetomium spp.*

3.2.1.2. Trametes *sp* :

Trametes est un genre de champignons qui se distingue par un basidiocarpe de pileate, di- aux systèmes d'hyphes trimitic, spores non-dextrinoid lisses, et un hyménium habituellement sans véritable cystides hyménium [38].Le genre a une distribution à grande échelle et contient une cinquantaine d'espèces [39].



Figure.15 : *Trametes sp*

Partie
expérimentale



1. Matériels et méthodes :

1.1. *Pleurotus eryngii* :

Pleurotus eryngii communément appelée Pleurote du panicaut a été identifiée par Mr LOUNIS YOUSEF KHODJA, maître assistant « A » : laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et de L'activité Microbienne, Département de Biologie Appliquée, FSNV. Université des Frères Mentouri Constantine.

1.2. Récolte du Matériel:

Notre champignon a été récolté dans la région de son habitat naturel durant le mois de septembre et octobre 2015. La récolte est effectuée dans la région Ain Fakroun (wilaya d'Oum el bouaghi) au nord-est d'Algérie (Figure.16).



Figure.16: Zones de récolte.

1.3. Conservation du champignon :

Le matériel végétal *Pleurotus eryngii* est nettoyé, séché à 45°C, pulvérisé et les conservées [40].

1.4. Détection et caractérisation des alcaloïdes :

Les tests de caractérisation sont basés sur une extraction simple et rapide, le plus généralement, on précipite les alcaloïdes par des réactifs généraux des alcaloïdes.

Les réactifs généraux de précipitation sont fondés sur la capacité qu'ont les alcaloïdes de se combiner avec des métaux et des métalloïdes : bismuth, mercure, tungstène, iode... [41].

Toutefois selon Luhata. P [42] la présence des alcaloïdes n'est confirmée que lorsque chacun des réactifs donne un précipité. Dans notre étude nous avons préparé quatre réactifs : le tétraiodomercurate de potassium connu sous le nom de réactif Mayer (qui donne des précipité blanc-jaune), le tétraiodobismuthate de potassium, plus connu sous le nom de réactif Dragendorff (précipité rouge –orangée), le réactif Wagner (précipité rouge brique foncé) et le réactif Hager (précipité jaune) [40].

1.4.1. Préparation des réactifs :

Les réactifs ont été préparés comme suit [43]:

➤ **Réactif de Mayer :**

Chlorure de mercure 1.36g, iodure de potassium 5g compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

➤ **Réactif de Wagner :**

D'iode 1.27g, d'iode de potassium 2g, compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100ml.

➤ **réactif de Hager :**

Acide picrique 1.5g, compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

➤ Réactif de Dragendorff :

Il s'agit d'un mélange (v/v) de des solutions A et B et C.

-Solution A :

Nitrate de bismuth 1.7g, acide tartrique concentré 20g, compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

-Solution B :

Iodure de potassium 10g, compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

-Solution C :

Le mélange est ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique et son volume est ramené à 100 ml avec de l'eau distillée.

Après avoir mélanger les deux solutions A et B, on ajoute la solution C.

1.4.2. Préparation de la solution à analyser:

Introduire 5g de champignon séché et finement pulvérisée dans un erlenmeyer de 250 ml. Ajouter 25 ml d'acide sulfurique concentré H_2SO_4 dilué au 1/10 avec de l'eau distillée puis boucher. Agiter et laisser macérer 24 h à la température du laboratoire. Le macérant est filtré et lavé à l'eau de manière à obtenir 25 ml de filtrat [44].

1.4.3. Mise en évidence des alcaloïdes:

Introduire 1ml de filtrat dans 5 tubes à essais, y ajouter 5 gouttes de chacun des réactifs (Mayer, Dragendorff, Wagner et Hager), pour chaque tube à essai ajouter un réactif, et attendre 15 minutes [45].

1.5. Extraction des alcaloïdes :

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des Pleurote du panicaut sont obtenues par une extraction liquide- liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin [22].

➤ Première étape :

100g de champignon séché, sont finement broyés avec un broyeur électrique. La poudre obtenue est humectée par l'ammoniaque concentrée (NH₄OH) pendant 24h à température ambiante. Il est ensuite macéré dans le chloroforme à la température ambiante durant 48h.

➤ Deuxième étape :

La solution est filtrée sous vide, après la filtration, le filtrat (phase organique) est agité avec une solution aqueuse acidifiée (acide sulfurique) « H₂SO₄ » fortement diluée à 4%, les alcaloïdes se solubilisent dans la phase aqueuse sous forme de sels tandis que les impuretés neutres restent dans la phase organique. Il est indispensable d'épuiser la phase organique par l'eau acidifiée c'est -à- dire que l'opération est répétée autant de fois qu'il est nécessaire jusqu'à ce que la phase organique n'en contienne plus d'alcaloïdes (test de Dragendorff).

➤ Troisième étape :

La solution aqueuse de sels d'alcaloïdes est alcalinisée par une solution d'ammoniaque concentrée jusqu'à PH =10, permettant ainsi aux alcaloïdes, de passer de la forme sel en forme organique. Le traitement de la phase aqueuse par une base entraîne le relargage de l'alcaloïde qui est alors extrait par le chloroforme. Reprendre la même opération jusqu'à épuiser la phase aqueuse en faisant repasser tous les alcaloïdes en phase organique. L'épuisement de la phase aqueuse en alcaloïde est vérifié par un test de Dragendorff.

➤ Quatrième étape :

Le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est décanté, séchée par du sulfate de magnésium et évaporé par l'évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu est la somme des alcaloïdes totaux (AT) (Figure 17).

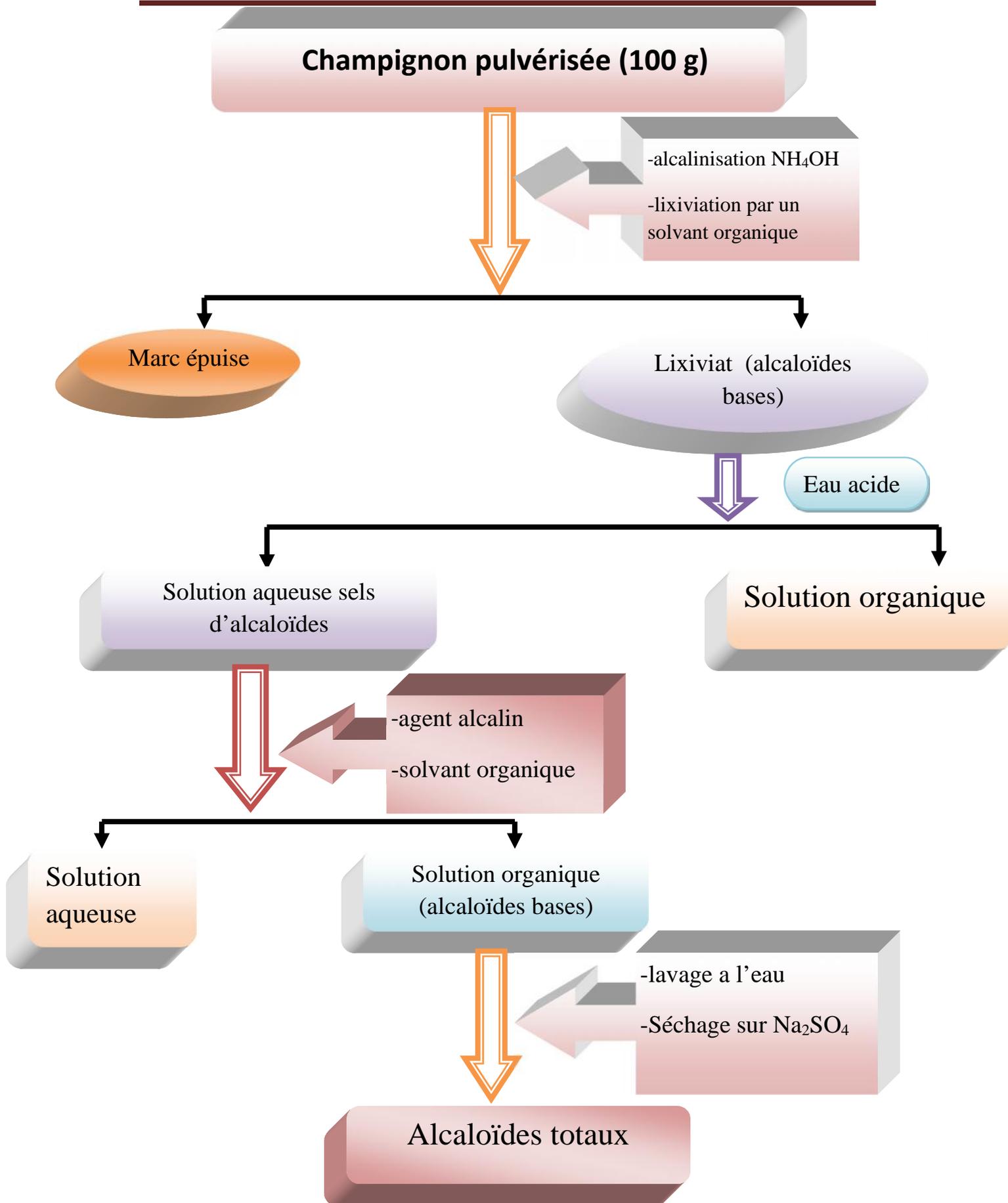


Figure 17 : Schéma représente les étapes de l'extraction des alcaloïdes.

1.6. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) :

La chromatographie Analytique a été utilisée pour vérifier la présence des alcaloïdes dans l'extrait. Des plaques CCM prêtes à l'emploi, de gel silice 60F₂₅₄ - Merck sur support d'aluminium de marque Macherey-Nagel. La phase mobile utilisée est Chloroforme / Méthanol : (10ml /25µl).

Après dissolution de l'extrait dans le chloroforme nous déposons 250µ de la solution (afin de disposer d'une concentration suffisante de produit), à l'aide d'une micropipette sur la plaque à 1 cm du bord inférieure de la plaque de base. Ce dernier est ensuite mis placées dans la cuve contenant la phase mobile. Après migration de solvant le chromatogramme est retiré, séché et pulvérisé avec le réactif de Dragendorff jusqu'à l'apparition des spots colorés, selon la méthode de Kurt [46].

1.7. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'étude de l'activité antibactérienne du notre extrait contenant alcaloïdes totaux a été effectuée au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université des Frères Mentouri Constantine.

1.7.1. Matériels bactériologiques utilisés :

Nous avons utilisé quatre souches référenciées provenant, de l'institut Pasteur à Alger. Les deux autres souches proviennent de prélèvements malades du CHU.

-*Escherichia. Coli* (ATCC 29322) « Gram négatif ».

-*Klebsiella Pneumoniae* (ATCC 700603) « Gram négatif ».

-*Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC) « Gram négatif ».

-*Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923) « Gram positive ».

-*Listeria* « Gram positif ».

-*Proteus* « Gram négatif ».

7.2. Test de l'activité inhibitrice :

La méthode de diffusion, appelé également méthode des disques, a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des (AT) [47].

1.7.2.1. Préparation des disques et Stérilisation du matériel :

Nous avons stérilisé à l'autoclave à 121° C pendant 15 à 20 minutes :

- L'eau distillée et les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes (inoculum), ainsi que dans la préparation des dilutions de nos échantillons.

Nous avons aussi stérilisé les disques en papier Wattman N° 1 (6 mm de diamètres) après enrobage dans du papier Aluminium.

1.7.2.2. Milieu de culture :

Mettre la gélose Mueller – Hinton au bain marie (100°); une fois fondue la maintenir à 45° C jusqu'à utilisation coulée en boîtes de pétri et séchée avant l'emploi.

7.2.3. Préparation des l'inoculum :

Dans la zone septique du bec bunsen et à partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement gélose MH, nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester puis nous avons suivi les étapes suivantes :

- Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MC Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau distillée stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15min qui suivent la préparation de l'inoculum.

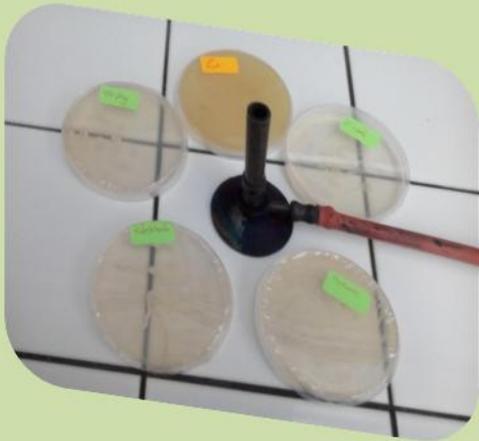
1.7.2.4. Ensemencement et dépôt des disques :

Nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis nous l'avons essoré en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, ensuite nous l'avons frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées, cette opération a été répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, l'ensemencement s'est achevé en passant l'écouvillon à périphérie de la gélose.

Parties expérimentales

Des disques de papier Wattman (6 mm de diamètres) sont imprégnés ensuite d'une petite quantité du notre extrait (environ 20 μ l) de concentration 30mg/ml puis déposés sur la surface de la gélose par une pince stérile.

Les boîtes de pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24h.



Bactéries dans la gélose nutritive



Bactéries en suspension



Dépôt d'extrait



Incubation

Figure .18: Les différentes étapes de l'activité antibactérienne.

1.7.2.5. Lecture des antibiogrammes

Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 10 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée [33].

1.8. Activité Antifongique :

La même procédure que l'activité antibactérienne a été suivie pour tester l'activité Antifongique des deux souches fongiques *Chaetomium.ssp* et *Trametes.sp* qui ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournis par le laboratoire de parasitologie (CHU). Le milieu culture utilisé pour le repiquage est OGA. La durée d'incubation de l'antifongigramme est de 48h [33].

résultats

et

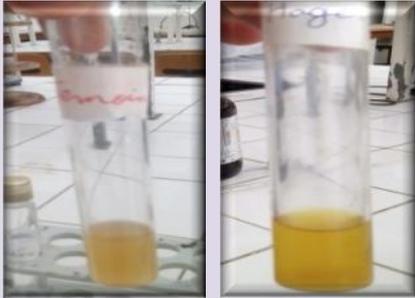
discussion



1. Mise en évidence des alcaloïdes:

La présence des alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité.
Les résultats sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1 : résultat de recherche des alcaloïdes chez le *Pleurotus eryngii*.

Espèce	réactif	Réactions et précipitation	Photographié des résultats	La couleur
<i>Pleurotus eryngii</i>	réactif DragenDorff	++++		Rouge -orange
	réactif Mayer	++++		blanc-jaune
	Réactif Wagner	++++		Rouge brique foncé
	réactif Hager	++++		Jaune

Résultats et discussion

Les Résultats du *screening* des alcaloïdes sont classés en fonction des différents critères d'observation, entre autre :

-Réaction très positive: ++++

-Réaction douteuse positive: +

-Réaction positive: +++

-Réaction négative: -

-Réaction moyennement positive: ++

Les résultats des tests de caractérisation pour les alcaloïdes avec les réactifs, définis dans le tableau 1 indiquent une forte présence d'alcaloïdes dans le champignon *Pleurotus eryngii*.

2. Extraction des alcaloïdes totaux:

2.1. Détermination des rendements d'extraction :

Compte tenu des résultats positifs des tests, nous avons réalisé une extraction liquide-liquide des alcaloïdes. Le rendement obtenu lors de l'extraction est de 3% pour 100g de champignon utilisé (Figure.19) (Tableau 2).



Figure.19: Extrait sec obtenu après l'évaporation.

Tableau 2 : rendement de l'extraction.

	Poids d'extrait sec	correspondant
<i>Pleurotus eryngii</i>	3g	3%

Résultats et discussion

Nous rappelons que 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).

Le rendement obtenu lors de l'extraction des alcaloïdes totaux est très intéressant par comparaison aux différents travaux menés sur l'extraction des alcaloïdes [48-49].

Il convient de noter que les extraits d'alcaloïdes totaux ne contiennent pas uniquement des alcaloïdes; ils peuvent en effet renfermer d'autres composés, tels que les esters acide gras, les stérols,..... [48].

2.2. Chromatographie sur couche mince :

Pour avoir une évaluation qualitative de la composition chimique de notre extrait, a été réalisée par chromatographie analytique sur couche mince en utilisant plusieurs systèmes d'éluion à différentes polarités. Les différents spots présents sur le chromatogramme ont été délimités sous lumière UV à 254nm. Les couleurs des spots ont été observées après révélation par le réactif de DragenDorff (Figure 20).



Figure 20 : Figure représente les deux chromatogrammes après la révélation par UV (1) et l'autre par réactif DragenDorff (2).

Les résultats du CCM révèlent la richesse de l'extrait avec la phase mobile: Chloroforme /Méthanol (10ml/25µl).

Résultats et discussion

D'après les chromatogrammes, notre extrait contient plusieurs produits, parmi ces produits ceux qui ont coloré, dont la révélation par le réactif de DragenDorff indique la présence des AT. Nous observons deux spots colorés majoritaire composés 1et 2, qui seront facile à séparer par une chromatographie sur colonne.

3. Tests d'activités biologiques :

3.1. Tests d'activités antibactériennes :

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des (AT) par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélose (Muller Hinton) [47].

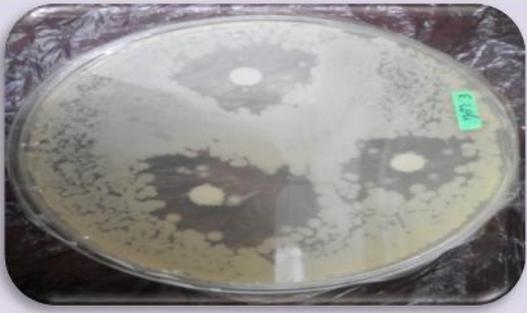
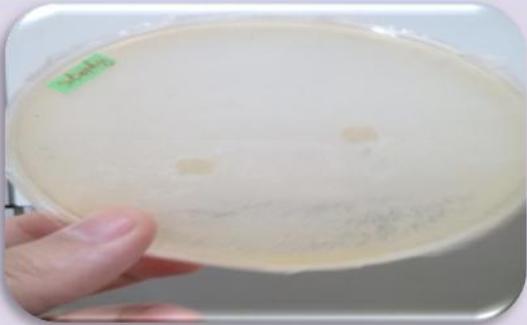
L'activité antibactérienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de six germes pathogènes (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria*).

Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm des zones d'inhibition atteintes avec les différentes souches étudiées.

Tableau 3: Résultats de l'activité antibactérienne.

Les souches	Diamètres (mm)	Les photos
<i>Listeria</i>	28	

Résultats et discussion

<i>E. coli</i>	35	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	
<i>Staphylococcus Aureus</i>	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	
<i>Proteus</i>	-	

(-) : Absence d'activité antibactérienne.

Résultats et discussion

L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donnée dans la littérature scientifique [50], ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice : $> 30\text{mm}$
- Fortement inhibitrice : $21\text{mm}-29\text{mm}$
- Modérément inhibitrice : $16\text{mm}-20\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice : $11\text{m}-16\text{ mm}$
- Non inhibitrice : $D < 10$

Les diamètres de la zone d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes (Figure.21).

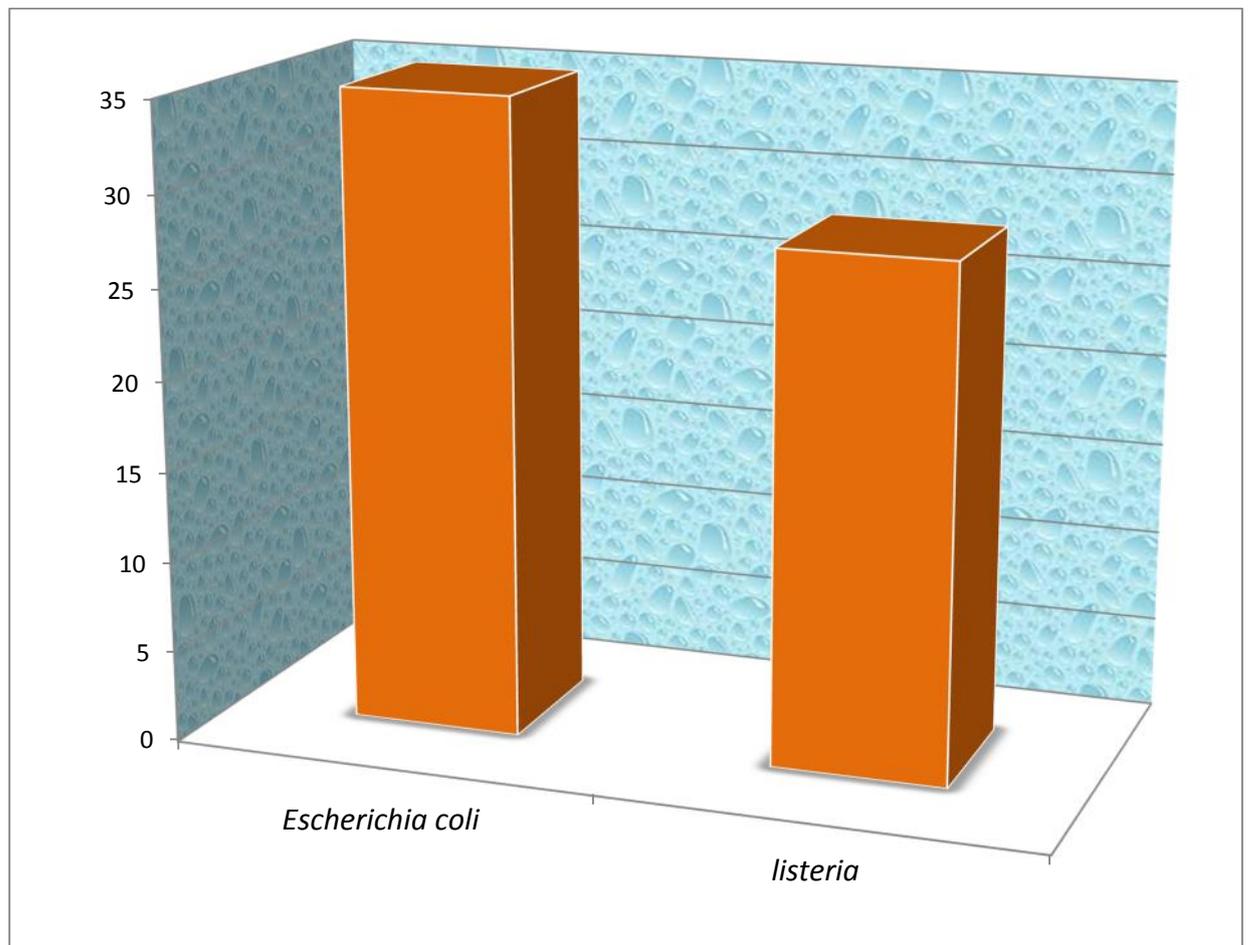


Figure.21 : Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait contre *E. coli* et *Listeria*.

Résultats et discussion

Les résultats indiquent que l'extrait des alcaloïdes présente une Très forte inhibition vis-à-vis la souche bactérienne *E. coli* (gram négatif) et une forte activité contre la bactérie *Listeria* (gram positif), avec des zones d'inhibition très claire. Le pouvoir de cette activité est représenté par les diamètres suivants: **D** (*E. coli*)=35mm et **D** (*Listeria*)=28mm, mais avec les autre souches (*Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae*) aucune activité antibactérienne n'a été observée. Selon la littérature scientifique D'autre paramètre peuvent influencer l'efficacité de l'extrait des alcaloïdes tels que [50] :

- la concentration (peut être exagérée dans les disques).
- Le degré de pureté.
- La toxicité elle-même.

3.2. Test d'activités antifongique :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antifongique en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible, l'effet du produit antifongique sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

Le tableau ci-dessous reporte les résultats de l'activité antifongique des (AT) contre les deux souches fongiques *Trametes st* et *Chaetomium rt*.

Tableau 4: Résultats de l'activité antifongique.

Les souches	Diamètre (mm)	Les photos
Trametes st	-	

Résultats et discussion

Chaetomium <i>rt</i>	-	
-----------------------------	---	--

(-) : Absence Activité antifongique.

D'après ces résultats on peut conclure que notre extrait n'a pas un pouvoir antifongique puissant contre (Trametes *st* ; Chaetomium *rt*).

conclusion



Conclusion générale

Dans ce travail, notre intérêt s'est porté sur une étude des alcaloïdes du champignon *Pleurotus eryngii* connue sous le nom du Pleurote du panicaut du nord-est Algérie. A coté des plantes médicinales les champignons représentent une source inépuisable de composés naturel bioactifs, d'après la recherche bibliographique notre champignon est classé parmi les espèces les plus comestible et il présente des intérêts thérapeutiques très intéressants.

Afin de mettre en évidence la présence des alcaloïdes dans l'espèce *Pleurotus eryngii*, des testes ont été réalisés avec quatre réactifs spécifiques du criblage des alcaloïdes. Les résultats indiquent une forte présence des alcaloïdes dans notre échantillon.

Après avoir réalisés ces testes, une extraction liquide-liquide des alcaloïdes totaux a été effectuée sur 100g du champignon, nous avons obtenu une quantité très intéressante d'extrait sec qui est 3g dont le rendement est de (3 %).

La chromatographie analytique sur couche mince de l'extrait obtenu, nous confirme la présence des alcaloïdes dans *Pleurotus eryngii*, par l'apparition des différents spots minoritaires et majoritaires colorés avec le réactif de Dragendorff.

En fin nous avons étudié le pouvoir antibactérien et antifongique du notre extrait contenant les alcaloïdes, pour cela nous avons utilisé six souches bactériennes (*Escherichia. Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, *Listeria*, *Proteus*) et deux souches fongiques (*Chaetomium.ssp*, *Trametes.sp*). Les résultats indiquent que l'extrait des (AT) présente une activité inhibitrice vis-à-vis deux souches bactériennes seulement : *E. coli* (gram négative) et *Listeria* (gram positive), et aucune activité antifongique contre (*Trametes sst* ; *Chaetomium rt*).

Les références bibliographiques

Les références bibliographiques

[1] : **Alain T. (2007)**. La mycothérapie - propriétés médicinales des champignons. France., Le courrier du livre.196p.

[2] : <http://www.natetbiodistri.com/Files/27893/153007266745723.pdf>.Consulté le : 19/03/2016.

[3] : <http://www.medicalmushrooms.net/pleurotus-eryngii>. Consulté le : 20/03/2016

[4] : <http://www.phytobiotech.in/brochure/pleurotus.pdf>. Consulté le : 23/03/2016

[5] : **Adegoke, E.A et al. (1968)**. Studies of Nigerian medicinal plants. I. A preliminary Survey of plants alkaloids. *Journal of West african Science Association* **13** :13-33.

[6] : **Gidado A et al. (2005)**. latifolia leaves extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *Am J Biol.* **4**: 91-3.

[7] : **Ouattara YJ et al. (2002)**. Activité hépatoprotectrice de plantes de la pharmacopée africaine vis-à-vis d'un hépatopathie expérimentale provoquée chez la souris NMRI *Rev Sci Tech Sci Santé.* 25.

[8]:http://www.med.univmontp1.fr/enseignement/cycle_1/pcem2/mobase/mb7_bio_m ed/ressources_locales/parasitomyco/pcem2_mb7_parasito-m1.pdf.consulté:25/3/2016.

[9] : **FAO. (1998a)**. *Principales productos forestales no madereros en Chile*, by J. Campos. Santiago,Chile.

[10] : **Prance, G. (1984)**. The use of edible fungi by Amazonian Indians. *Advances in EconomicBotany.*, **1**: 127–139.

[11] :<http://mycologia34.canalblog.com/archives/2016/04/08/33639065.html>.Consulté le : 15/03/2016.

Les références bibliographiques

[12] : <http://www.abebooks.fr/rechercher-livre/titre/nouveau-dictionnaire-netymologique/> auteur/dauzat-dubois-mitterand/ Consulté le : 23/03/2016.

[13] : **Agric J et al. (1998)**. Flavor Compounds in King Oyster Mushrooms *Pleurotus eryngii* ; Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, Republic of China, and Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan. 46(11).p4587-4591.

[14] :http://www.iodde.org/public/bulletins/Fiches_Biodiversifiantes/CPIE_MO_Fiche_biodiversifiante_n_6_Le_pleurote_du_panicaut.pdf. Consulté le : 15/03/2016.

[15] : **Richter, G. (1988)**. Métabolisme des végétaux – Physiologie et biochimie. *Presses polytechnique et universitaires romandes, Lausanne, 1993* (Traduction française de Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

[16] : **Cordell G.A. (1981)**. Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach, Wiley Interscience, *New York, NY*, p 1981. 1055.

[17] : **Kirrmann A et al. (1975)**. Chimie organique fonctions complexes, *tome 3, éd. Librairie Colin. Paris. p:197-199.*

[18] : **Vallet A. (1996)**. Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par agrobacterium tumefaciens, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus lacunaires, Mémoire D.E.A. Université de Picardie Jules Vienne. 1 – 32.

[19] : **Nultsch W. (1969)**. Botanique Générale, *éd. Louis Pasteur, 319-320.*

[20] : **Hurabielle M et al. (1986)**. Abrégé de matière médicale, *tome 2, éd. Masson, 256-266.*

[21] : **Bruneton J. (1993)**. Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation. *Lavoisier. Paris. p.266-285-2ème édition.*

Les références bibliographiques

[22] : Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, 3ème édition, éd. Technique et Documentation .783-1086.

[23] : KALLA A. (2012). Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *ituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Mémoire de Doctorat. L'université Mentouri – Constantine.31-32p.

[24] : محمد السيد هيكل ع. عبد الرزاق عمر (1993) النباتات الطبية و العطرية –كيمياؤها-انتاجها-فوائدها الطبعة الثانية منشآت المعارف الإسكندرية 13-134.

[25] : <https://fr.scribd.com/doc/182628326/Metabolisme-Secondaire>. Consulté le : 28/03/2016.

[26] : Roberts M, F. et al. (1998). Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. the centre sur pharmacegnesy. university of London. *Plunem press New York*. (186) : p 1-6.

[27] : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloïdes/> Consulté le : 22/03/2016.

[28] : Kanoun K. (2010). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen Honaine. Mémoire Magister. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen), p96.

[29] : Boutiti A. (2006). Étude phytochimique de l'espèce (*Globularia alypum* L). mémoire de Magister. Université de Constantine 1 ; 40-50-51p.

[30] : Bremer, H. et al. (2008). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates, *EcoSal Plus* 2008; doi:10.1128/ecosal.5.2.3.

[31] : Becker, K et al. (2004). Evaluation of different methods to detect methicillin résistance in small-colony variants of staphylococcus aureus. j. *Clin Microbiol* 42(3) :1277-1279.

Les références bibliographiques

[32] : Kluytmans, J et al. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* **10(3)**:505-20.

[33] : <http://sante.lefigaro.fr/traitement/antifongiques/définition>. Consulté le : 08/04/2016.

[34] : <http://www.anses.fr/Documents/MIC2003sa0362.pdf>. Consulté le : 15/04/2016.

[35] : Réseau A, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2001 – Résultats. Editions InVS, 2003, 84 p

[36]: Stover CK, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;**406**:959-64

[37] : Guarro A., J. et al. (1986). The ascomycete genus *Chaetomium*. *Beih. Nova Hedwigia* **84**:1–162.

[38] : Ryvarden L. (1991). "Genera of polypores: *Nomenclature and taxonomy*." *Syn. Fung.* **5**: 1–363.

[39] : <http://www.slideshare.net/fitolima/dictionary-of-fungi-kirk-et-al-2008-10a-edicao> .Consulté le : 09/04/2016.

[40] : Zhaohui.xue et al. (2015). Structure Identification of Triterpene from the Mushroom *Pleurotus eryngii* With Inhibitory Effects Against Breast Cancer. *Plant foods hum Nutr.* **70(3)**:291-6.

[41] : Bruneton J. (1993) ; Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} édition lavoisier.

Les références bibliographiques

[42] : **LUHATA. P. (2008)**. Etude Chimique de l'espèce *Jacobinia Carnea*. Université de Lubumbashi - Recherche en phytothérapie. p 35.

[43] : **Jean A. (2010)**. Purification et caractérisation chimique et biologique partielle des principes actifs des feuilles de *Pechia Madagascariensis*. Be a Master of Disaster. Faculté des sciences Tana(Madagascar) – DEA en Biochimie appliquées aux sciences médicales 2010. 1-2p.

[44] : **Benkkoum Y. (2013)**. Etude phytochimique et biologique de la plante « *santolina rosmarinifolia* » .mémoire de master.63-68p.

[45] : **Abbah J et al (2010)**. Phrnacological Evidence Favouing the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy : Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 127,85-90.

[46] : **Bouzidi. A et al (2011)**. Analyse qualitative et quantitative des alcaloïdes totaux des graines de *Datura stramonium L.* Université Ferhat Abbas, Sétif, p84.

[47] : **Rahal K. (2005)**. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale .4^{eme} édition .85p.

[48] : **BADIAGA M. (2011)**. Etude Ethnobotanique, Phytochimique Et Activites Biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une Plante Médicinale Africaine Récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. p105-110.

[49] : **René T. (1950)**. Alcaloïdes de L'erythropleom. Thèse de Doctorat. Université de Bruxelles. Belgique. p23.

[50] : **Mutai et al (2009)**. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology* **123** ; 143–148.

Annexe

Annexe :

Les différents systèmes solvants utilisé pour la CCM gel de silice :

	Système d'éluion utilisé pour la CCM	Volume de systèmes solvants
S1	Chloroforme/Méthanol	(4.5ml/0.5ml)
S2	D'éther D'éthylique/Méthanol	(4ml/1ml)
S3	Chloroforme/Méthanol	(5ml/3gouttes)
S4	Chloroforme/D'éthanol	(5ml/2gouttes)
S5	Méthanol/ Chloroforme/Ammoniaque	(8ml/4ml/3gouttes)
S6	Méthanol/ Chloroforme/Ammoniaque	(8ml/2ml/3gouttes)
S7	Chloroforme/ Méthanol	(4ml/1ml)
S8	Chloroforme/ Méthanol	(5ml/2gouttes)
S9	Toluène/Acétate D'éthyle/ Ethanol	(6ml/3ml/1ml)
S10	Chloroforme/ Méthanol	(10ml/1ml)
S11	Chloroforme/ Méthanol/L'eau Distillée	(6.5ml/3.5/1gouttes)
S12	: Chloroforme/Acétone	(9.5/0.5)
S13	Toluène / Acétate D'éthyle/ Ethanol	(6ml/3ml/1ml)

Résumé :

Pleurotus eryngii aussi appelée Pleurote du panicaut, est un champignon largement cultivé, reconnue par leur richesse nutritif, et par ses propriétés curatives particulières bénéfique pour la santé humaine, a la lumière de ces donnés, nous avons choisi de rechercher les alcaloïdes dans *Pleurotus eryngii* du nord-est d'Algérie. Ces substances sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale.

Après avoir récolté le matériel, un criblage des alcaloïdes a été effectué, dont les résultats indiquent une forte présence des alcaloïdes dans notre champignon. A l'issue du screening, nous avons réalisé une extraction liquide-liquide des alcaloïdes du 100g de l'espèce *Pleurotus eryngii*, qui a donné 3g de produit sec contenant des alcaloïdes totaux. L'extrait obtenue a montré une activité antibactérienne intéressant contre les deux bactéries *E. coli* (gram négative) et *Listeria* (gram positive), et aucune activité antifongique contre (*Trametes st* ; *Chaetomium rt*).

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, alcaloïdes, extraction, activite antibacterienne, activite antifongique.

المخلص:

Pleurotus eryngii المسمى كذلك *Pleurote du panicaut* هو فطر واسع الزراعة يعرف بغناه و خصائصه العلاجية الخاصة و المفيدة لصحة ء هذه المعطيات القلويات في *Pleurotus eryngii* بشمال شرق الجزائر. هذه المواد من بين أهم المنتجات الطبيعية بسبب خصائصها البيولوجية وتنوعها البنوي.

نفذت غربلة القلويات في حين النتائج تشير وجود قوي للقلويات في فطرنا

- سائل للقلويات ل100 *Pleurotus eryngii*

3 الذي يحتوي على القلويات الإجمالية المستخلص المتحصل عليه اظهر نشاط مضاد للبكتيريا *E. Coli* (gram négative) و *Listeria* (gram positive) ولا أي نشاط مضاد للفطريات (*Trametes st ; Chaetomium rt*).

الكلمات المفتاحية: *Pleurotus eryngii* القلويات الاستخلاص نشاط مضاد للبكتيريا نشاط مضاد للفطريات.

Abstract :

Pleurotus eryngii, is a widely cultivated mushroom, recognized by their nutrient richness, and its special healing properties beneficial to human health, in the light of these data, we chose to look alkaloids in *Pleurotus eryngii* of north-east of Algeria. These substances are among the most important groups of natural products, because of their biological properties and their structural diversity.

After collecting the fungus, screening alkaloids was performed, the results indicate a strong presence of alkaloids in our mushroom. After the screening, we performed a liquid-liquid extraction of alkaloids 100g of *Pleurotus eryngii* species, which gave 3g of dry product containing total alkaloids. The extract obtained showed antibacterial activity against both bacteria *E. coli* bacteria (gram -) and *Listeria* (gram +) and no antifungal activity against (*Trametes* st; *Chaetomium* rt).

Keywords: *Pleurotus eryngii*, Alkaloids, Extraction, Antibacterial activity, Antifungal activity.

Etude extractive des alcaloïdes et évaluation de leur l'activité antimicrobienne du champignon *Pleurotus eryngii*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé

Résumé :

Pleurotus eryngii aussi appelée Pleurote du panicaut, est un champignon largement cultivé, reconnue par leur richesse nutritif, et par ses propriétés curatives particulières bénéfique pour la santé humaine, a la lumière de ces donnés, nous avons choisi de rechercher les alcaloïdes dans *Pleurotus eryngii* du nord-est d'Algérie. Ces substances sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale.

Après avoir récolté le matériel, un criblage des alcaloïdes a été effectué, dont les résultats indiquent une forte présence des alcaloïdes dans notre champignon. A l'issue du screening, nous avons réalisé une extraction liquide-liquide des alcaloïdes du 100g de l'espèce *Pleurotus eryngii*, qui a donné 3g de produit sec contenant des alcaloïdes totaux. L'extrait obtenue a montré une activité antibactérienne intéressent contre les deux bactéries *E. coli* (gram négative) et *Listeria* (gram positive), et aucune activité antifongique contre (*Trametes st* ; *Chaetomium rt*).

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, alcaloïdes, Extraction, Activité antibactérienne, Activité antifongique

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr BENSEGUENI A **Pr. Université des Frères Mentouri Constantine.**
Rapporteur : Mme. TENIOU S **M.A.A. Université des Frères Mentouri Constantine.**
Examineurs : Mme. BOUTAGHANE N **M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine.**

Date de soutenance : 14/06/2016

