



الجمهورية 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 العلوم الطبيعية والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية و 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 :

Extraction et purification des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotuseryngii* et évaluation de leur activité antioxydante.

Présenté et soutenu par : DJAFAR Imen
MENZRI Imene

Le : 22/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mr. Bousba.B	M.C.B – UFM Constantine.
Encadreur :	Mr. Bouanimba.N.	M.C.B – UFM Constantine.
Examinatrice :	Mme.Teniou.S	M.A.A – UFM Constantine.

Année universitaire
2016 – 2017

Dédicace

À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie

*ma mère **Yamina Saadi** qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude,*

pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

*À la source de ma volonté à mon chère père **Abdelrachide** qui m'a appris le sens de la*

persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

Je ne cesserais jamais de remercier mon dieu pour m'avoir donné une mère et un père comme

vous. Puisse dieu vous protéger inshallah.

*À la joie et le bonheur de ma vie à mon chère époux **Brahimi Sofiane** « merci pour votre soutien*

et ta présence toujours à mes côtés ».

*À mes chers frères et sœurs : **Abdelghani, Mohamed Islam, Chaima et Djouhaina***

*À toutes mes amies « **Imen, Houda, Intissar, Khawla, Safa.....** »*

À toute ma famille et tous ceux qui m'ont consacré temps, patience, et conseils surtout dans les

moments difficiles.

À tous mes professeurs du primaire jusqu'au niveau universitaire.

*Sans oublier mes collègues de la promotion 2016/2017, Master2 **Biochimie moléculaire et santé***

Et tous ceux qui ont un jour compté dans ma vie.



Dédicace

*À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père **Tahar** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie;*

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

*À mes sœurs et À mes frères **Manel Ibtihal Lojaine ;Seif Eddine Mohamed Islam** A toute ma famille pédagogique -*

A tous mes enseignants de l'université de Frères Mentouri Constantine I

A mes collègues de la promotion de master "Biochimie Moléculaire et santé"

A tous les membres du laboratoire de Biochimie de l'université de Frères Mentouri

À toute ma famille de près ou de loin

À toutes mes amies

À tous ceux qui me connaissent

Je dédie ce modeste travail



Imene Menzri

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie bibliographique

1-La mycologie.....	2
2-Les champignons.....	2
2-1-Définition.....	2
2-2-Les champignons supérieurs et leur divisions.....	3
2-3-Potentiel thérapeutique générale des champignons supérieurs.....	3
3-Présentation de champignon <i>pleurotus eryngii</i>	4
3-1-Définition.....	4
3-2- Classification.....	4
3-3-Les caractéristique.....	5
3-4- Répartition géographique.....	6
3-5-Utilisation en médecine traditionnelle.....	7
3-6-L'intérêt thérapeutique de <i>Pleurotus eryngii</i>	7
4- Les métabolismes secondaires.....	8
4-1-Définition.....	8
4-2-Relation entre les métabolismes primaire et secondaire.....	8
4-3-Utilisation.....	8
4-4-Classification des métabolismes secondaires.....	9
4-4-1-Les composés phénolique.....	9
4-4-1-1- Les acides phénolique.....	10
4-4-1-2-Les flavonoïdes.....	11
4-4-1-3-Les coumarines.....	13
4-4-1-4-Les tannins.....	13
4-4-1-5-Les anthocyanes.....	14
4-4-1-6-Les lignanes.....	15

4-4-2-Les terpénoïdes.....	15
4-4-3-Les alcaloïdes	16
4-4-4-Les hétérosides.....	17
4-4-5-Les saponosides.....	18
5-Activité antioxydante	19
6-recherches antérieures sur le champignon « <i>Pleurotus eryngii</i> »	20

Partie Matériel et méthode

1-Matériel fongique.....	23
1-1-Identification de champignon :.....	23
1-2-Récolte de champignon.....	23
2-Extraction.....	24
2-1-Préparation des extraits.....	24
2-2-Détermination de rendement.....	26
3-L'activité antioxydante.....	26
3-1-Principe de test DPPH.....	26
3-2-Protocole.....	27
3-3-Expression des résultats.....	28
4-La chromatographie sur couche mince	28
4-1-Définition.....	28
4-2-Principe.....	28
4-3-Mode opératoire	29
4-4-Détermination de rapport frontal RF.....	31
5-Chromatographie sur colonne.....	31
5-1-Définition.....	31
5-2-Principe.....	32
5-3-Mode opératoire.....	32

Partie Résultats et discussion

1-Extraction et détermination des rendements.....	34
2-L'activité antioxydante (test au DPPH).....	35
3-Chomatographie sur couche mince.....	39

4-La chromatographie sur colonne.....42

Conclusion.....45

Les références bibliographiques

Résumé

Liste des figures

Figure 01 : Les différents parties d'un champignon supérieur.....	3
Figure 02 : <i>Pleurotus eryngii</i>	4
Figure 03 : Les caractéristiques de <i>Pleurotus eryngii</i>	6
Figure 04 : Carte mondiale de la répartition géographique de <i>Pleurotus eryngii</i>	7
Figure 05 : Acides hydroxycinnamiques (C6-C3).....	11
Figure 06 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1).....	11
Figure 07 : Noyau flavone.....	11
Figure 08 : Structure des coumarines.....	13
Figure 09 : Structure des tanins.....	14
Figure 10 : Structure de base des anthocyanidines.....	15
Figure 11 : Molécule isoprène.....	16
Figure 12 : Structure des quelques alcaloïdes.....	17
Figure 13 : La salicyline (exemple des hétérosides).....	18
Figure 14 : Squelettes des géninesstéroïdiques des saponosides.....	19
Figure 15 : Carte géographique de la zone de récolte «Hammam grouz-Oued Athmania».....	21.
Figure 16 : Chauffage à reflux.....	22
Figure 17 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction	23
Figure 18 : Réaction de test DPPH (2,2 diphényl -1-picryl hydrazyle).....	25
Figure 19 : Spectrophotomètre UV-Visible.....	26
Figure 20 : La cuve chromatographique.....	27
Figure 21 : Une lampe Ultra-violet (254 nm).....	28
Figure 22 : Révélation avec le réactif dragondorf.....	28

Liste des figures

Figure 23 : Le rapport frontal.....	29
Figure 24 : Révélation par l'acide sulfurique.....	31
Figure 25 : Histogramme du rendement de l'extraction.....	33
Figure 26 : Résultats de l'activité antioxydante(test DPPH) pour l'extrait (D.M).....	34
Figure 27 : Résultats de l'activité antioxydante(test DPPH) pour l'extrait (A.E)	34
Figure 28 : Histogramme de pourcentage de l'activité antioxydante pour l'extrait (A.E).....	37
Figure 29 : Histogramme de pourcentage de l'activité antioxydante pour l'extrait (D.M).....	37
Figure 30: Révélation des chromatogrammes (D.M et A.E) par lampe UV (254nm) (D.M et A.E) développées dans le système solvant (chloroforme/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V)	38
Figure 31: Révélation des chromatogrammes (D.M et A.E) par le réactif DragenDorff développées dans le système solvant (chloroforme/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V).....	38
Figure 32: Résultats de la séparation par C.C de l'extrait d'acétate d'éthyle révélé par l'acide sulfurique.....	40

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de <i>Pleurotus eryngii</i>	5
Tableau 02 : Propriétés thérapeutiques de <i>pleurotus eryngii</i>	8
Tableau 03 : Les phénols simples.....	10
Tableau 04 : Structure des principaux flavonoïdes.....	12
Tableau 05 : Classification des terpènes.....	16
Tableau 06 : Les différents systèmes solvants pour la CCM.....	28
Tableau 07 : Pourcentage des solvants utilisés pour la colonne.....	30
Tableau 08 : Les rendements d'extraits: acétate d'éthyle(A.E), dichlorométhane(D.M).....	32
Tableau 09 : Tableau récapitulatif des résultats de l'activité antioxydante.....	35
Tableau 10 : Les pourcentages de l'activité antioxydante d'extrait D.M et A.E.....	36
Tableau 11 : Regroupement finale des fractions et résultats de la séparation issue de la C.C.....	41

Liste des abréviations

A.E : Acétate d'éthyle.

C.C : Chromatographie sur colonne.

ChCl₃ : Chloroforme.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

C° : Degré Celsius.

D.M : Dichlorométhane.

DPPH : 2,2-diphényl- 1 –picrylhydrazyl.

EtOAc : Acétate d'éthyle.

F : Fraction.

FSNV : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

GPx : Glutathion peroxydase.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammoniaque.

R_f : Rapport frontal.

R% : Rendement en pourcentage.

SOD : Superoxyde dismutase.

V/V : Volume par volume.

% : Pourcentage.

%(AA) : Le pourcentage de l'activité antioxydante.

UV : Ultraviolet.



Introduction

Introduction

L'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux médicaments, l'apparition de virus mortels, les complications liées aux transplantations d'organes et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que les risques de toxicité associés à l'utilisation excessive des médicaments et des antibiotiques de synthèse, poussent les chercheurs à explorer différentes sources naturelles afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces, possédant une faible toxicité et ayant un impact mineur sur l'environnement.

Si les plantes ont longtemps été considérées comme la principale source de molécule active, depuis près d'un demi-siècle, les scientifiques s'intéressent de plus en plus aux champignons. Riches en métabolites secondaires, jusqu'alors peu étudiés, ils représentent en effet une source d'inspiration non négligeable dans la quête de nouveaux médicaments [1].

A cet effet le champignon *Pleurotus eryngii* communément appelé Pleurote du panicaut du nord-est Algérie retient d'avantage notre attention, ce champignon est un excellent comestible. C'est la meilleure des Pleurotes, il est même considéré comme l'un des meilleurs champignons, connu pour son bon goût, cette espèce est reconnue par leur richesse nutritive, et par ses propriétés curatives particulièrement bénéfiques pour la santé humaine [2-4]. Ceci révèle l'importance de réaliser une étude sur des métabolites secondaires provenant de l'espèce *Pleurotus eryngii*. C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif consiste en une étude sur le champignon *Pleurotus eryngii* et ses différentes activités antioxydantes. Cette étude est basée sur l'extraction et la purification des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotus eryngii* et l'évaluation de son activité antioxydante.

Cependant, l'analyse préalable des métabolites secondaires des *Pleurotus eryngii* nécessite des moyens souvent coûteux surtout face au nombre important du matériel végétal à étudier. En outre, des appareillages modernes comme HPLC, CPG, spectre d'absorption, spectre de masse etc...sont nécessaires. Dans le présent travail, une analyse simple et moins onéreuse est utilisée comme la CCM qualitative. Quelques substances standard disponibles telles que la dichlorométhane et l'acétate d'éthyle sont utilisées.

Les travaux que nous avons effectués sur notre champignon dans ce cadre sont rapportés dans les étapes suivantes :

Dans la première partie sont rapportées des études bibliographiques effectuées sur le *Pleurotus eryngii* et les différents types des métabolites secondaires, ainsi qu'une présentation des recherches antérieures réalisées sur le champignon *Pleurotus eryngii*, son extraction, et son activité antioxydante.

A la deuxième étape une extraction des métabolites secondaires a été effectuée en utilisant deux solvants d'extraction « Dichlorométhane et Acétate d'éthyle »

La troisième étape est consacrée à l'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits « Dichlorométhane et Acétate d'éthyle » de ce champignon par le piégeage du radical libre DPPH.

La quatrième étape montre la présence des métabolites secondaires dans les deux extraits par une chromatographie analytique sur couche mince.

Enfin une purification par chromatographie sur colonne a été réalisée sur l'extrait d'acétate d'éthyle.



Partie bibliographique

1-La mycologie :

La mycologie caractérise l'étude des champignons. Un mycologue étudie la taxinomie, la systématique des champignons de façon à hiérarchiser la classe des espèces fongiques. La mycologie est comme la botanique pour les plantes, seulement les champignons sont des organismes particuliers [5].

La mycologie est une science relativement récente. Cependant les champignons sont apparus depuis le début de la vie sur terre il y a environ 4,5 milliards d'années et la plupart datent du Crétacé et du tertiaire, dont on peut voir les vestiges dans certains fossiles et surtout dans l'ambre [6].

2-Les champignons :

2-1-Définition : Les champignons organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryote). Se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone, Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée. Les champignons dépourvus de pigment assimilateur (chlorophylle), ce qui les distingue profondément des organismes appartenant au règne végétal. Ils sont hétérotrophes, leur structure est constituée d'un système de filaments ou hyphes plus ou moins développés et ramifiés, appelé le thalle dont la paroi est particulièrement riche en résidus peptidopolyosidiques: cellulose, chitine et sucres [7].

Les champignons sont séparés en deux groupes: les champignons supérieures ou « macromycète » et les champignons inférieures ou « micromycètes » [8].

Dans notre étude simplifiée on s'intéresse aux champignons supérieurs.

2-2-Les champignons supérieurs et leur divisions :

Les macromycètes ou les champignons supérieurs sont des champignons dont le sporophore, organe de la fructification du mycélium à l'origine de la production de spores, est visible à l'œil nu. Ce sont pour la plus part basidiomycètes, caractérisés par la production de cellules spécialisées appelées bazides, c'est le cas des agaricacées. Plus rarement, il peut s'agir d'ascomycètes, caractérisés par la production de spores à l'intérieur d'asque (figure 01) [1].

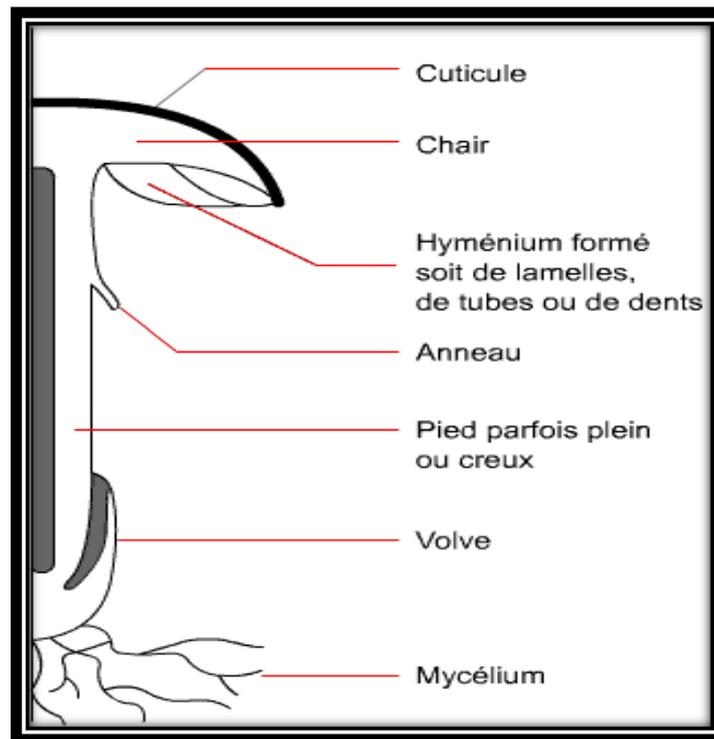


Figure 01 : Les différents parties d'un champignon supérieur.

2-3-Potentiel thérapeutique générale des champignons supérieurs:

Les champignons médicinaux ont été dans l'intérêt de beaucoup de chercheurs pour leurs effets pharmacologiques aussi bien que pour leur valeur nutritive. Parmi les champignons médicinaux, les basidiomycètes contiennent des polysaccharides et des complexes protéiques hautement puissants qui ont comme anti tumorale [9,10], et beaucoup d'extraits médicaux issus de carpophores de champignons supérieurs renforcent le système immunitaire. Les champignons supérieurs sont des agents bioactifs potentiels pouvant procurer des sources de médicaments aux populations [11].

Les champignons sont des sources supérieures de différents types de compléments alimentaires [10]. Et d'autre part l'application de champignons médicinaux est une nouvelle approche possible du traitement du diabète sucré comme : *Agaricusbrasilensis* et *Ganodermalucidum* [12], *Pleurotusflorida* [13], aussi traitement pour protéger contre l'hypercholestérolémie comme l'effet d'un extrait éthanolique du champignon de genre pleurotus (*Pleurotusostreatus*) [14].

3-Présentation de champignon *Pleurotuseryngii*

3-1-Définition :

Aussi nommé « cèpe oriental » ou encore « pleurote du panicaut », c'est un champignon doté d'une très bonne saveur, ce champignon de culture de la famille des pleurotes [15].

Il est un champignon comestible largement cultivé. La teneur en humidité est d'environ 90% dans les champignons frais. Il dispose d'un petit bouchon, mais sa tige est épaisse et charnue (figure 02). Déjà consommé par les Romains. Son habitat lignicole est souvent difficilement décelable, surtout quand les racines des ombellifères sur lesquelles il pousse sont profondément enterrées [16].



Figure 02 : *Pleurotuseryngii*.

3-2-Classification:

Pleurotuseryngii est un champignon basidiomycète du genre *pleurotus* selon la classification dans le tableau suivant [17] :

Tableau 01 : Classification de *Pleurotuseryngii* [17].

<u>Règne :</u>	<u>Fungi</u>
<u>Division :</u>	<u>Basidiomycota</u>
<u>Classe :</u>	<u>Agaricomycetes</u>
<u>Sous-classe :</u>	<u>Agacomycetidae</u>
<u>Ordre :</u>	<u>Agaricales</u>
<u>Famille :</u>	<u>Pleurotaceae</u>
<u>Genre :</u>	<u>Pleurotus</u>
<u>Nom binominal :</u>	<i>Pleurotuseryngii</i>

3-3-Les caractéristiques:

Pleurotuseryngii se reconnait par :

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.

Chair: blanche, ferme, épaisse. Odeur faible mais agréable, saveur douce.

Spores: blanches.

Période de cueillette : déjà présent dès le milieu du printemps et revenant jusqu'à la fin de l'automne si les températures ne sont pas trop basses (figure 03) [17].

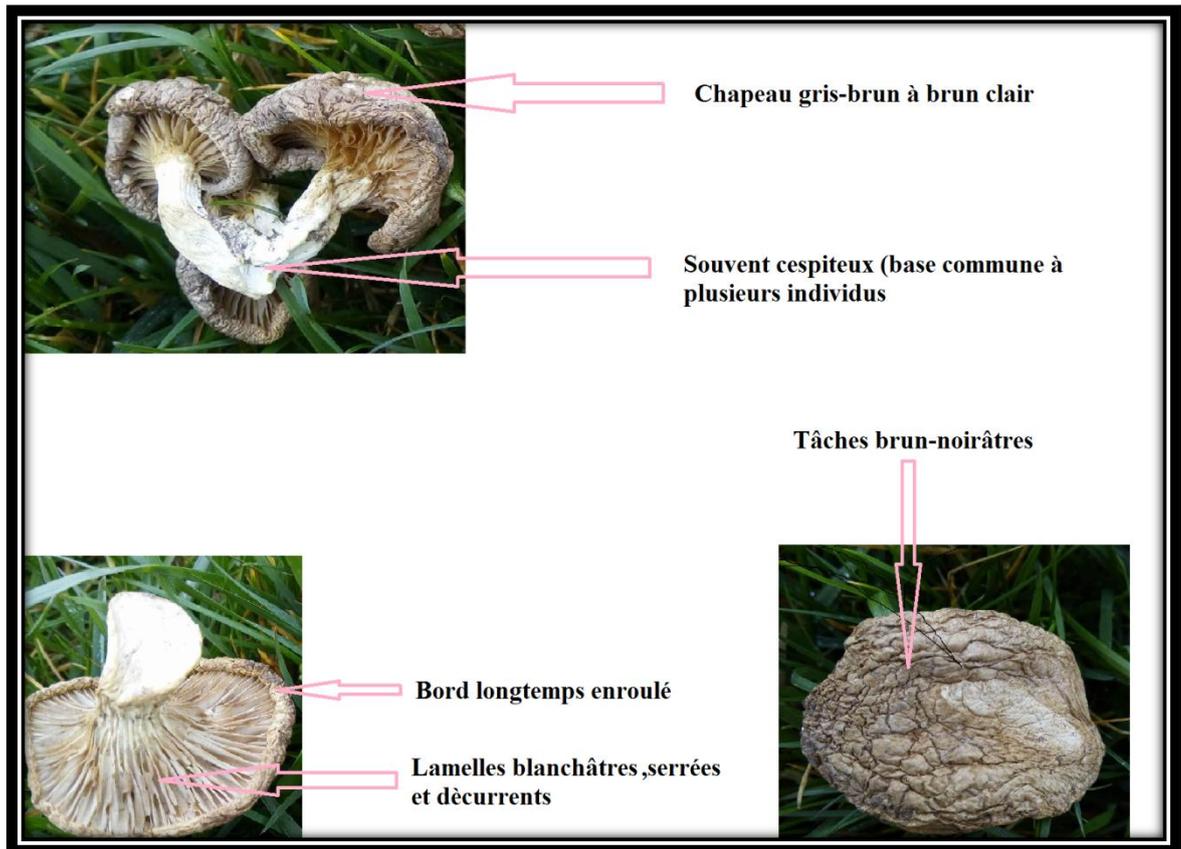


Figure 03 : Les caractéristiques de *Pleurotus eryngii*.

3-4-Répartition géographique:

Pleurotus eryngii est originaire des rives de la Méditerranée. Il se trouve donc au Moyen-Orient et dans les régions du nord de l'Afrique.

Ce champignon est également trouvé en Asie où ils sont cultivés. Le Japon, la Corée du Sud, L'Italie, l'Australie, l'Afrique du Sud et les États-Unis ont également entrepris d'exploiter commercialement ce champignon [18].

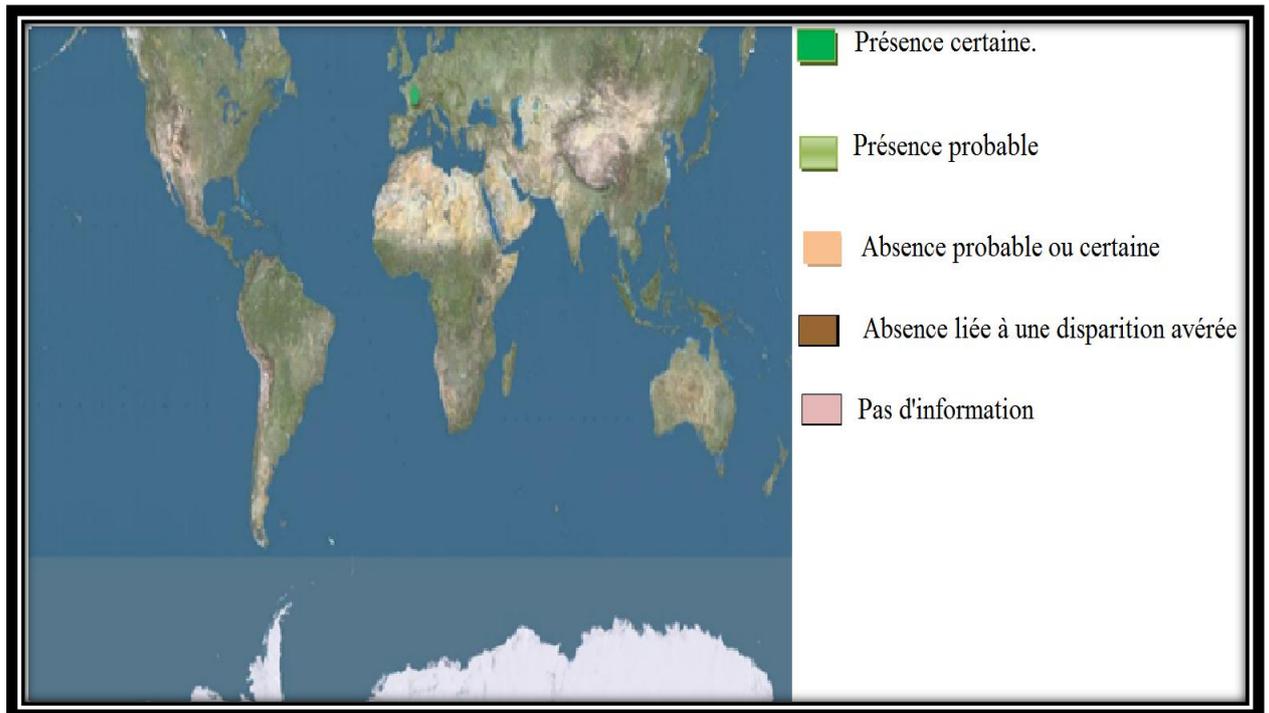


Figure 04 : Carte mondiale de la répartition géographique de *Pleurotus eryngii*

3-5-Utilisation en médecine traditionnelle :

Le champignon *pleurotus eryngii* a une longue histoire d'utilisation dans la médecine traditionnelle en raison de ses bienfaits perçus pour la santé, et leur fonctions biologiques ont longtemps été décrits dans la médecine traditionnelle chinoise [3].

3-6-Intérêt thérapeutique de *Pleurotuseryngii* :

- De nombreuses études ont rapporté qu'une des bioactivités concernant *Pleurotus eryngii* est principalement attribuée à l'activité antioxydante et les principaux contenus efficaces sont les polyphénols et les polysaccharides [19,20]. Aussi le *pleurotus eryngii* contient d'autres substances bioactives, y compris les lipides, des peptides, des stérols, et des triterpènes, ces composants présentaient l'activité antitumorale et immunomodulatrice[21,4].

- L'extrait de *Pleurotus eryngii* agit comme un bon candidat thérapeutique pour l'hyperlipidémie [3,22], et pour régime alimentaire dans les cas d'une hypercholestérolémie [23]. C'est aussi possède l'activité anti-inflammatoire [24,25].

Le tableau suivant représente autre propriétés thérapeutiques de ce champignon :

Tableau 02:Propriétés thérapeutiques de *pleurotuseryngii*.

Le champignon	Propriété thérapeutique
<i>Pleurotuseryngii</i>	Anti-bactérie [26]
	Antifongique [27]
	Anti-hyper glycémiques [28,29]
	Antiallergique [30]

4-Les métabolites secondaires :

4-1-Définition :

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas encore parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général (métabolisme primaire) : ce sont des métabolites secondaires qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même (rôle de résistance) [31].

4-2-Relation entre les métabolismes primaires et secondaires :

Le métabolisme primaire représente tous les processus de bases, comme la croissance ou la respiration, qui sont vitaux pour la plante. Les métabolites primaires proviennent de ces réactions et sont les composés essentiels de la machinerie moléculaire de la cellule. Le métabolisme secondaire a été défini par rapport à cette définition, et constitue donc tous les autres processus. Initialement la notion de métabolites secondaires résidait dans trois principales observations : une difficulté à attribuer une fonction précise à ces composés dans la physiologie de la plante, leur répartition très inégale selon les végétaux et au sein même des plantes, et enfin leur inertie biochimique [32].

4-3-Utilisation :

- ✓ **En médecine :** Les métabolites secondaires qui font la base des remèdes pour l'homme sont utilisés en :

- urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil.
- systèmes cardiovasculaires, ex : Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substituée en combinaison avec la rutine et isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose.
- ✓ **En alimentation** : Les épices et les herbes aromatiques contenant des divers métabolites sont considérées comme condiments et aromates.
- ✓ **En cosmétique** : Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène [33].

4-4-Classification des métabolites secondaires :

On peut classer les métabolites secondaires en quatre grands groupes selon leur structure chimique :

.Les composés phénoliques.

.Les terpènes.

.Les alcaloïdes.

.Les hétérosides.

4-4-1-Les composés phénoliques :

Les composés polyphénoliques sont abondants dans les plantes et les fruits et légumes (Tableau 03). Dans en outre, ils sont des composantes importantes des sont susceptibles de devenir des ingrédients dans des matières médicinales [34].

Tableau 03: Les phénols simples [34].

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
	Acides hydroxycinnamiques		
C6-C3	Coumarines	Acides caféique, férulique	Pomme de terre, pomme
	NaphtoquinonesStilbènes	Scopolétine, esculétine	
	Flavonoïdes	Juglone	Citrus
C6-C4	.Flavonols	Resvératrol	Noix
C6-C2-C6	.Anthocyanes		Vigne
C6-C3-C6	.Flavanols	Kaempférol, quercétine	
	.Flavanones	Cyanidine, pélargonidine	Fruits, légumes, fleurs
	Isoflavonoïdes	Catéchine, épicatechine	Fleurs, fruits rouges
	Lignanes	Naringénine	Pomme, raisin
	Lignines	Daidzéine	Citrus
	Tanins	Pinorésinol	Soja, pois
			Pin
			Bois, noyau des fruits
(C6-C3) ₂			Raisin rouge, kaki
(C6-C3) _n			
(C15) _n			

4-4-1-1-Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) (Figure 05) et les acides hydroxy benzoïques (C6-C1) (Figure 06) [35].

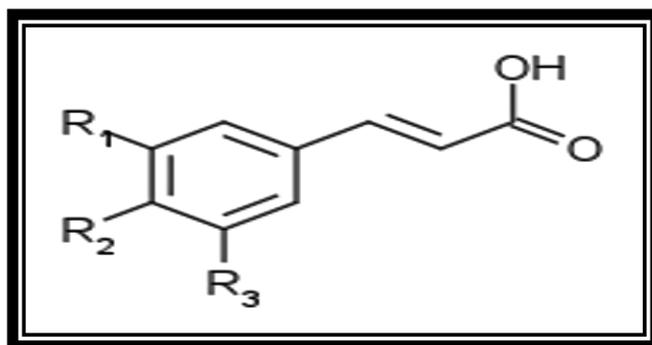


Figure 05: Acides hydroxycinnamiques (C6-C3).

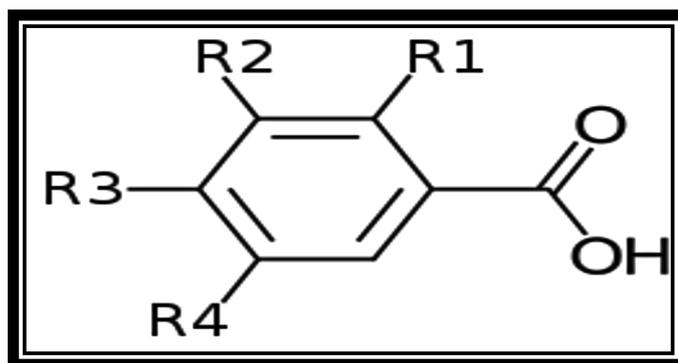


Figure 06 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1).

4-4-1-2-Les flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes à structure polyphénolique. Ils sont synthétisés par la voie polypropanoïde et le composant de démarrage est la molécule de phénylalanine. Les effets biologiques de ces composés varient. Tous les flavonoïdes partagent le squelette de base C6-C3-C6 (Figure 07), composé de deux cycles aromatiques C6 (A et B) et d'un cycle hétérocyclique (C) contenant un atome d'oxygène [36].

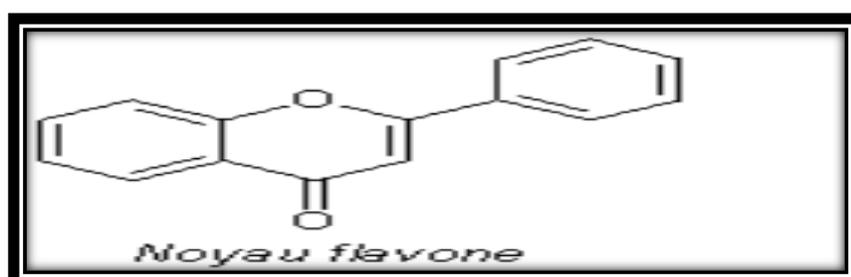
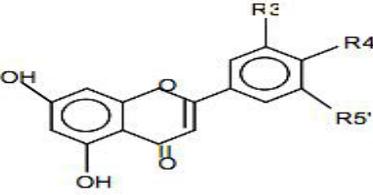
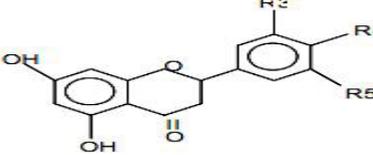
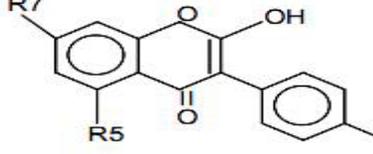
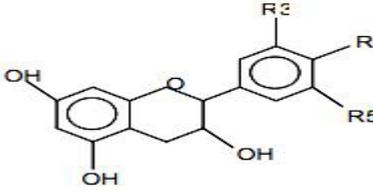
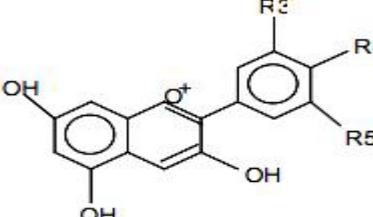


Figure 07 : Noyau flavone.

Tableau 04 : Structure des principaux flavonoïdes [36].

Flavonoïdes	Exemples	Aliments
<p>Flavonols</p> 	<p>Quercétine Kaempférol</p>	<p>Oignon, poireau, brocoli, pomme, chou, fraises, cerise, thé.</p>
<p>Flavones</p> 	<p>Lutéoline Apigénine</p>	<p>Persil, céleri.</p>
<p>Flavanones</p> 	<p>Naringénine Eriodictyol</p>	<p>Fruits du genre Citrus.</p>
<p>Isoflavones</p> 	<p>Genistéine Daidzéine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>
<p>Flavan-3-ols</p> 	<p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine</p>	<p>Vin rouge, thé noir, thé vert, cacao, chocolat.</p>
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Cyanidine Delphénidine</p>	<p>Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>

4-4-1-3-Les coumarines :

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine [37].

Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure (Figure 08) [38].

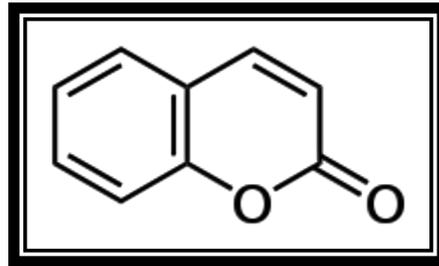


Figure 08 : Structure des coumarines.

4-4-1-4-Les tanins :

Les tanins sont des substances amorphes, astringentes largement dans l'écorce, le bois, les feuilles. Il s'agit de composés phénoliques hydrosolubles qui se produisent largement dans les plantes vasculaires. Le terme était introduit par le Seguin en 1796 pour décrire les substances présents dans un certain nombre d'extraits végétaux (figure 09) [39].

➤ Classification:

On distingue habituellement deux groupes différents qui sont [40] :

✓ Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques.

✓ Tanins condensés :

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre.

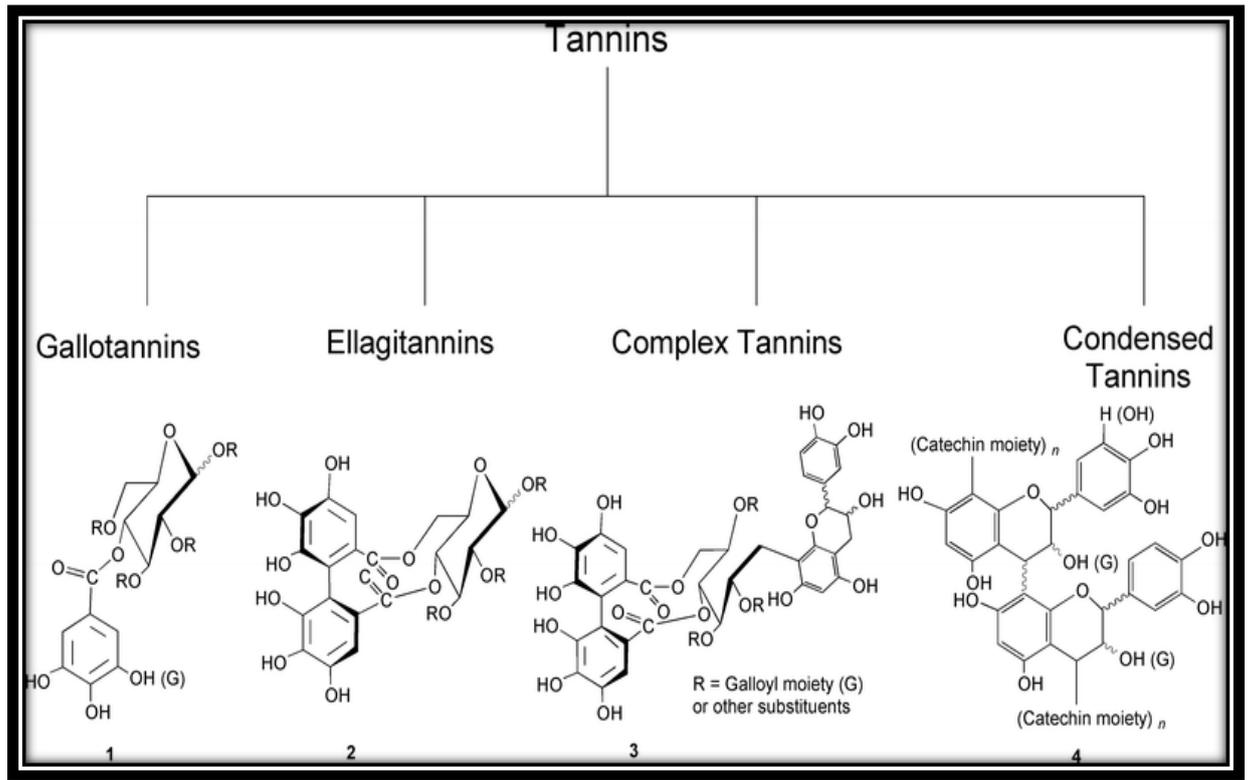


Figure 09 : Structure des tanins.

4-4-1-5-Les anthocyanes:

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (figure 10) (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leur teinte bleue, rouge ou pourpre.

Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du coeur, des mains, des pieds et des yeux [41].

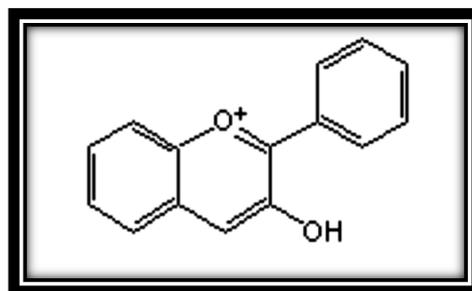


Figure 10: Structure de base des anthocyanidines.

4-4-1-6-Les lignanes :

Les lignanes désignent des molécules qui résultent, le plus souvent, de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils interviennent dans les mécanismes de défense de la plante [42].

4-4-2- Les terpénoïdes :

➤ Définition:

les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures soit cyclique soit chaîne ouverte : leurs formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les poly terpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (figure 11) [43].

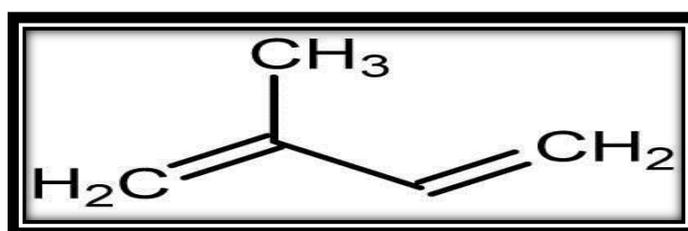


Figure 11 : molécule isoprène.

➤ Classification :

Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (Tableau 05):

Tableau 05: Classification des terpènes [43].

Monoterpène	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpène	$C_{15}H_{24}$
Diterpène	$C_{20}H_{32}$
Triterpène	$C_{30}H_{48}$
Tétraterpène	$C_{40}H_{64}$
Polyterpène	$(C_5H_8)_n$

➤ **Action pharmacologique :**

Les terpénoides ont un intérêt qui conditionne leur utilisation en médecine par leurs propriétés différentes contre les poux de tête adultes, effets ovicides. Une façon de contrôler l'infestation de poux de tête est en réduisant le développement de leurs œuf set Repoussant, et aussi pour des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales, antioxydantes [44].

4-4-3-Les alcaloïdes :

➤ **Définition :**

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (figure 12) [45].

➤ **Classification :**

Les alcaloïdes sont généralement classés en [46]:

- **Alcaloïdes vrais:** Les alcaloïdes vrais contiennent ordinairement un azote hétérocyclique dans leurs structures qui dérivent des acides aminés.

- **Pseudo- alcaloïdes:** Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ce ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoïdes et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques: monoterpéniques, sesquiterpéniques, ou diterpéniques. Dans ce groupe on connaît également des substances issues du métabolisme de l'acétate, c'est le cas de la coniine, principe toxique de la cigüe.

- **Proto- alcaloïdes :** Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'atome d'azote n'est pas inclut dans un système hétérocyclique mais forme plutôt des groupements aminés latéraux. Ils sont biosynthétisés à partir des acides aminés.

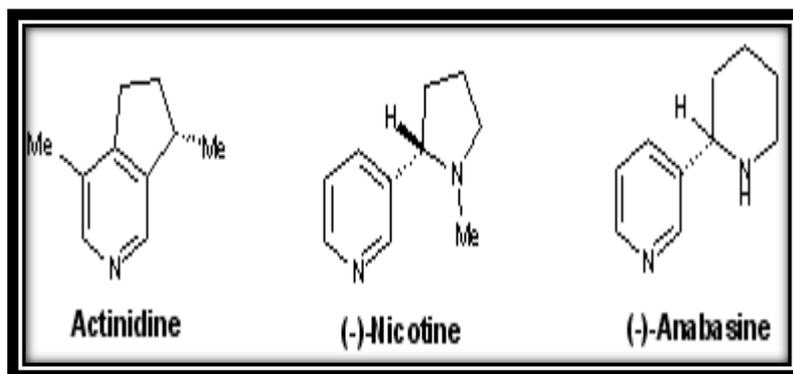


Figure 12 : Structure des quelques alcaloïdes.

➤ **Action pharmacologique:**

Les alcaloïdes présentent fréquemment de propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire. On notera aussi l'existence d'anti-tumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux. Ces nombreuses activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes, soit sous forme de préparation galéniques, soit le plus souvent, pour l'extraction des alcaloïdes qu'elles renferment, ces alcaloïdes étant utilisés eux mêmes ou servant de matière première d'hémi-synthèse [47].

4-4-4-Les hétérosides :

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules formées par combinaison d'oses et de substances non glucidique appelées aglycones ou génines.

Ce sont les substances du métabolisme secondaire les plus anciennement connues. Ils forment des substances de réserve localisés dans la vacuole cellulaires. Les hétérosides se différencient entre eux par leur génines qui appartiennent à tous les groupes du métabolisme secondaire et par le mode de liaison entre la génine et l'ose, ainsi que par la nature de la partie glucidique. Ils sont classés selon la nature de la liaison C,N,O, S-hétérosides [48].

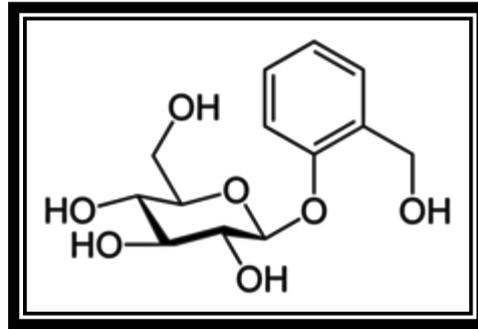


Figure 13 : La salicyline (exemple des hétérosides).

4-4-5-Les saponosides :

Le saponoside (ou saponine) est un hétéroside généralement d'origine végétale formé d'une génine de type triterpène ou stéroïde appelée sapogénine, possédant un ou des groupements osidiques. Les saponosides sont un vaste groupe de glycosides, largement distribués chez les plantes supérieures, leurs propriétés tensio-actives les distinguent des autres glycosides. Ils se dissolvent dans l'eau pour former des solutions moussantes colloïdales par agitation [49].

Les saponosides sont généralement connues en tant que composés non-volatils, tensioactifs, elles sont largement distribuées dans la nature, survenant principalement dans le règne végétal. Le nom « saponine » est dérivé du mot latin « sapo », qui signifie « savon », parce que les molécules des saponosides forment des solutions moussantes quand on les mélange avec de l'eau.

Les saponosides classés en deux groupes : des molécules glycosidiques triterpéniques et Stéroïdiques (Figure 14) [50].

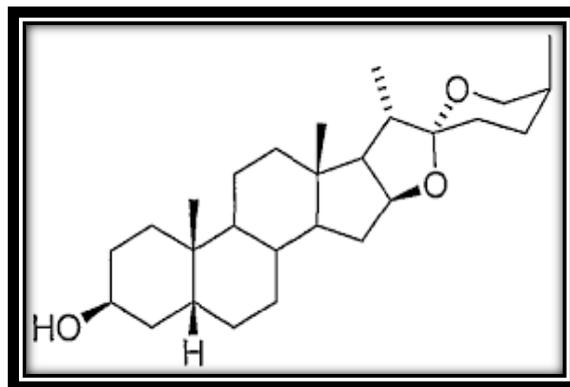


Figure 14: Squelettes des génines stéroïdiques des saponosides.

5-Activité antioxydante

5-1-Antioxydants :

Un antioxydant est défini comme une substance ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive [51].

Au niveau des cellules il y a deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

- **Antioxydants endogènes** : l'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: le superoxydedismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) [52]. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyse d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [53].
- **Antioxydants exogènes** : plusieurs molécules issues de notre alimentation sont considérées comme des antioxydants : la vitamine A, la vitamine C,β-carotène [54], les composés phénoliques (flavonoïdes, coumarines, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...) [55].

5-2- Activité antioxydante *in vitro* :

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel [56].

Parmi ces techniques, nous citons: réduction de fer, le piégeage du radical 2,2-diphényl- 1 – picrylhydrazyl (DPPH) [57], la quantification de la capacité antioxydante totale [58], la méthode de décoloration du bêta-carotène [59]....etc.

6- Recherches antérieures sur le champignon de *Pleurotus eryngii*

Dans la partie suivante, nous présentons des travaux antérieurs réalisés sur l'extraction du champignon *Pleurotus eryngii*.

Trois polysaccharides (FDPEPS, ODPEPS et BTPEPS) ont été extraits du *Pleurotus eryngii* séché au four et porté à ébullition dans une étude réalisée par **Siqian Li et al. (2016)** [60]. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a identifié que le FDPEPS, l'ODPEPS et le BTPEPS étaient composés de mannose (5,75%, 5,52%, 6,97%), de glucose (88,90%, 89,31%, 87,68%) et de galactose (5,34%, 5,17% 5,35%). Les trois polysaccharides ont montré des bandes typiques d'absorption saccharique dans le FT-IR. Le FDPEPS a montré les activités antioxydantes les plus élevées dans les essais de la réduction du fer (FRAP) et ABTS. Les traitements thermiques appliqués avant l'extraction ont affecté les propriétés, la composition et les microstructures de FDPEPS, ODPEPS et BTPEPS.

Dans une autre étude, **Peixin He et al. (2016)** [61] ont fait extraire le substrat de champignons usé (SMS) à partir de *Pleurotus eryngii* et un haut rendement (12,18%) de polysaccharide brut (désigné comme CPS) a été obtenu, puis un complexe polysaccharide-protéine (RPS) a été purifié à partir de CPS. L'analyse de la composition de monosaccharide par GC-MS a confirmé que le RPS est un nouvel acide hétéropolysaccharide et composé principalement de xylose, de glucose et d'arabinose. Ensuite, l'analyse spectrale FT-IR de RPS a révélé des groupes caractéristiques de polysaccharides et de protéines caractéristiques. Des expériences pharmacologiques *in vitro* ont suggéré que la CPS et la RPS présentaient de fortes propriétés antioxydantes de manière dépendante de la dose. L'étude a fourni une approche fiable pour la récupération des ressources usées, ce qui serait important pour le développement durable de l'industrie des champignons et de la protection de l'environnement.

La technologie ultrasonique a été appliquée pour l'extraction du polysaccharide à partir du champignon *Pleurotus eryngii* dans une étude réalisée par **Anqiang Zhang et al. (2014)** [62], et la méthodologie des plans d'expérience (RSM) a été utilisée pour optimiser les effets des paramètres de traitement sur le rendement d'extraction des polysaccharides. Trois variables indépendantes ont été le temps d'extraction (A), la puissance ultrasonore (B) et le rapport solvant à l'échantillon (C), respectivement. Les résultats ont montré que le rendement maximal du polysaccharide *P. eryngii* (PEPS) a été obtenu à un état optimal: temps d'extraction 39 min, puissance ultrasonnée 517 W, rapport d'eau à 19 mL/g et le rendement d'extraction PEPS a atteint

34,3% dans ces conditions. Les PEPS ont été précipités en trois polysaccharides bruts, PEPS30, PEPS60 et PEPS80, par différentes concentrations d'éthanol respectivement. Les activités antioxydantes de ces trois polysaccharides ont été évaluées. Les résultats ont montré que le PEPS80 avait la meilleure puissance de réduction.

Daoyuan Ren et al. (2016) [63], ont réalisé une caractérisation chimique et une identification des effets anti tumoraux des polysaccharides *Pleurotus eryngii* (PEP). Le PEP brut a été fractionné en deux fractions, à savoir PEP-1 et PEP-2. L'analyse par HPLC a montré que PEP-1 et PEP-2 étaient des composés hétéropolysaccharides principalement constitués de glucose avec des poids moléculaires moyens de $2,54 \times 10^4$ Da (PEP-1) et $4,63 \times 10^5$ Da (PEP-2), respectivement. On a montré que le PEP-2 à masse moléculaire élevée présentait une inhibition plus forte de la croissance des cellules HepG-2 d'hépatoblastome humain par rapport au PEP-1. Ces résultats suggèrent que les polysaccharides, en particulier le PEP-2, sont des ingrédients nutritionnels très importants responsables des bénéfices pour la santé contre le cancer de *P. eryngii*.

Yanan Sun et al. (2017) [64], ont étudié les activités anti-oxydantes, anti tumorales et immunologiques du polypeptide à partir de *Pleurotus eryngii mycelium* (PEMP). Les activités antioxydantes du polypeptide ont été étudiées en examinant son pouvoir réducteur et sa capacité à éliminer les radicaux DPPH, O_2 et $\bullet OH$. Les résultats ont montré que le PEMP était un bon antioxydant avec des activités antitumorales et immunostimulantes dépendantes de la concentration. Sur la base de ces résultats, PEMP a des applications potentielles dans les aliments fonctionnels en tant qu'agent anti-âge naturel et anti-virus avec des activités antioxydantes et immunostimulantes.

Nuo Xu et al. (2017) [65], le but de ce travail a été conçu pour étudier les effets hépatoprotecteurs et antioxydants des polysaccharides de mycélium et zinc extractibles enzymatiquement (En-MZPS) de *Pleurotus eryngii* var. *Tuoliensis* sur les souris hyperlipidémiques induites par une émulsion à haute teneur en lipides et à haute teneur en cholestérol (HFHCM). Les résultats ont montré que l'ajout de l'En-MZPS avait des effets potentiels anti-hyperlipidémiques sur la réduction des taux de lipides hépatiques en surveillant les activités enzymatiques sériques (ALP, ALT et AST) et les taux de lipides sériques (TC, TG, HDL-C, LDL-C Et VLDL-C), améliorant les enzymes antioxydantes (SOD, GSH-Px, CAT et T-

AOC) et diminuant la peroxydation lipidique (MDA et LPO). Ces conclusions ont démontré que l'En-MZPS pourrait convenir à des aliments fonctionnels et à des médicaments naturels.

Un polysaccharide hydrosoluble (EPA-1) de *Pleurotus eryngii* a été obtenu dans une étude réalisée par **Duoduo Xu et al. (2016)** [66], en utilisant des colonnes DEAE-52 et Sephadex G-50. Les propriétés, la structure et l'activité immunomodulatrice de l'EPA-1 ont été étudiées. Les résultats ont démontré que l'EPA-1 était un polysaccharide homogène avec un poids moléculaire de $9,97 \times 10^4$ Da. Les structures de fragments caractérisés de l'EPA-1 se sont révélées constituées de sept résidus de sucre et de deux branches par des analyses GC-MS, FTIR et RMN. Les tests d'activité ont indiqué que l'EPA-1 possède une bonne activité immunorégulatrice.

Les produits chimiques toxiques : le bisphénol A (BPA), le bisphénol F (BPF), le nonylphénol (NP) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA) sont des produits chimiques toxiques qui ont suscité beaucoup d'inquiétudes quant à leur effet sur l'environnement. Les objectifs d'une étude réalisée par Bea-Ven Chang et al. (2016) [67] étaient d'étudier la dégradation du BPA, du BPF, du NP et du TBBPA par des enzymes de *Pleurotus eryngii* en utilisant la fermentation submergée (SmF) et la fermentation à l'état solide (SSF), ainsi que pour évaluer l'élimination des produits chimiques toxiques en utilisant les champignons.

La transformation texturale induite par l'abrasion se produit facilement avec les champignons stockés. L'objectif d'une étude réalisée par **Danqing Li et al. (2016)** [68] était d'étudier l'altération de la texture causée par le durcissement par rapport à d'autres attributs de qualité du champignon roi d'huîtres (*Pleurotus eryngii*). Les champignons frais d'huîtres royaux, emballés dans des sacs en polyéthylène basse densité, ont été stockés à différentes températures basses pendant 18 jours pour mesurer les attributs de texture et d'autres caractéristiques de qualité. On a constaté que le durcissement s'est produit deux fois pendant toute la durée de stockage. Des changements hautement associés ont été observés pour les activités de trois enzymes importantes impliquées dans la synthèse de lignine. Les résultats ont suggéré que le durcissement peut affecter la qualité post-récolte des champignons testés.



Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1-Matériel fongique :

1-1-Identification de champignon :

La partie expérimentale de ce travail a été portée sur le champignon comestible *Pleurotus eryngii* «Pleurote du panicaut », qui a été identifié 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 de champignon :

Ce champignon a été récolté en période allant du mois de Avril 2016 au mois de Mai 2016 à la région de Hammame grouz-oued el Athmania ; wilaya de Mila (44 Km de la wilaya de Constantine) au nord-est d'Algérie (figure15).

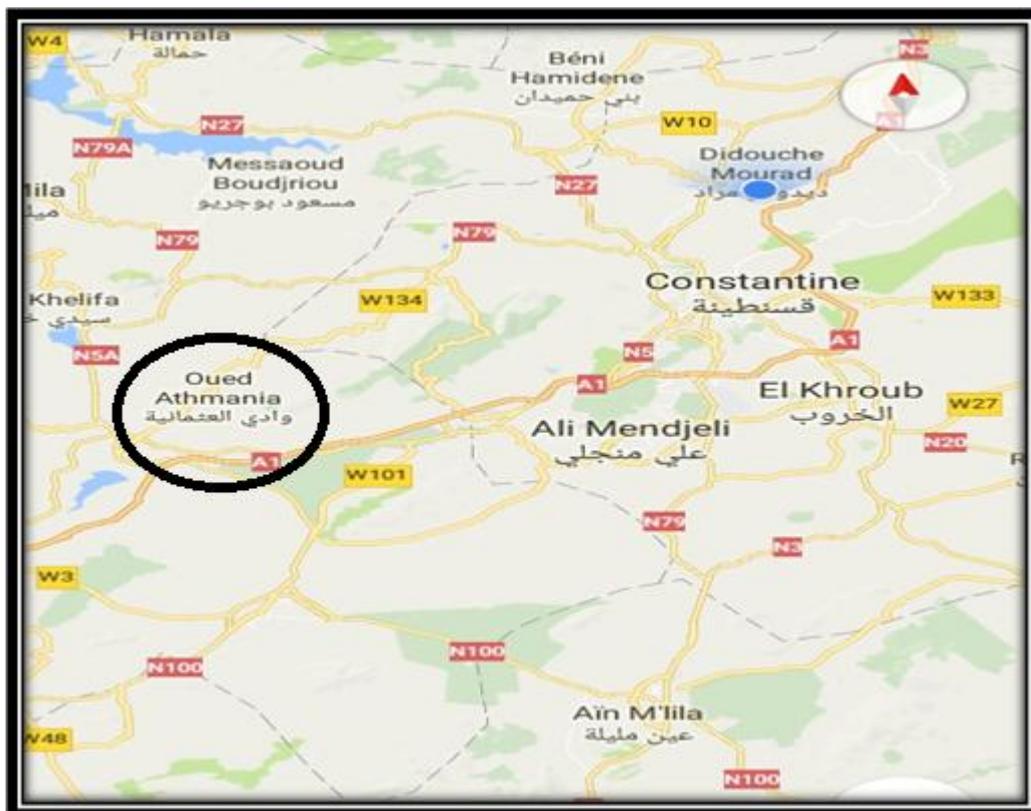


Figure 15 : Carte géographique de la zone de récolte «Hammam grouz-Oued Athmania».

2-Extraction :

2-1-préparation des extraits :

Le champignon *Pleurotus eryngiia* été séché et broyé sous forme d'une poudre fine (100g) et mises à macérer à froid avec le cyclohexane, pendant 48 heures afin d'éliminer le maximum d'acide gras et les huiles. Après filtration sous vide, laissé le marc humecté avec l'ammoniac (25%) pendant 24 heures.

L'extraction a été réalisée avec deux solvants : dichlorométhane et l'acétate d'éthyle successivement à l'aide d'un chauffage à reflux pendant 4 heures pour chaque solvant (figure 16) [69].

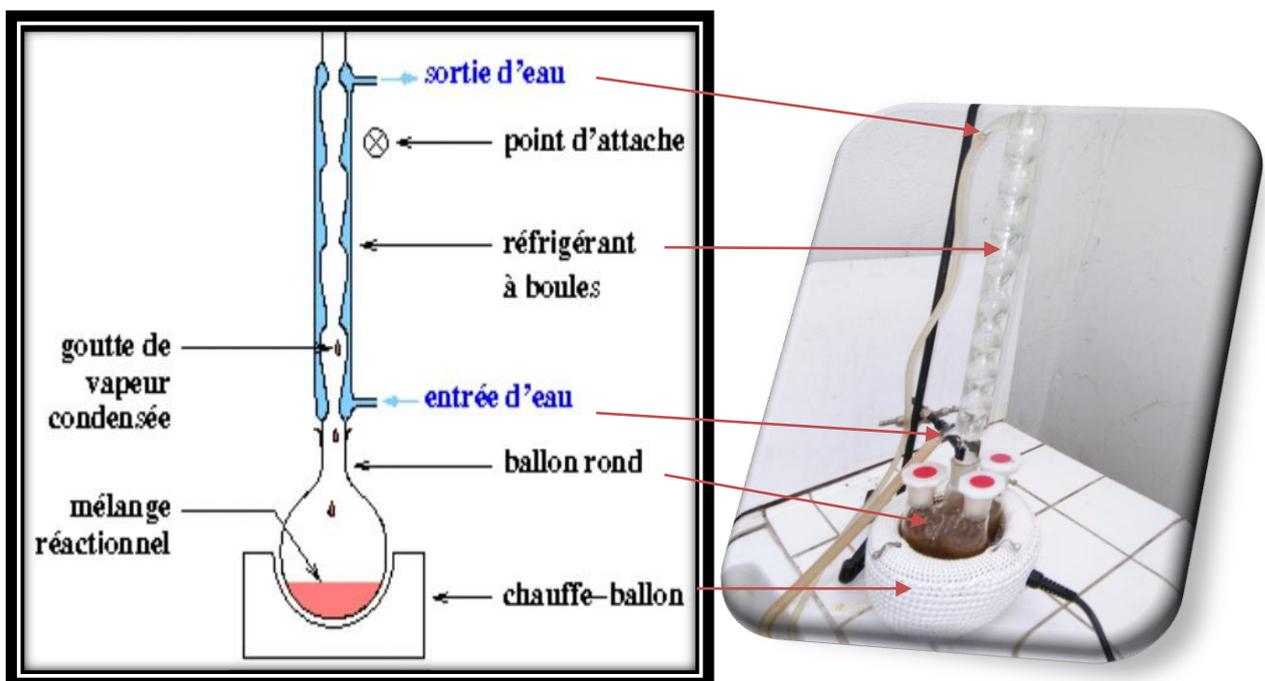


Figure 16 : Chauffage à reflux.

Les deux extraits obtenus sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à température de 40°C.

Nous avons récupéré les deux extraits sec, afin d'évaluer leur activité antioxydante, savoir leur profil chromatographique sur couche mince et purification par chromatographie sur colonne.

Matériel et méthodes

Les étapes d'extraction ont été résumées dans la figure suivante :

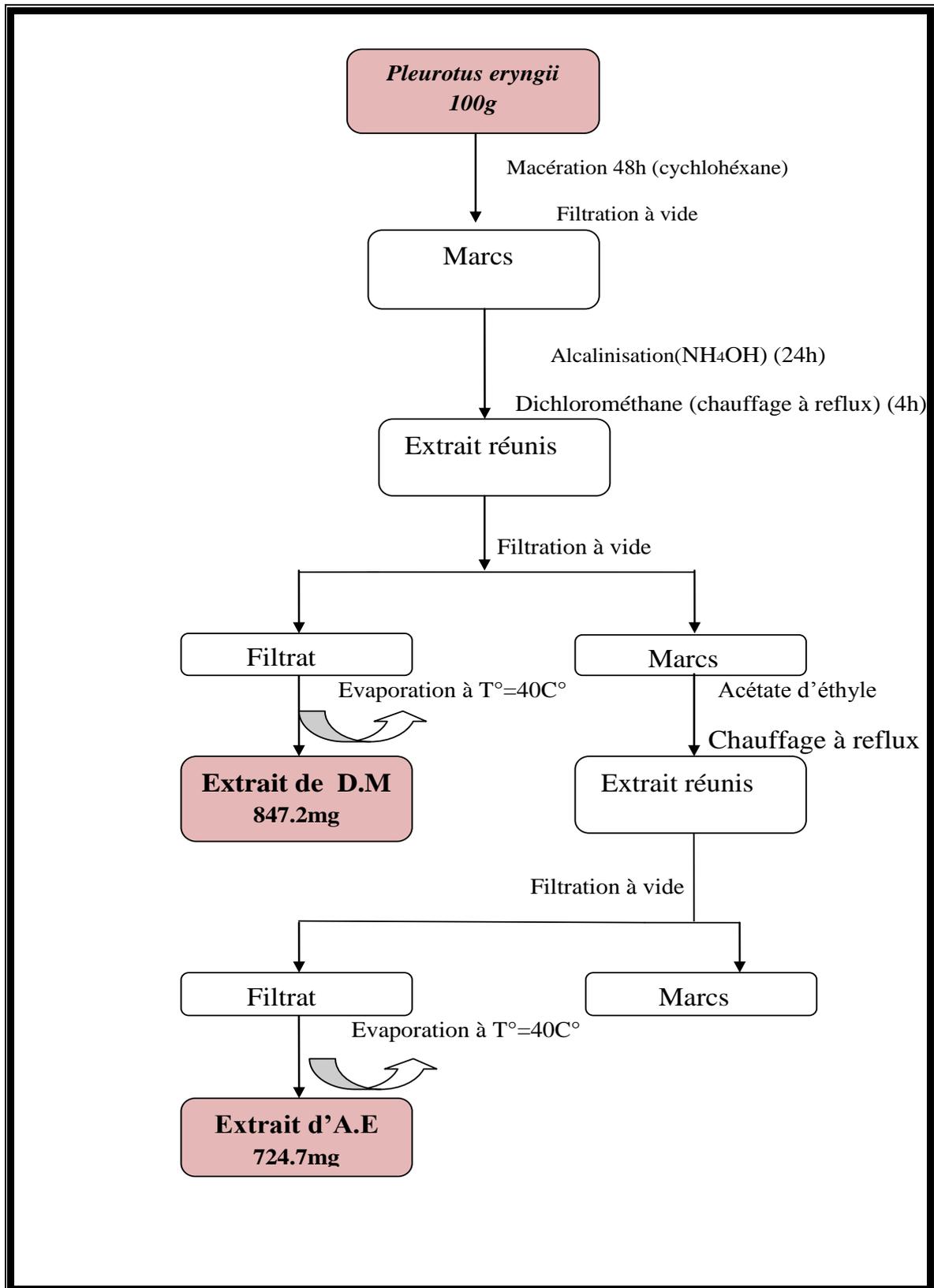


Figure 17: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction.

2-2-Détermination de rendement :

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale du champignon soumise à l'extraction [69].

$$R\% = (\text{masse d'extraction} / \text{masse de l'extrait sec}) \times 100$$

3- L'activité antioxydante :

Il y a plusieurs méthodes de dosage pour la mesure de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libre. Parmi ces méthodes la méthode utilisant le radical stable DPPH (diphényl-picrylhydrazyl).

3-1-Principe de test au DPPH :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et reste dans leur forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleu violette bien caractéristique de la solution DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picrylhydrazyle de couleur jaune (figure 18) [70].

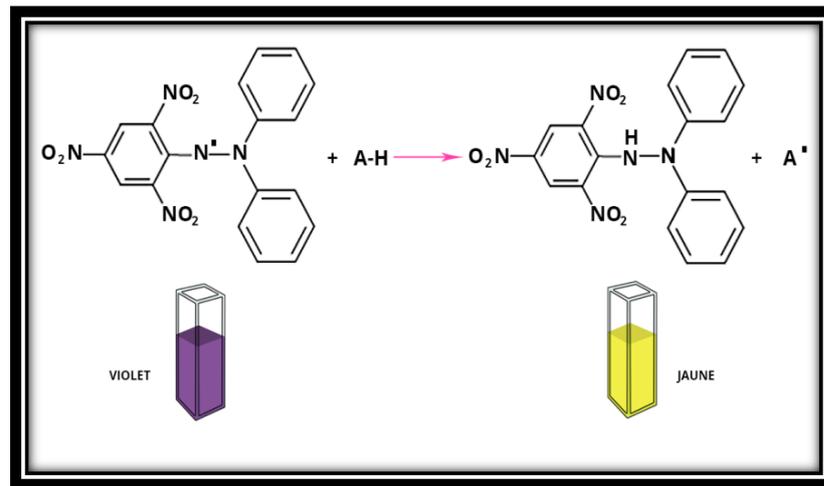


Figure 18: Réaction de test DPPH (2,2 diphényl -1-picryl hydrazyle).

3-2-Protocole :

Le pouvoir anti radicalaire de ces extraits est mesuré selon la méthode décrite par **Sanchez-Moreno C (2002)** [71] :

- Préparation de solution DPPH :

Une solution méthanolique de DPPH par solubilisation de 0,6 mg de DPPH dans 25 mL de méthanol.

- Préparation de témoin :

Cinquante microlitre de solvant organique utilisé pour l'extraction (acétate d'éthyle, dichlorométhane) a été ajouté à 1,95 mL de solution DPPH.

- Préparation d'échantillons :

Cinquante microlitre de chaque solution de l'extrait du *Pleurotus eryngii* qui a été préparé avec des concentrations différents (0,1 – 0,5 - 1 -5 - 10 - 20 -50 - 100 mg/mL) a été ajouté à 1,95 mL de solution DPPH, nous avons préparé deux tubes pour chaque concentration.

Les mélanges ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 min, et la décoloration comparée au témoin (contrôle négatif) mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/visible (figure 19).



Figure 19 : Spectrophotomètre UV-Visible.

3-3-Expression des résultats :

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante [72] :

$$\%(AA) = [(A_{517\text{nm}} \text{ control} - A_{517\text{nm}} \text{ échantillon}) / A_{517\text{nm}} \text{ control}] \times 100.$$

$A_{517\text{nm}} \text{ control}$: l'absorbance du témoin.

$A_{517\text{nm}} \text{ échantillon}$: l'absorbance d'extrait.

4-La chromatographie sur couche mince :

4-1-Définition :

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites [43].

4-2- Principe :

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) qui est plongé dans un solvant (phase mobile) par capillarité se déplace le long de la phase stationnaire.

Matériel et méthodes

La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile [73].

Après que l'échantillon ait été déposé, les substances migrent essentiellement par capillarité. La vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

4-3-Mode opératoire :

A fin de mettre en évidence des métabolites à partir des deux extraits «dichlorométhane et Acétate d'éthyle». Nous avons réalisé la séparation par CCM selon les étapes suivant :

-Dans un premier temps, nous avons tracé un trait horizontal (la ligne de base) à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM. Des pipettes pasteurs en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire ont été utilisées pour effectuer les dépôts des extraits.

-La plaque est déposée en position verticale dans une cuve de chromatographie contenant l'éluant (figure 20). La plaque de CCM est retirée lorsque les taches atteignent la ligne frontale.



Figure 20 : La cuve chromatographique.

Plusieurs systèmes solvants tirées à partir de la bibliographie ont été utilisés pour mieux séparer les différents composés métaboliques éventuellement présents dans les extraits :

Matériel et méthodes

Tableau 06 : Les différents systèmes solvants pour la CCM.

Les systèmes solvants essayés	-Chloroforme/Acétate d'éthyle (95/5 ; V/V). -Chloroforme/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V). -Acétate d'éthyle/Méthanol/eau (40/8/5 ; V/V/V) -Ether de pétrole/Acétate d'éthyle (80/20 ; V/V) -n-butanol/acide acétique/eau (60/15/25 ; V/V). -Cyclohexane/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V)
Le système solvants choisi	-Acétate d'éthyle/Chloroforme (90/10 ; V/V)

-Sous une lampe Ultra-violet (UV) à 254 nm mettant en évidence sous forme des taches la présence des métabolites secondaire (figure 21).



Figure 21 : Une lampe Ultra-violet (254 nm).

-Réactif de DragonDorf a été utilisé pour mettre en évidence la présence des alcaloïdes dans nos extraits (figure 22).

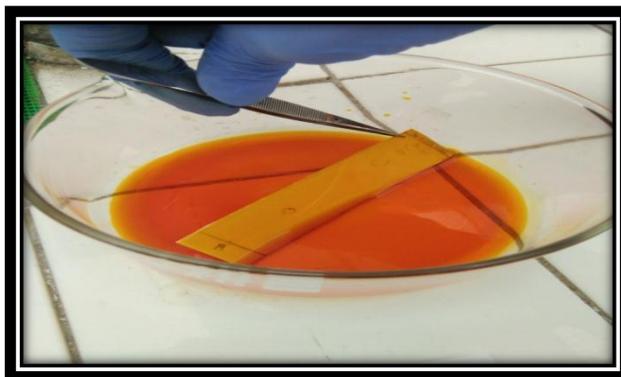


Figure 22: Révélation avec le réactif dragondorf.

2-3-4-Détermination de rapport frontal Rf :

Les distances parcourues par les différentes taches sont mesurées par le rapport frontal (Rf) (figure23) [74].

$$Rf = \frac{X}{Y} = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

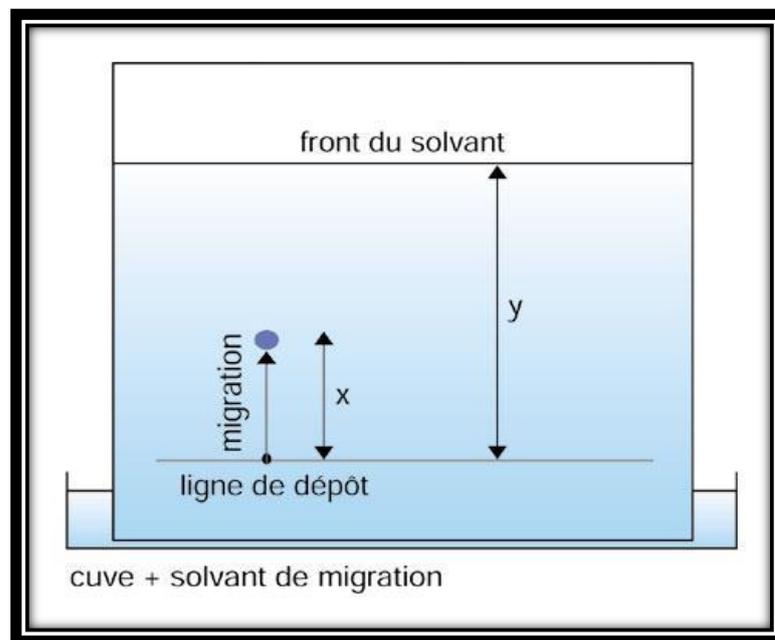


Figure 23: Le rapport frontal.

X : Distance parcourue par le constituant, **Y** : Distance parcourue par le front de l'éluant [41].

2-4-La chromatographie sur colonne :

2-4-1-Définition :

La chromatographie sur colonne (C.C) peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes [75].

2-4-2-Principe :

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur variable : l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés [45].

2-4-3-Mode opératoire :

Il n'existe pas des règles définies pour identifier les conditions de la chromatographie sur colonne, ce dernier permet la séparation de tous les mélange s'il a été réalisé dans les bonnes conditions (phase mobile et phase stationnaire).

La séparation sur colonne a été effectuée sur l'extrait d'acétate d'éthyle, en débutant par le choix du meilleur système d'élution. Les tests effectués ont montré que la meilleure séparation était obtenue avec le système (ChCl₃/EtOAc) dans les proportions (90/10 ; V/V).

La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Une masse de 200 mg d'extrait est déposée sur une colonne de gel de silice préparé dans le chloroforme. L'élution est réalisée par gradient de polarité du système (ChCl₃/EtOAc), en récupérant des fractions de 4 mL.

Tableau 07 : Pourcentage des solvants utilisés pour la colonne.

Pourcentage des solvants	
ChCl ₃ (%)	EtOAc (%)
100	0
95	5
90	10
80	20
70	30

Le suivi de ces fractions se fait par CCM support en Aluminium, ces plaques sont révélées par le réactif Dragondorf et solution d'acide sulfurique (H₂SO₄/Acide acétique/H₂O (20/20/60 ;

Matériel et méthodes

V/V/V)) a été pulvérisé sur la plaque, après chauffage dans l'étuve réglé à température 100°C, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour (figure 24).



Figure 24 : Révélation par l'acide sulfurique.

Les fractions de mêmes compositions sont rassemblées donnant ainsi 9 fractions.



Résultats et discussion

Résultats et discussion

1-Extraction et détermination des rendements :

Rappelons que la préparation des extraits à partir du *Pleurotus eryngii* a été effectuée par deux solvants à polarité croissante il s'agit de dichlorométhane (D.M) et l'acétate d'éthyle (A.E). Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts qui ont été récupérés après évaporation à sec sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le rendement

Le rendement d'extraction désigne la masse de l'extrait après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de 100g, par l'application de la formule suivant :

$$R\% = (\text{masse d'extraction} / \text{masse de l'extrait sec}) \times 100$$

Les résultats obtenus pour chaque extrait sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Les rendements d'extraits: acétate d'éthyle(A.E), dichlorométhane(D.M).

Extrait	Pois (g)	Rendement (%)
D.M	0,8472	0,8472
A.E	0,7247	0,7247

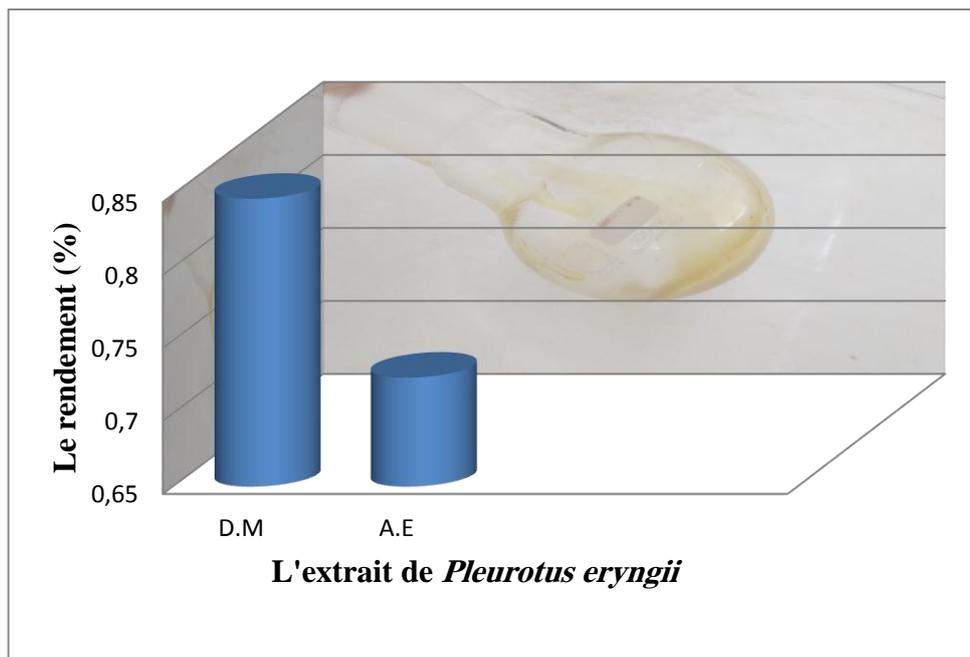


Figure 25: Histogramme du rendement de l'extraction.

Les résultats obtenus pour les extraits bruts montre que le rendement a été enregistré dans la phase dichlorométhane est de 847,2 mg et pour la phase d'acétate d'éthyle est de 724,7mg.

2-L'activité antioxydante (test au DPPH) :

Le DPPH est un radical libre possède une couleur violette qui réduite en un couleur jaune, ce changement de couleur est attribué à la présence d'une activité antioxydante.

L'activité antiradicalaire des extraits a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanoïque de DPPH, mesurée à 517 nm, les résultats des deux extraits ont été illustrés sur les deux figures (26) et (27)

Nos résultats sont estimés à l'œil nu, et on observe le changement de couleur en fonction du temps et avec comparaison par le témoin.

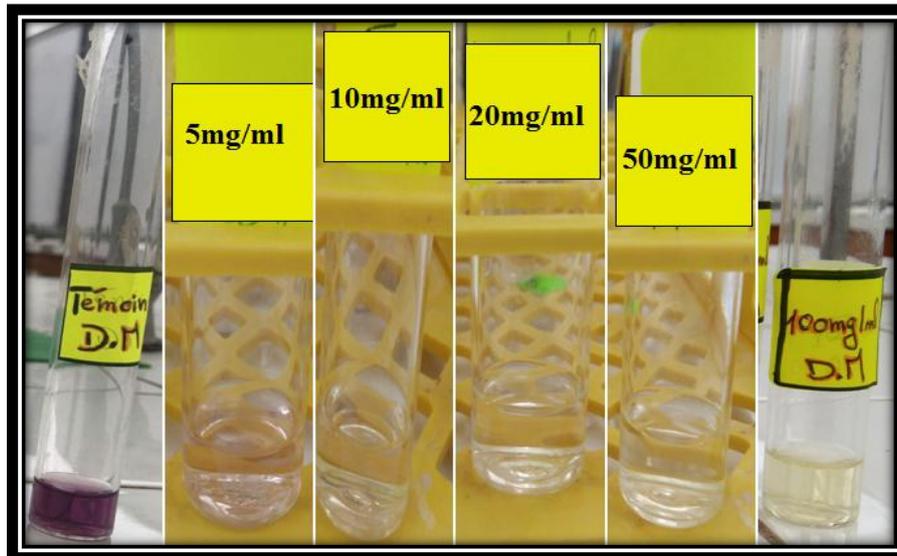


Figure 26 : Résultats de l'activité antioxydante(test DPPH) pour l'extrait (D.M).

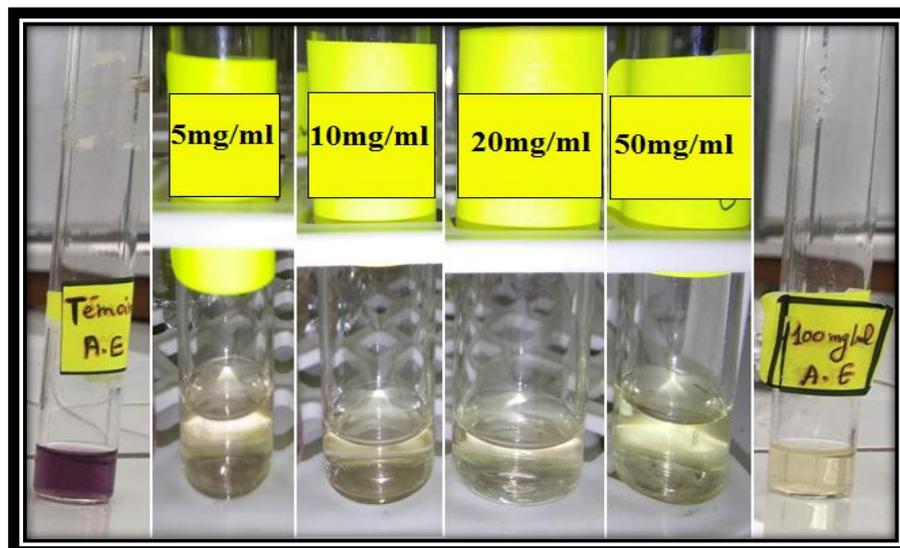


Figure 27 : Résultats de l'activité antioxydante(test DPPH) pour l'extrait de (A.E).

Nous avons observé un changement de couleur pour les concentrations (5-10-20-50 et 100 mg/mL) avec les deux extraits D.M et A.E , la couleur violette se transforme en couleur jaune avec le temps par rapport au témoin qui reste violet, et aucun changement observé avec les concentrations (0.1 – 0.5 et 1mg/mL) pour les deux extraits .

Les résultats de changement de couleur des différents concentrations testés pour l'extrait (D.M) et de l'extrait (A.E) ont resumé dans le tableau suivant :

Résultats et discussion

Tableau 09: Tableau récapitulatif des résultats de l'activité antioxydante.

Concentrations (mg/ml)	Extraits	Changement de couleur avec le temps
0,1 -0,5-1	D.M	Aucun changement de couleur
	A.E	// // //
5-10-20-50	D.M	Couleur jaune après 12 h
	A.E	// // //
100	D.M	Couleur jaune après 30 min
	A.E	// // //

D'après le tableau 08 on peut conclure que les extraits avec D.M et A.E n'ont aucune activité antioxydante avec les concentrations : (0,1-0,5 et 1mg/mL), et ils présentent une activité antioxydante avec les concentrations : 5-10-20-50 et 100mg/mL.

Nous avons remarqué aussi que la concentration 100mg/ml montre un changement de couleur en jaune plus rapide (après 30min) que les autres concentrations testées (après 12h), avec les deux extraits.

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH :

Après l'incubation des mélanges testés, nous avons mesuré leur absorbance par spectrophotomètre UV visible à 517 nm et nous avons calculé le pourcentage de l'activité antioxydante en appliquant la formule suivante :

$$\%(AA) = [(A_{517} \text{ control} - A_{517} \text{ échantillon}) / A_{517} \text{ control}] \times 100.$$

Résultats et discussion

Les résultats des deux extraits (A.E et D.M) ont été résumés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Les pourcentages de l'activité antioxydante d'extrait D.M et A.E.

	Absorbances	Témoin	5mg/ml	10mg/ml	20mg/ml	50mg/ml	100mg/ml
L'extrait A.E	1	1,337	1,011	1,028	1,030	1,053	0,232
	2		1,068	1,044	1,100	1,059	0,226
	Moyenne		1,0395	1,036	1,065	1,056	0,229
	Le pourcentage		22,251	22,513	20,344	21,017	82,872
L'extrait D.M	1	1,420	1,100	1,033	1,064	1,017	0,216
	2		1,047	1,026	1,055	1,011	0,211
	Moyenne		1,0735	1,0295	1,0595	1,014	0,2135
	Le pourcentage		24,401	27,5	25,387	28,591	84,964

Nous avons résumé les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante dans les histogrammes suivants :

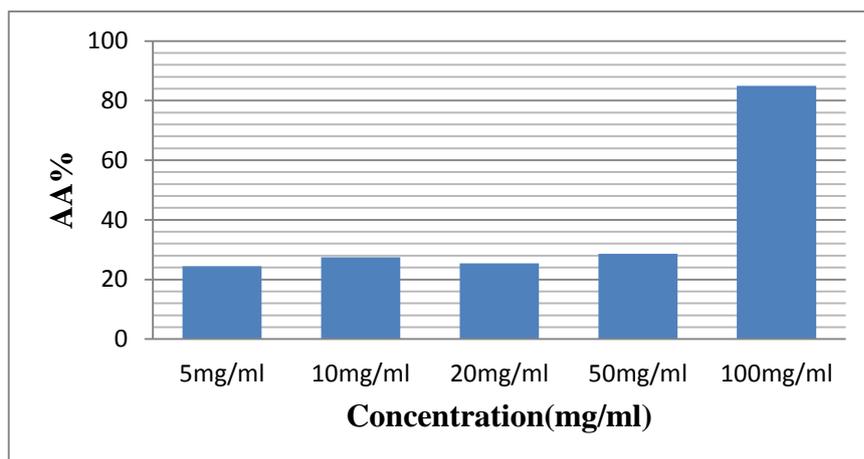


Figure 28: Histogramme de pourcentage de l'activité antioxydante pour l'extrait (D.M).

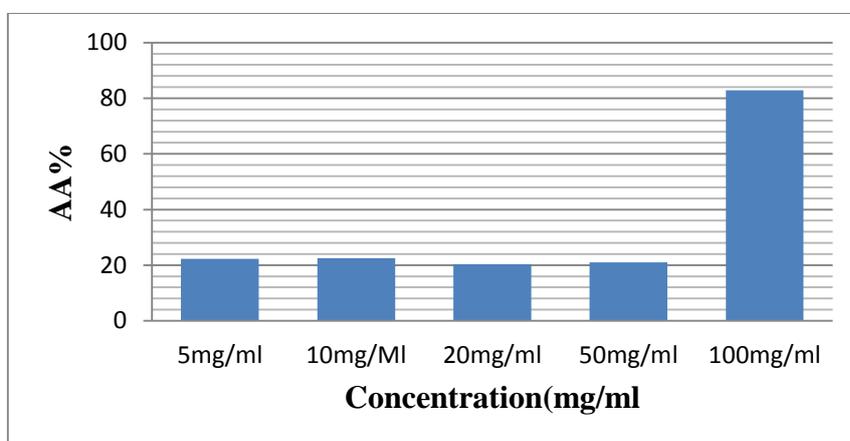


Figure 29: Histogramme de pourcentage de l'activité antioxydante pour l'extrait (A.E).

D'après les résultats, on peut conclure que l'activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH est identique pour les deux extraits, ces résultats ont été remarqué par les ressemblances des pourcentages de l'activité antioxydante (%AA) des concentrations : 5-10-20-50 et 100mg/mL pour l'extrait de D.M et celui d'A.E, cela peut être due à la ressemblance de la composition chimique de deux extraits

3-Chromatographie sur couche mince :

Pour avoir une évaluation qualitative de la composition chimique de nos extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant plusieurs systèmes solvants pour la phase mobile à différents polarités. Nous avons gardé celui qui a donné la meilleure séparation chromatographique : chloroforme/Acétate d'éthyle, (90/10; V/V) pour les deux extraits.

Résultats et discussion

Après séchage des chromatogrammes à l'air libre les différents spots des extraits (D.M et A.E) ont été observées sous la lumière UV à 254 nm (figure 30) par le réactif de DragenDorff (figure 31) (révélateur des alcaloïdes sachant que notre échantillon *Pleurotus eryngii* est riche en alcaloïde [19,67] pour cela nous avons vérifié la présence de ses métabolites dans notre extrait).

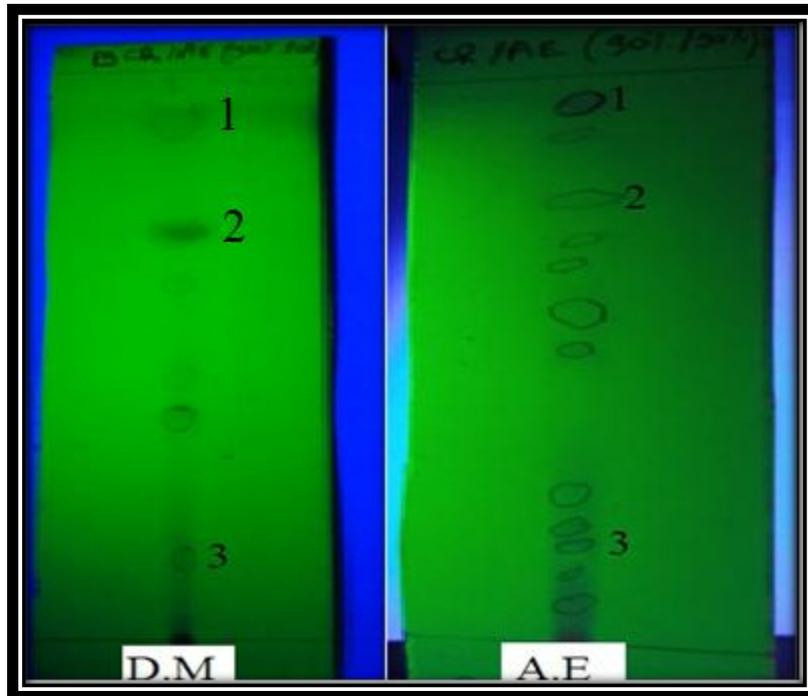


Figure 30: Révélation des chromatogrammes (D.M et A.E) par lampe UV (254nm) développées dans le système solvant (chloroforme/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V).

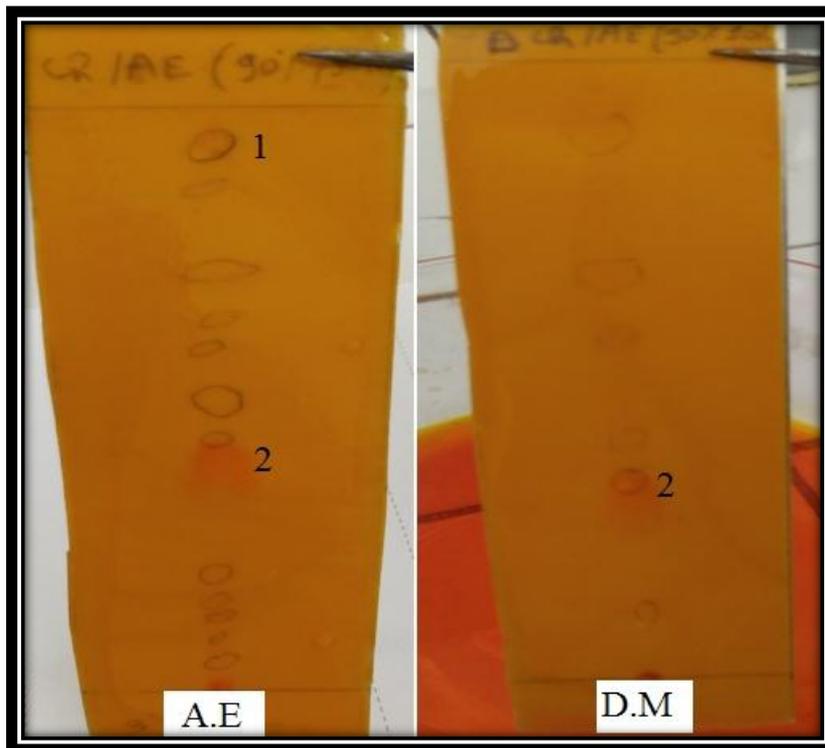


Figure 31: Révélation des chromatogrammes (D.M et A.E) par le réactif DragenDorff développées dans le système solvant (chloroforme/Acétate d'éthyle (90/10 ; V/V).

D'après l'observation des chromatogrammes sous lampe UV (254nm). Les résultats présentent une bonne migration grâce à la bonne séparation des molécules et les spots obtenus confirment la présence des métabolites secondaires dans nos extraits étudiés. Pour chaque extrait, nous observé différents métabolites qui ont été migré selon leur polarité avec l'éluant chloroforme/acétate d'éthyle (90/10 ; V/V). D'après les chromatogrammes on remarque aussi l'apparition des spots dans les mêmes niveaux pour les deux extrait par exemple (1-2 et 3 figure30 et 31), cela est expliqué par l'existence des métabolites de la même nature dans les deux extraits.

Le révélateur, réactif de DragenDorff a indiqué la présence des alcaloïdes dans les deux extraits par l'apparition des deux spots majoritaire avec l'extrait d'acétate d'éthyle et une spot majoritaire avec le dichlorométhane qui sont colorés en orangé (figure30 et 31), et remarquant que les deux extraits ayant la même spot orangé (2) avec presque la même Rf (0,35pour D.M et 0,40 pour A.E) .

Résultats et discussion

4-Chromatographie sur colonne :

La purification par une C.C a été réalisée sur 200 mg d'extrait d'acétate d'éthyle, pour l'isolement des métabolites secondaires, dont on a pu collecter 142 fractions de 4 ml par élution de polarité croissante.

Les fractions récoltées de la colonne ont été contrôlées sur des plaques de CCM de gel de silice en utilisant deux systèmes solvants : chloroforme/Acétate d'éthyle avec les proportions (90/10 ; V/V) pour les fractions 1-2-3 et 4 et (70/30 ; V/V) pour les fractions 5-6-7 et 8. L'examen des plaques a été effectué sous UV à 254 nm, avec révélation à l'acide sulfurique et par le réactif DragenDorff.

Les 8 fractions obtenues, leurs rendements et leurs chromatogrammes révélés avec la solution d'acide sulfurique ont été résumés dans la figure suivante

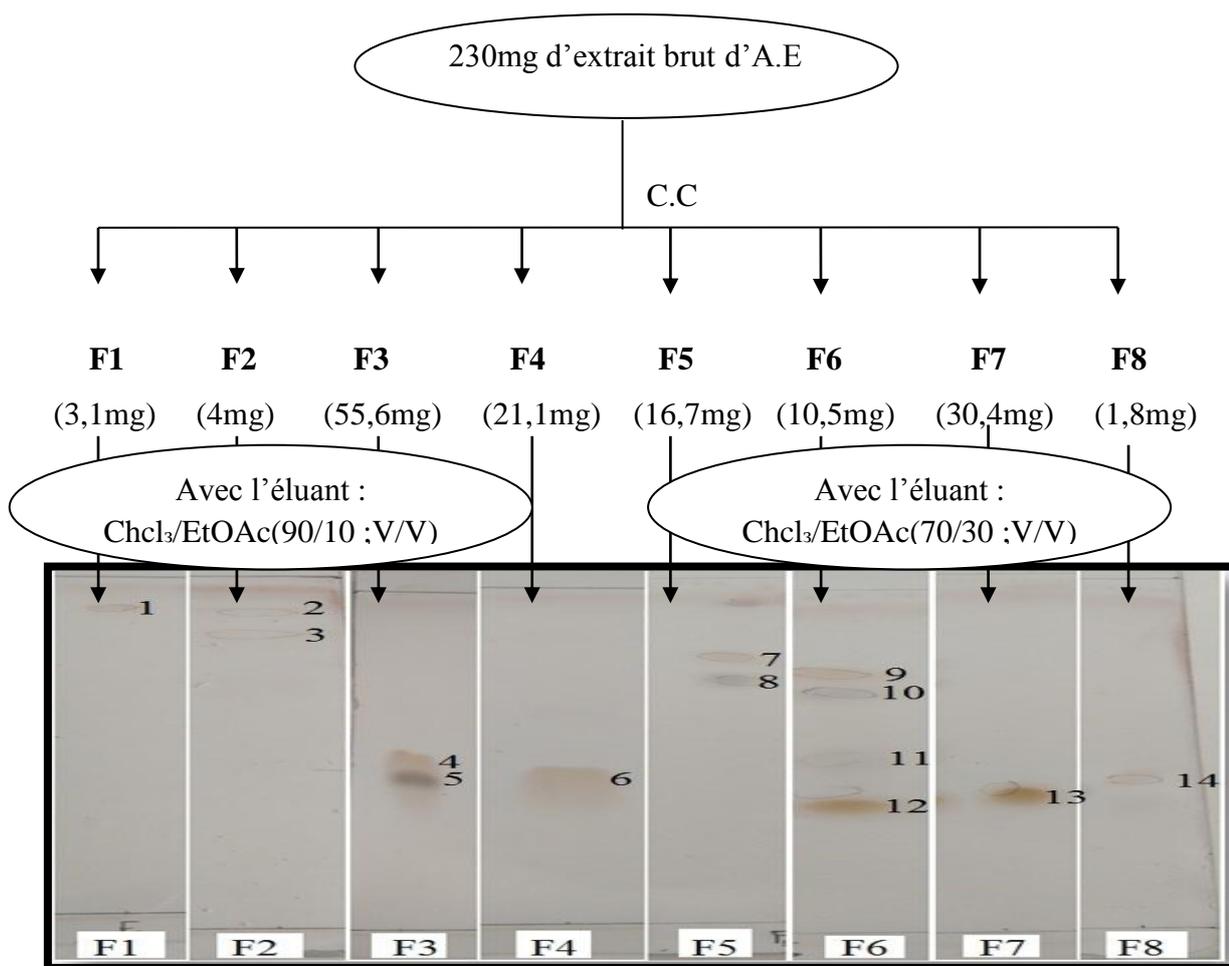


Figure 32: Résultats de la séparation par C.C de l'extrait d'acétate d'éthyle révélé par l'acide sulfurique.

Résultats et discussion

A fin de mettre en évidence la présence des alcaloïdes dans nos fraction, nous avons traité les chromatogrammes avec le réactif DragenDorff, les résultats positives ont été observés dans les fractions 6 et 7 comme le montre la figure suivante :

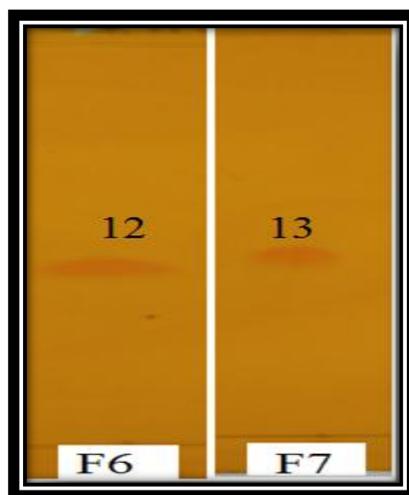


Figure 33: Résultats de la séparation par C.C de l'extrait d'acétate d'éthyle révélé par le réactif DragenDorff.

Les résultats précédents ont été résumés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Regroupement finale des fractions et résultats de la séparation issue de la C.C.

Les fractions	Système d'élution	Nombres de spots	Numéro de spot	RF
1	ChCl ₃ /EtOAc (90/10 ; V/V)	1	1	0,88
2		2	2	0,89
			3	0,82
3		2	4	0,49
	5		0,43	
4		1	6	0,40
5	ChCl ₃ /EtOAc (70/30 ; V/V)	2	7	0,75
			8	0,68
6		4	9	0,74
			10	0,68
	11		0,48	
	12		0,34	

Résultats et discussion

7		1	13	0,36
8		1	14	0,41

La purification par C.C sur l'extrait d'acétate d'éthyle nous a permis d'obtenir 8 fractions contenant différents produits. Nous avons pu avoir des fractions ayant un seul composé d'après les résultats des CCM (figure 32), les deux fractions 1 et 8 ont un seul produit mais avec des quantités faibles : 3,1mg (1) et 1,8mg (14) successivement, le chromatogramme du F4, nous a donné un spot majoritaire avec une quantité de 21,1mg (6) et un produit de 30,4mg (13) est observé dans F7, sachant que ce dernier est coloré en orange avec le réactif DragenDorff, réactif spécifique des alcaloïdes, pour cela, on suppose que ce produit (13) est un alcaloïde.



Conclusion

Conclusion

Conclusion

Dans le présent travail, notre intérêt s'est porté sur une étude des métabolites secondaires du champignon *Pleurotus eryngii* connu sous le nom du Pleurote de panicaut du nord-est Algérie, qui joue également une source important de substances d'origine naturelle biologiquement active.

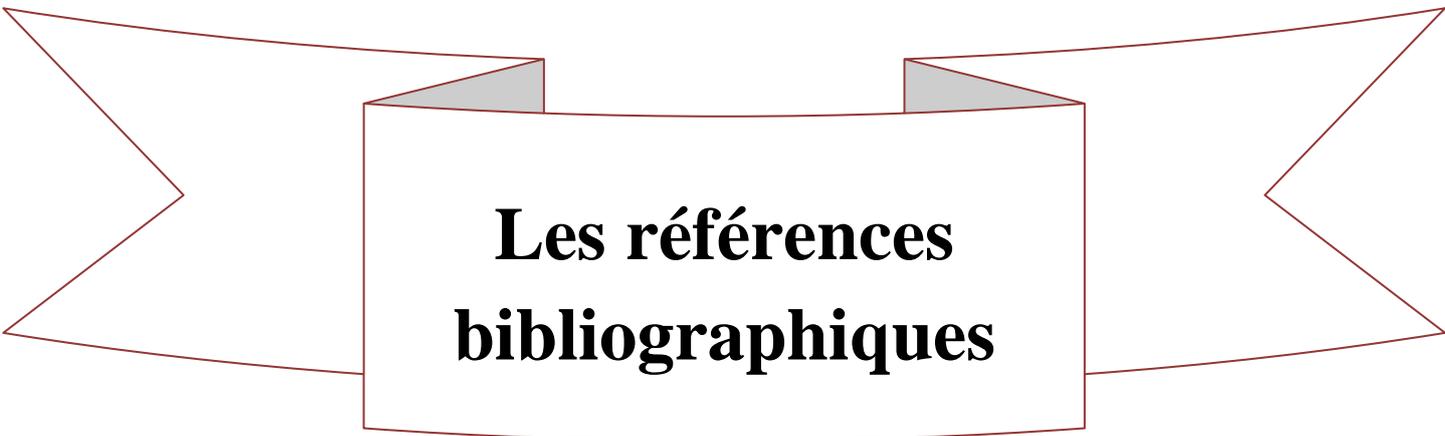
L'analyse chromatographique (CCM), a été utilisée pour l'identification des métabolites secondaires.

L'extraction des métabolites secondaires a été effectuée sur 100 g du champignon par deux solvants à polarité croissante « Dichlorométhane et Acétate d'éthyle », le rendement de chaque extrait est de 0,8472% et 0,7247% respectivement. Les deux extraits provenant du champignon ont montré un pouvoir antioxydant, qui a été testé *in vitro* par la capacité de piégeage de radical libre DPPH.

Les résultats de l'étude analytique par la chromatographie sur couche mince ont montrés la richesse de l'extrait de dichlorométhane et l'extrait d'acétate d'éthyle par des composés bioactif et la présence des alcaloïdes par réactif de DragenDorff. L'analyse par la chromatographie sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle a permet la séparation et la purification de constituant de ce mélange. Les résultats de l'isolement ont donné 8 fractions contenant des différents métabolites, dont 4 fractions contiennent un seul produit, et pour la fraction F7 nous avons supposé que le produit obtenu est un alcaloïde, qui a donné une réaction positive avec le réactif de DragenDorff (couleur orangé).

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense des métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose :

- Identification structurales des produits obtenus par chromatographie sur colonne en utilisant les méthodes d'identification (RMN H¹ et C¹³, UV, IRetc).
- Purification des fractions résultant de la colonne par des méthodes spécifiques permettant de récupérer des composés à l'état pur.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles et isoler d'autre métabolites secondaires contenus dans nos extraits, pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.



**Les références
bibliographiques**

Les références bibliographiques

- [1]: **PHILPE CHIFFOLEAU**. *Les champignons de la famille des agaricacées : sources d'innovation thérapeutiques*. Thèse de doctorat : pharmacie. Université de nantes. France. 2014. page: 11.
- [2]: **JAYAKUMAR T; RAMESH E; GERALDINE P**. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*.2006; **44**:1989–1996.
- [3]: **JINGJING CHEN; DONY MAO et al .** Hépatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*. 2012; **130** (3):687-694
- [4]: **JEONGYONG-TAE JEONG; SANG-CHULJEONG et al.** Antitumor and immunomodulating activities of endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. *Food Science and Biotechnology*.2010; **19**(2): 399-404.
- [5]: <http://www.futura-science.com/definition/champignon-mycologie-13525/>. Consulté le : 17 /03/2017.
- [6]: **KEREFEZ K KAOUALA; BRIK OUSSAMA**. *Culture et clonage d'un tissu de champignon de paris (Agaricus bisporus)*. Mémoire de master : biologie et génomique végétale. Constantine : Université les frères Mentouri. Algérie .2015.page : 03.
- [7]: **EDAUDI S**. *Les mycoses profondes* .Thèse de doctorat : medecine. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Maroc.2016.page : 23.
- [8]: **PIERRE-ARTHUR MOUREAU**. *Analyse écologique et patrimoniale des champignons supérieurs dans les tourbières des Alpe du Nord*. Thèse de doctorat. Université de savoie. France. 2002. page : 25.
- [9]: **REZA A; CHOI MJ et al.** Comparative Antitumor Activity of Different Solvent Fractions from an *Auricularia auricula-judae* Ethanol Extract in P388D1 and Sarcoma 180 Cells. *Toxicological Research*. 2011; **27**(2): 77-83.
- [10]: **CHANG ST; WASSER SP .** The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*.2012; **14**(2):95-134.
- [11]: **GUISSOU KML ; SANON E et al.** La mycothérapie au Burkina Faso : Etas des lieux et perspectives. *Journal of Applied Biosciences*.2014 ; **79** :6896-6908.
- [12]: **VITAK TY ; WASSER SP et al.** The Effect of the Medicinal Mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) on the Erythron System in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*.2015; **17** (3): 277-86.
- [13]: **ADITYA GANESHPURKAR; GOPAL RAI et al.** Antidiabetic Potential of Polysaccharides from the White Oyster Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus*

Les références bibliographiques

florida (Higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms.2014; 16(3): 207-217.

[14]: **ANANDHI R ; ANNADURAI T et al.** Effets antihypercholestérolémiques et antioxydants d'un extrait du champignon d'huître, *Pleurotus ostreatus*, et de son constituant principal, la chrysine, chez des rats hypercholestérolémiques induits par Triton WR-1339. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.2013; 69(2):313-23.*

[15]: *vialade .fr /cultivés /l'eryngi. Consulté le: 10/03/2017.*

[16]: *http://mycologia34.canalblog.com/archives/2016/04/08/33639065.html. Consulté le:25/03/2017.*

[17]: **BRAMKI MOUNA ; NEKIA ABDESSAMIE.** Recherche des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotus eryngii* et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de master : *Biochimie Moléculaire et Santé. Constantine : Université les Frère Mantouri. Algérie. 2016. Page : 5-6,29.*

[18]: *http://www.medicalmushrooms.net /pleurotus-eryngii/. Consulté le: 10/03/2017.*

[19]: **ZHIMING FU; YLIU et al .**A potent pharmacological mushroom: *pleurotus eryngii* .*Fungal Genomics & Biology.2016; 6:1.*

[20]: **ZHANG A; LI X et al.** Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *US National Library of Medicine National Institutes of Health. 2014; 65:28-32.*

[21]: **ZHAOHUI XUE; LIJUAN ZHAI et al.** Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Pleurotus eryngii* Extract. *Journal of Food Biocgemistry.2015; 39(1): 19–27.*

[22]: **JINGJING CHEN; YANGYANG et al.** Characterization of polysaccharides with marked inhibitory effect on lipid accumulation in *Pleurotus eryngii*. *Carbohydrate Polymers. 2013; 97(2): 604–613.*

[23]: **NUHI ALAM; KI NAM YOON et al.** Dietary effect of *pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholes terolemic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences.2011; 18:403-409.*

[24]: **SIQIAN LI; NAGENDRA P.SHAH.** Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of natural and sulphonated polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Journal of Functional Foods. 2016; 23:80–86.*

[25]: **ANDREJ JEDINAK; SHAIKESH DUDHGAONKAR et al.** L'activité anti-inflammatoire de champignons comestibles est médiée par l'inhibition de la signalisation NF-kB et AP-1.*Biomed Central The Open Access Publisher:Nutrition Journal.2011; 10: 52.*

Les références bibliographiques

- [26]: **SIQIAN LI; NAGENDRA P.SHAH.** *Intioxydant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from Pleurotus eryngii and Streptococcus thaermophilus ASCC.* *Food Chemistry.* 2014; **165**: 262-270.
- [27]: **WANG H; NG TB.** *Eryngin a novel antifungal peptid from fruiting bodies of the edible mushroom Pleurotus eryngii.* *US National Library of Medicine National Institutes of Health .* 2004; **25**(1):1-5.
- [28]: **JUNG-IN KIM; MIN-JUNG KANG et al.** *Effect of king oyster mushroom (Pleurotus eryngii) on insulin resistance and dyslipidemia in db/db mice.* *Food Science and Biotechnology.* 2010; **19**(1): 239-242.
- [29] : **LI JP; LEI YL et al .** *The effects of the king oyster mushroom Pleurotus eryngii (higher Basidiomycetes) on glycemic control in alloxan-induced diabetic mice.* *US National Library of Medicine National Institutes of Health .* 2014; **16** (3): 219-25.
- [30]: **HAN EH; HWANG YP et al.** *Inhibitory effect of Pleurotus eryngii extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells.* *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* 2011; **49**(6):1416-25.
- [31]: **GUERRAH.M; SEGUENI.M.** *Contribution à l'étude biochimique de quelques plantes médicinales dans le Sahara Septentrional algérien .Mémoire de master. Biochimie appliquée. El-oued. Université Echahid Hamma Lakhdar. Algerie.* 2015. page :10.
- [32]: **MACHEIX.J.J ; FLEURIETI A.JAY-ALLEMAND C.** *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.*
- [33]: **MOHAMMEDI.Z.** *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou BakrBelkaïd.Tlemcen. Algerie.* 2006. page: 155.
- [34]: **KATARZYNAGOSZEZ et al .** *Antioxidants in cardiovasculartherapy: panacea or false hope? .* *Frontiers in Cardiovascular Medicine .* 2015; **2**:10.
- [35]: **ARIMBOOR; KUMAR K.S et al.** *Simultaneous estimation of phenolicacids in seabuckthorn (Hippophaërhamnoides) using RP-HPLC with DAD.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2008; **47**(1): 31-38.
- [36]: **ALI GHASEMZADEH; NEDA GHASEMZADEHed.** *Flavonoids and phenolicacids: Role and biochemicalactivity in plants and human.* *Journal of Medicinal Plants Research.* 2011 ; **5**(31) : 6697-6703.

Les références bibliographiques

- [37]: **BRUNETON, J.** *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales*, 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris. France. 1999.
- [38]: **ALIGNAN, M.** *Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie*, Toulouse. France. 2006.
- [39]: **ELGAILANI; C.Y. ISHAK.** *Determination of Tannins of Three Common Acacia Species of Sudan*. Armando Zarrelli. 2014; 5:1.
- [40]: **ALLAL.A.** *Etude phytochimique et activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen: Psoralea bituminosa L.* Mémoire de master: chimie. Tlemcen : Université ABOU BEKR BELKAÏD. Algérie. 2016. page: 16.
- [41]: **MESSIOUGHI.M.** *Analyse des substances actives "les flavonoïdes" et action antibactérienne d'une fabacée à intérêt médicamenteux "Medicago sativa L." cultivée sur des sols du Nord-Est algérien. Mémoire de magistère : Physiologie des Plantes Médicinales*. Annaba : Université Badji Mokhtar. Algérie. 2010. page: 25.
- [42]: **YANG B; LINKO A et al.** *Secoisolariciresinol and matairesinol of seabuckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) berries of different subspecies and harvesting times*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(21):8065-8070.
- [43]: **BEZZAZ .N.** *Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de Mentha rotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique. M'sila: Université de M'sila. Algérie. 2014. page : 14.
- [44]: **JOSE S ; DALBOLENA et al.** *Terpènes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study*. Hindawi Publishing Corporation. 2016; 17:2-3-5.
- [45]: **DONATIEN.K.** *Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes – Extraction Identification d'alcaloïdes – Caractérisation, Quantification de polyphénols : Etude de leur Activité Antioxydante*. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université Paul Verlaine de METZ–UPV-M. France. 2009. Page: 24,65.
- [46]: **KEBILI.Z.** *Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de Ephedra alata de la région d'Ouargla*. Mémoire de magistère : Biologie. Ouargla: Université Kasdi Merbah. Algérie. 2016. page : 21.
- [47]: **AREF.M ; HEDED.M.** *Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicamenteuse Cleome arabica L (Région d'Oued Souf)*. MEMOIRE de Master Académique: Biochimie Appliquée .El-oued: Université Echahid Hamma Lakhdar. Algérie . 2015. page : 17.

Les références bibliographiques

[48]: **GUIGNARD.J.L.** *Biochimie végétale. Ed.Masson,Paris, 2000;231-241*

[49]:**TYLER.N.J; L.V.GUSTA et al.***The influence of nitrogen, phosphorus and potassium on the cold acclimation of winterwheat (Triticumaestivum L.). Canadian Journal of Plant Science .1981; 61(4): 879-885.*

[50]: **BETINA BENCHARIF** .*Isolement et caractérisation des saponosides extraits de deux plantes médicinales Cyclamen africanum, Zygophyllum cornutum et évaluation de leur activité anti-inflammatoire. Thèse de doctorat: Biotéchnologie végétale. Constantine :Université de Constantine1.Algérie.2015.page:16.*

[51]: **SHIMIZU H; KIYOHARA Y et al.** *Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 2004;35(9):2072-7.*

[52]: **HELENA LINDMARK; MAENSSON et al.** *Antioxidative factors in milk. British Journal of Nutrition. 2000;1 :103-110.*

[53]: **ABDELGHAFOUR MARFAK.** *Radiolyse gamma des flavonoides : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat :Biophysique. Université de Limoges . France.2003. page: 10-11.*

[54]: **GAUCHE ELODIE; HAUSSXIRTH CHRISTOPHE.** *Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. Movement & Sport Sciences.2006; 58:43-66.*

[55]: **MESSOUD HIRECHE.** *Etude de l'activité antioxydante de la tomate séchée. Mémoire de master 2: nutrition humaine. Chlef : Université de Hassiba Ben Bouali. Algérie.2013.page: 26-27.*

[56]: **NAGHRAOUI MEBARKA.** *Activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait brut et ses fractions de l'algue rouge Coraiina officinalis, récoltée sur la côte ouest algérienne (plage de Madrid). Mémoire de master : Sciences des aliments. Tlemcen: Université Aboubekr Belkaid. Algérie.2014.page :19.*

[57]: **OYAIZU, M.** *Les études sur les produits des réactions Browning: Activités de produit antioxydantes de Browning Réaction Préparé à partir Glucosamine. Japon Journal of Nutrition.1986; 44 :307-315.*

[58]: **PRIETO P; PINEDA M et al.** *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 1999; 269(2):337-41.*

Les références bibliographiques

- [59]: **TING SUN; CHI-TANG HO.** Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry*.2005; **90**(4): 743-749.
- [60]: **Siqian Li ; Nagendra P. Shah.** Characterization, antioxidative and bifidogenic effects of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* after heat treatments. *Food Chemistry*. 2016; 197 : 240–249.
- [61]: **Peixin He; Fangli Li; Lina Huang; Dongdong Xue; Wei Liu; Chunping Xu.** Chemical characterization and antioxidant activity of polysaccharide extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2016; 1–6.
- [62]: **Anqiang Zhang ; Xueqing Li ; Chen Xing ; Junhong Yang ; Peilong Sun.** Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014 ; 65 : 28-32.
- [63]: **Daoyuan Ren; Ning Wang; Jianjun Guo; Li Yuan; Xingbin Yang.** Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. 2016; 138: 123-133.
- [64]: **Yanan Sun; Xinlei Hu; Wenxiang Li.** Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 97: 323–330.
- [65]: **Nuo Xu ; Zheng Gao ; Jianjun Zhang ; Huijuan Jing ; Shangshang Li ; Zhenzhen Ren ; Shouxian Wang ; Le Jia.** Hepatoprotection of enzymatic-extractable mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *Carbohydrate Polymers*. 2017; 157: 196-206
- [66]: **Duoduo Xu ; Haiyang Wang ; Wei Zheng ; Yang Gao ; Mingxing Wang ; Yanqiu Zhang ; Qipin Gao.** Charaterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016 ; 92 : 30-36.

Les références bibliographiques

[67]: **Bea-Ven Chang; Yi-Ming Chang**, *Biodegradation of toxic chemicals by Pleurotus eryngii in submerged fermentation and solid-state fermentation. Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2016; 49: 175-181.

[68]: **Danqing Li; Xiaoyi Qin; Pingping Tian; Jie Wang**. *Toughening and its association with the postharvest quality of king oyster mushroom (Pleurotus eryngii) stored at low temperature. Food Chemistry.* 2016; 196: 1092-1100.

[69]: **BRUNETO J.** *Pharmacognosie, 3^{ème} édition, éd, Technique et Documentation.* 783-1086.

[70]: **KAMAL FADIL; SMAIL AMALICH et al.** *Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du atlas du maroc :Rosmarinus officinalls et Thymus satureioides. International Journal of Innovation and Scientific Research.*2015 ; 17 :24-33.

[71]: **SAHPAZ S ; GARBACKI N ; TITS M ; BAILLEUL F.** *Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoids esters from marrubium vulgare.J Ethnopharmacol.*2002; 79:389-92.

[72]: **N.GHEDADBA ; H.BOUSSELSSELSA et al.** *Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de Marrubium vulgar L.*2014 ;12 : 15-24.

[73]: **AMIN. A.** *Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atorubens Poit (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat : pharmacognosie. Université Lille Nord de France. France. 2013. page : 84.*

[74]: **DJIMLI MANAL ; KOUIZA ISMAHANE.** *Contribution à l'étude phytochimique et du pouvoir antioxydant des feuilles de blé tendre (Triticum aestivum).Mémoire de master : Biochimie Moléculaire et Santé. Université les Frères Mantouri. Algérie. Page : 25-26.*

[75]: **BOUTITI AMEUR.** *Etude phytochimique de l'espèce Globularia alypum L. Mémoire de magister : chimie organique. Constantine : Université les Frères Mantouri. Algérie. Page: 18.*

[76]: **BOUTERA KENZA ; HAMOUDI ILHAME.** *Etude extractive des alcaloïdes du champignon Pleurotus eryngii et évaluation de leurs activités antibactérienne et antifongique. Mémoire de Master : Biochimie Moléculaire et Santé. Constantine : Université des Frères Mentouri. Algérie.2016. page : 38.*

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du champignon « *Pleurotus eryngii* » appelée Pleurote du panicaut récolté dans la région de Hammame grouz- oued el Athmania (wilaya de Mila) au nord-est d'Algérie, est un champignon comestible largement cultivé, il a une longue histoire d'utilisation dans la médecine traditionnelle en raison de ses bienfaits perçus pour la santé, et leur fonctions biologiques ont longtemps été décrits dans la médecine traditionnelle chinoise. A la lumière de ces données, nous avons choisis d'étudier les métabolites secondaires de ce champignon.

Les travaux d'extraction par deux solvants « Dichlorométhane et l'Acétate d'éthyle » suivie de la chromatographie analytique sur couche mince ont montré la richesse de *Pleurotus eryngii* en métabolites secondaires. L'extrait de dichlorométhane ainsi que d'acétate d'éthyle ont montré un pouvoir antioxydant, l'activité est testé *in vitro* par la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Au cours de nos travaux, nous avons pu isoler quatre produits de ce champignon, La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la chromatographie sur colonne de gel de silice.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, extraction, métabolites secondaires, pouvoir antioxydant, chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonne.

Abstract:

This work is part of the study of the fungus *Pleurotus eryngii* called Oyster mushroom harvested in the region of Hammame grouz-Oued el Athmania (wilaya of Mila) north-east of Algeria, is an edible mushroom widely cultivated, it has a long history of use in traditional medicine because of its perceived health benefits, and their biological function have long been described in traditional Chinese medicine. In light of these data, we have chosen to study the secondary metabolites of this fungus.

Extraction work with two solvent “Dichloromethane and Ethyl acetate” followed by analytical thin-layer chromatography showed the richness of *Pleurotus eryngii* in secondary metabolites. The extract of dichloromethane as well as of ethyl acetate showed an antioxidant power, the activity is tested in vitro by the capability of trapping the free radical DPPH. In the course of our work, we were able to isolate four products from this fungus. The purification methodology was essentially based on silica gel column chromatography.

Key words: *Pleurotus eryngii*, extraction, secondary metabolites, antioxidant power, thin layer chromatography, column chromatography.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة الفطر *Pleurotus eryngii* الذي يدعى Pleurote du panicaut حصد في منطقة حمام قروز العثمانية (ولاية ميله) هوفطر صالح للأكل ينمو على نطاق واسع، وله تاريخ طويل من الاستخدام في الطب التقليدي لما له من فوائد ينظر لها على الصحة، وقد عرفت الوظائف البيولوجية الخاصة به منذ فترة طويلة في الطب الصيني التقليدي. على ضوء هذه المعطيات اخترنا دراسة المركبات الثانوية لهذا الفطر.

اظهرت أعمال الاستخلاص باثنين من المذيبات "كلوريد الميثيلين و خلات الإيثيل"، و الدراسة بالطبقة الرقيقة (CCM) ثراء هذا الفطر بالمركبات الثانوية، المستخلصين كلوريد الميثيلين و خلات الإيثيل اظهرا نشاط مضاد للأكسدة تم اختباره عن طريق قدرة كبح الجذر الحر DPPH . خلال عملنا، تمكنا من عزل أربعة منتجات من هذه الفطريات، منهجية التنقية تقوم أساسا على اللوني على العمود هلام السليكا.

الكلمات المفتاحية:

Pleurotus eryngii، الاستخلاص، المركبات الثانوية، CCM ، نشاط مضاد للأكسدة، اللوني على العمود هلام السليكا.

Année universitaire : 2016/2017

Présenté par : DJAFAR Imen
MENZRI Imene

EXTRACTION ET PURIFICATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DU CHAMPIGNON ALGÉRIEN *PLEUROTUS ERYNGII* ET ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE.

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

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du champignon « *Pleurotuseryngii* » appelée Pleurote du panicaut récolté dans le région de Hammamegrouz- oued el Athmania (wilaya de Mila) au nord-est d'Algérie, est un champignon comestible largement cultivé, il a une longue histoire d'utilisation dans la médecine traditionnelle en raison de ses bienfaits perçus pour la santé, et leur fonctions biologiques ont longtemps été décrits dans la médecine traditionnelle chinoise. A la lumière de ces données, nous avons choisis d'étudier les métabolites secondaires de ce champignon.

Les travaux d'extraction par deux solvants « Dichlorométhane et l'Acétate d'éthyle » suivie de la chromatographie analytique sur couche mince ont montré la richesse de *Pleurotus eryngii* en métabolites secondaires. L'extrait de dichlorométhane ainsi que d'acétate d'éthyle ont montré un pouvoir antioxydant, l'activité est testé *in vitro* par la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Au cours de nos travaux, nous avons pu isoler quatre produits de ce champignon, La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la chromatographie sur colonne de gel de silice.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, extraction, métabolites secondaires, pouvoir antioxydant, chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonne.

Laboratoire de recherche : laboratoire de biochimie

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mr. Bousba.B	M.C.B
Encadreur :	Mr. Bouaninba.N.	M.C.B
Co.encadreur :	Mme. Teniou	M.A.A

Date de soutenance : 22/06/2017