

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU



Domaine : **Science de la matière**
Filière : **Chimie**
Spécialité : **Chimie Pharmaceutique**

Mémoire de Master

Thème

**Extraction des alcaloïdes à partir des graines du *Datura innoxia*
Evaluation du potentiel insecticide**

Présenté par :

M^{elle} OUKHELIFA Nouara

M^r SAIDANE Ouramdane

Soutenu publiquement, le 13 / 07 / 2023, devant le Jury composé de :

BOUGHRARA Dalila	Professeure	UMMTO	Présidente
MEZIANE Dalila	Professeure	UMMTO	Encadrante
IBOUKHOULEF Hamida	MCA	UMMTO	Examinatrice
LOUADJ Larbi	Docteur	UMMTO	Co-encadrant
BENOUFELLA-KITOUS Karima	Professeure	UMMTO	Invitée

Session 2022 / 2023

Remerciements

Nous souhaitons témoigner notre reconnaissance la plus vive à notre encadrante, Madame MEZIANE Dalila, Professeure au sein de l'UMMTO. Nous admirons profondément la qualité de son encadrement de ce mémoire, sa collaboration enrichissante et sa sympathie. Nous vous adressons notre profonde admiration pour vos qualités humaines et scientifiques, qui sont pour nous une source d'inspiration.

Nos remerciements vont également à notre co-encadrant, Monsieur LOUADJ Larbi, Docteur en Pharmacie. Nous apprécions le partage de ses connaissances et de ses expériences, ainsi que son soutien, sa disponibilité et ses conseils tout au long de ce projet.

Nous tenons à exprimer notre gratitude spéciale à Madame BENOUFELLA-KITOUS Karima, Professeure à l'UMMTO, pour son soutien précieux et son aide considérable tout au long de notre travail. Votre contribution significative a grandement enrichi notre recherche, et nous vous sommes profondément reconnaissants pour votre générosité et votre expertise. Votre soutien inestimable a été d'une importance capitale, et nous vous adressons nos remerciements les plus sincères.

Nous remercions également Madame MOHELLEBI Dalila, Professeure au sein de l'UMMTO, d'avoir accepté l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire. Nous vous témoignons notre sincère gratitude et notre profond respect.

A Madame IBOUKHOULEF Hamida, Maître de conférence classe A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail. Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en siégeant parmi notre jury. Recevez ici le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.

A madame IDRIS Imane, Maître de conférence classe B à l'UMMTO, pour son soutien précieux et sa contribution exceptionnelle à l'élaboration de ce mémoire.

A tous ceux qui nous ont accompagnés tout au long de notre cursus universitaire, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce modeste travail. Vous avez notre reconnaissance la plus sincère.

Dédicaces

Je désire exprimer ma profonde gratitude et mon affection sincère envers ceux à qui je dédie humblement ce travail :

À mes chers parents, aucune parole ne saurait véritablement traduire l'étendue de l'amour et de la reconnaissance que je nourris à votre égard. Votre soutien et vos encouragements constants tout au long de mes années d'études ont forgé l'individu que je suis aujourd'hui. Que Dieu tout-puissant vous préserve en santé, vous comble de bonheur et vous accorde une longue vie.

À mon frère Rachid et ma sœur Thanina, pour leur soutien moral inébranlable et leurs encouragements inlassables, je souhaite un avenir rayonnant, empli de joie et de fraternité.

À mes oncles, mes tantes et à ma chère grand-mère Horia, pour leurs encouragements et leur soutien indéfectibles.

À mes merveilleux amis qui, de près ou de loin, m'ont soutenu tout au long de mon parcours, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mon sincère respect.

À tous ceux qui me sont chers, votre présence dans ma vie a été une source inestimable d'inspiration et de motivation.

Nouara



Dédicaces

A mes parents.

Ouramdane

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Partie théorique.....	3
1 Généralités sur la <i>Datura</i>	3
1.1 Présentation du Genre <i>Datura</i> L.....	3
1.1.1 Origine et répartition	3
1.1.2 Composition chimique	3
1.2 Présentation de l'espèce étudiée « <i>Datura innoxia</i> »	4
1.2.1 Taxonomie.....	4
1.2.2 Description botanique	4
1.3 Effets de l'extrait du <i>Datura</i>	5
2 Les alcaloïdes.....	7
2.1 Définition des alcaloïdes	7
2.2 Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes	7
2.3 Classification	8
2.3.1 Les alcaloïdes vrais	8
2.3.2 Les protoalcaloïdes	8
2.3.3 Les pseudoalcaloïdes.....	9
2.4 Alcaloïdes tropaniques	9
2.4.1 Définition	9
2.4.2 Propriétés pharmacologiques	10
2.4.3 Biosynthèse	12
2.5 Extraction.....	14
2.5.1 Extraction en milieu alcalin.....	14
2.5.2 Extraction en milieu acide.....	14
2.6 Analyse qualitative et quantitative	16
3 Aperçu bibliographique sur <i>Aphis fabae</i>	17
3.1 Position systématique	17
3.2 Description.....	17
3.3 Dégâts causés par <i>Aphis fabae</i>	18
3.4 Moyens de lutte	18
3.4.1 Lutte préventive.....	18
3.4.2 Lutte curative.....	19

Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	20
1 Matériels	20
1.1 Verrerie, équipements et autres	20
1.2 Réactifs et produits	20
2 Méthodes.....	22
2.1 Vérification de l'identité de la plante	22
2.1.1 Récolte et conservation du matériel végétal.....	22
2.1.2 Etude botanique de la plante	22
2.2 Préparation de l'extrait brut.....	24
2.3 Screening phytochimique	24
2.3.1 Recherche des alcaloïdes.....	25
2.3.2 Recherche des flavonoïdes	25
2.3.3 Recherche de tanins.....	26
2.3.4 Recherche des sucres réducteurs	26
2.4 Extraction des alcaloïdes	27
2.4.1 Extraction au soxhlet.....	27
2.4.2 Extraction assistée par sonication	28
2.4.3 Extraction assistée par microondes	28
2.5 Analyse qualitative et quantitative	28
2.5.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
2.5.2 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible	29
2.5.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	30
2.6 Evaluation de l'activité antioxydante	30
2.7 Dosage des polyphénols	32
2.8 Etude de l'effet bioinsecticide des extraits végétaux.....	32
2.8.1 Plante hôte : la fève <i>Vicia fabae</i>	33
2.8.2 Puceron noir de la fève <i>Aphis fabae</i>	33
2.8.3 Mode opératoire	33
Chapitre III : Résultats et Discussion.....	36
1 Etude botanique de la plante	36
1.1 Etude histo-anatomique	36
1.2 Etude de la drogue pulvérisée.....	39
2 Screening phytochimique.....	41
3 Extraction des alcaloïdes.....	43

4	Analyse qualitative et quantitative.....	44
4.1	Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	44
4.2	Analyse par spectrophotométrie UV-Visible	45
4.3	Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	46
5	Evaluation de l'activité antioxydante.....	47
6	Dosage des polyphénols.....	48
7	Effet bioinsecticide des extraits végétaux.....	49
7.1	Effet de la dose sur l'efficacité de l'extrait sur les populations d' <i>A. fabae</i>	49
7.2	Effet du temps sur l'efficacité de l'extrait sur les populations d' <i>A. fabae</i>	50
7.3	Effet de la nature de l'extrait sur les populations d' <i>A. fabae</i>	52
	Conclusion.....	53
	Références bibliographiques.....	55
	Annexes.....	58

Liste des figures

Chapitre I : Partie théorique

Figure I.1 : Morphologie du <i>Datura innoxia</i> : port, fruit, fleur et graines (originale, 2023) ...	5
Figure I.2 : Usambarensine ; exemple d'alcaloïdes vrais.....	8
Figure I.3 : Mescaline ; un exemple de protoalcaloïdes	9
Figure I.4 : Pinidine ; exemple de pseudoalcaloïdes	9
Figure I.5 : Structure de base du noyau tropanique	10
Figure I.6 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'atropine et l'hyoscyamine	12
Figure I.7 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'hyoscyamine et la scopolamine ...	13
Figure I.8 : Adulte ailé (<i>à gauche</i>) et adulte aptère (<i>à droite</i>) d' <i>Aphis fabae</i> Erreur ! Signet non défini.	
Figure I.9 : Schéma représentatif des dégâts causés par <i>Aphis fabae</i>	18

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Figure II.1 : Schéma représentatif des étapes de la double coloration.....	23
Figure II.2 : Réaction générale de réduction de la DPPH en DPPH-H	31
Figure II.3 : Méthode d'infestation et de traitement des plants de fève (Originale, 2023).	35

Chapitre III : Résultats et Discussion

Figure III.1 : Aspect général d'une coupe transversale de la feuille du <i>Datura</i> observée au microscope au G10x10.....	36
Figure III.2 : Coupe anatomique de la nervure principale du <i>Datura</i> observée au microscope au G10x10	37
Figure III.3 : Coupe anatomique du limbe du <i>Datura</i> observée au microscope au G10x10..	38
Figure III.4 : Poil sécréteur observés au microscope optique au G10x40	38
Figure III.5 : Poils tecteurs observés au microscope optique au G10x10	38
Figure III.6 : Macles d'oxalate de calcium observés au microscope optique au G10x40	38
Figure III.7 : Fragment d'épiderme avec stomates observé au microscope au G10x10.....	40
Figure III.8 : Vue microscopique de l'élément étranglé caractéristique du poil tecteur du <i>Datura</i>	40
Figure III.9 : Tête d'un poil sécréteur observée au microscope au G10x40.....	40
Figure III.10 : Poil tecteur pluricellulaire observé au microscope au G10x40.....	40
Figure III.11 : Débris de vaisseaux rayés observés au microscope au G10x10	40
Figure III.12 : cristaux d'oxalates de calcium observés au niveau de la feuille du <i>Datura</i> via le microscope au G10x40.....	40
Figure III.13 : Débris de vaisseaux spiralés observés au microscope au G10x10.....	40
Figure III.14 : Caractérisation des sucres réducteurs.....	42
Figure III.15 : Caractérisation des alcaloïdes.	42
Figure III.16 : Caractérisation des tanins.....	42

Figure III.17 : Caractérisation des flavonoïdes.....	42
Figure III.18 : Résidu sec d'alcaloïdes totaux.....	43
Figure III.19 : Séparation chromatographique (par CCM) des alcaloïdes tropaniques majoritaires extraits des graines du <i>Datura innoxia</i>	44
Figure III.20 : Courbe d'étalonnage pour le dosage UV-Vis des alcaloïdes.....	45
Figure III.21 : Pic chromatographie de l'échantillon obtenu par extraction aux microondes.	46
Figure III.22 : Pic chromatographie du Standard (Sulfate d'atropine).....	46
Figure III.23 : Pic chromatographie de l'extrait du soxhlet	46
Figure III.24 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'atropine dans les extraits d'alcaloïd..	46
.....	46
Figure III.25 : Graphique représentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de l'extrait testé.	47
Figure III.26 : Courbe d'étalonnage pour la quantification des polyphénols.....	48
Figure III.27 : Taux de mortalité des populations d'A. fabae traités par l'extrait brut de <i>Datura innoxia</i> en fonction de la dose.....	49
Figure III.28 : Taux de mortalité des populations d'A. fabae traités par l'extrait d'alcaloïdes en fonction de la dose.....	50
Figure III.29 : Taux de mortalité des populations d'A. fabae traités par l'extrait brut de <i>Datura innoxia</i> en fonction du temps.	51
Figure III.30 : Taux de mortalité des populations d'A. fabae traités par l'extrait d'alcaloïdes en fonction du temps.	51
Figure III.31 : Variation du taux de mortalité des populations d'A. fabae selon l'extrait testé.	52

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les propriétés des alcaloïdes tropaniques majeurs	11
Tableau I.2 : Méthodes d'extraction d'alcaloïdes	15
Tableau II.1 : Verrerie, équipements et autres matériels utilisés.....	20
Tableau II.2 : Produits et réactifs utilisés.	21
Tableau III.1 : Résultats du screening phytochimique de l'extrait brut des graines du <i>Datura innoxia</i>	41

Liste des abréviations

A : Extrait d'alcaloïdes ;
B : Extrait Brut ;
CCM : Chromatographie sur couche mince ;
CG : Chromatographie en phase gazeuse ;
CL : Chromatographie liquide ;
CL50 : Concentration létale 50 ;
CLHP : Chromatographie liquide à haute performance ;
CYP 450 : Cytochrome P450 ;
DL50 : Dose létale 50 ;
DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
E : Echantillon ;
EAM : Extraction assistée par micro-ondes ;
G : Grossissement ;
K : facteur K : coefficient d'absorption molaire ;
L. : Linné ;
M : Molarité ;
Mr : Masse molaire ;
N : Normalité ;
ND : Non déterminé ;
PI : Pourcentage d'inhibition ;
ppm : Partie par million ;
R% : Rendement ;
R² : Coefficient de corrélation ;
R_f : Rapport frontal ;
T : Témoin ;
UV : Ultraviolet ;
W : Watt.

Introduction

Le règne végétal est, depuis la nuit des temps, le puit à partir duquel l'humanité a puisé des remèdes aux différents maux qui la tracassent. Des plantes aux propriétés extraordinaires ont pourvu l'humanité en médicaments, cosmétiques, agents phytochimiques...etc.

Le *Datura*, une plante de la famille des solanacées, est un des végétaux aux pouvoirs exceptionnels reconnu et exploité à travers les âges. Il est traditionnellement connu pour ses propriétés psychotropes et sa grande toxicité, en témoigne la multitude de noms à connotation mystique ou occulte qu'on lui donne à travers le monde ; on parle d'herbe aux fous ou d'herbe aux sorcières en France, de "devil's trumpets" (trompes du diable) dans les pays anglophones ou de hebala dans certaines régions d'Algérie, pour ne citer que ceux-là. Le *Datura* est aujourd'hui exploité pour ses propriétés pharmacologiques liées aux grandes quantités d'alcaloïdes qu'il renferme [1].

Les alcaloïdes, sont une famille de composés chimiques dont les différentes molécules se retrouvent communément au sein des végétaux. Les alcaloïdes les plus populaires sont : la caféine, la nicotine et la cocaïne, qui partagent tous un suffixe commun en -ine, caractéristique des alcaloïdes, et qui sont essentiellement connus pour leur pouvoir excitant et pour la forte dépendance qu'ils peuvent susciter [2].

Dans le cas du *Datura*, les alcaloïdes majoritairement présents sont l'atropine et la scopolamine, dont les concentrations varient d'un genre de *Datura* à un autre et selon les différentes parties de la plante. Dans l'industrie pharmaceutique, l'atropine est notamment utilisée comme collyre sous forme de sel de sulfate d'atropine, et la scopolamine est utilisée comme anticholinergique sous forme de butylscopolamine (butylbromure d'hyoscine) [2].

Avant de connaître ces divers usages que l'être humain en a fait, les alcaloïdes sont principalement un moyen de défense pour les plantes qui les synthétisent. En effet, grâce à leur toxicité, les alcaloïdes constituent le rempart naturel idéal contre les éventuels insectes ravageurs qui pourraient attaquer les plantes qui les produisent [3].

Ce travail est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre traite de la partie théorique et aborde les généralités concernant la plante du *Datura*, les alcaloïdes ainsi que *Aphis fabae*, l'insecte sur lequel les tests seront effectués pour déterminer le pouvoir insecticide.

Le deuxième chapitre est dédié à la partie pratique où sont détaillés les différents procédés et protocoles utilisés pour l'identification de la plante, l'extraction et la caractérisation des alcaloïdes, ainsi que l'évaluation du pouvoir insecticide.

Les principaux résultats obtenus sont présentés et discutés dans le dernier chapitre.



CHAPITRE I

PARTIE THEORIQUE



1 Généralités sur la *Datura*

1.1 Présentation du Genre *Datura* L.

1.1.1 Origine et répartition

L'origine des *Daturas* est un sujet de controverse. Certains auteurs suggèrent que les *Daturas* ont des origines variées, allant de l'Europe méridionale à l'Amérique méridionale. Ils se sont ensuite propagés dans les régions chaudes, tempérées et tropicales.

Cependant, d'autres auteurs se basant sur les récentes études taxonomiques, affirment que toutes les espèces de *Datura* sont originaires du Mexique et réfutent la possibilité de leur présence dans l'ancien monde avant la période précolombienne.

Le *Datura* a été introduit en Europe via l'Espagne au début du XVIème siècle. Les premiers plants ont été transmis par les Tsiganes, ce qui lui a valu l'appellation d'herbe des gitans. Cette plante s'est ensuite répandue en Afrique du Nord.

Les *Daturas* sont des plantes présentes de manière spontanée en Algérie, avec une répartition cosmopolite dans différents environnements tels que les bords de route, les décombres et les cultures. Elles ont une préférence pour les sols argileux, légèrement basiques et humides, ainsi que pour les expositions ensoleillées. Le genre *Datura* est constitué de plusieurs espèces, parmi lesquelles cinq ont été identifiées à l'état spontané en Algérie par Houmani-Benhizia (1999) : *Datura ferox* L, *Datura innoxia* Mill, *Datura quercifolia* Humb, *Datura stramonium* L et *Datura tatula* L. [4].

1.1.2 Composition chimique

Les espèces variées du genre *Datura* se distinguent par la présence d'une diversité de composés, comprenant des alcaloïdes, des terpénoïdes, des stéroïdes, des glycosides, des acides gras, des composés phénoliques, ainsi que différents terpènes volatils [5].

Les espèces de *Datura* sont particulièrement riches en alcaloïdes tropaniques, dont l'hyoscine, l'hyoscyamine et l'atropine, présents à des concentrations variables dans les différentes parties de la plante. La concentration en alcaloïdes varie également selon la partie de la plante et les différentes phases de croissance, les feuilles ayant une concentration maximale en phase végétative et diminuant rapidement en phase générative [6].



1.2 Présentation de l'espèce étudiée « *Datura innoxia* »

1.2.1 Taxonomie

Classe : Dicotylédones ;

Sous-classe : Astérides ;

Ordre : Solanales ;

Famille : Solanacées ;

Genre : *Datura* ;

Espèce : *Datura innoxia*.

1.2.2 Description botanique

C'est une plante herbacée, autogame, souvent confondue avec le *Datura metel*. Elle se trouve communément dans des terrains vagues, le long des routes et dans les champs, et peut même être utilisée à des fins ornementales.

Le *Datura* est une plante annuelle rustique qui fleurit de juillet à octobre. Elle pousse en touffes atteignant jusqu'à 120 cm de hauteur et possède une tige puissante de couleur vert-jaunâtre. Les feuilles sont alternes et ovales, avec un large pétiole pubescent, et dégagent une odeur désagréable. Les grandes fleurs solitaires, de couleur blanche ou lilas, sont plissées en forme d'entonnoir. Les tiges sont visqueuses au toucher et protégées par des poils. Le fruit, est une capsule épineuse ovoïde composée de quatre valves s'ouvrant au sommet pour libérer une colonne centrale contenant de nombreuses graines brun clair (figure 1). Les alcaloïdes tropaniques sont présents dans toutes les parties de la plante [4, 7, 8].



Figure I.1 : Morphologie du *Datura innoxia* : port, fruit, fleur et graines (originale, 2023)

1.3 Effets de l'extrait du *Datura*

L'extrait végétal est un produit ou une préparation obtenus suite au traitement d'une drogue végétale par un solvant. Il peut avoir une forme liquide, semi-solide ou solide [9].

L'extrait de *Datura* est utilisé à diverses fins. Il agit comme un anesthésique en raison de ses propriétés de blocage des récepteurs muscariniques. De plus, il s'est révélé efficace dans le traitement des affections respiratoires et digestives, ainsi que dans la cicatrisation des plaies. Certaines études in vivo suggèrent même qu'il pourrait avoir des effets sur la destruction des cellules cancéreuses. On lui attribue également des propriétés antioxydantes, qui aident à prévenir les dommages cellulaires [10].

En outre, l'extrait présente des effets antimicrobiens qui lui permettent d'inhiber la croissance de bactéries et de champignons pathogènes. Des expériences ont même démontré son efficacité



dans la prévention et la gestion de maladies des plantes telles que la maladie du virus de la mosaïque du tabac.

En tant qu'allié précieux dans la lutte contre les animaux et les insectes nuisibles, cet extrait est utilisé comme insecticide pour repousser et éliminer divers insectes tels que les chenilles, les acariens et les mouches domestiques. De plus, son efficacité est améliorée lorsqu'il est combiné à d'autres extraits [10].



2 Les alcaloïdes

Les métabolites secondaires sont des composés organiques synthétisés par les plantes, jouant un rôle crucial dans leur adaptation à l'environnement. Parmi ces métabolites, les alcaloïdes se distinguent en tant que composés essentiels dans la réponse des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques.

De plus, ces métabolites secondaires sont largement exploités dans divers domaines tels que la médecine et l'industrie alimentaire, leur conférant ainsi une importance économique considérable [3].

2.1 Définition des alcaloïdes

Au début du XIXe siècle, W. Meissner a utilisé le terme "alcaloïde" pour décrire des substances naturelles qui manifestent des propriétés basiques [2].

Aujourd'hui, les alcaloïdes sont reconnus comme un ensemble de composés chimiques complexes, provenant des plantes, d'animaux ou de micro-organismes, caractérisés par leur structure hétérocyclique contenant de l'azote. Ils se distinguent par leur activité physiologique puissante et leur fréquente toxicité [11].

2.2 Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés chimiques avec des masses moléculaires variant de 100 à 900 daltons. Contrairement à la plupart des bases non oxygénées qui sont liquides à température ambiante, les bases alcaloïdes contenant de l'oxygène sont principalement des solides cristallins, rarement colorés. Ces bases cristallines ont la capacité de polariser la lumière et présentent des points de fusion bien définis, généralement inférieurs à 200 °C

Les alcaloïdes bases présentent généralement une solubilité faible à négligeable dans l'eau, mais ils sont solubles dans des solvants organiques apolaires ou peu polaires, ainsi que dans les alcools à des taux élevés. La basicité des alcaloïdes est étroitement liée à la disponibilité du doublet libre de l'azote et peut varier. Les groupements électroattracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent leur basicité, tandis que les groupements électrodonneurs l'augmentent.

Les alcaloïdes peuvent former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates), selon leur basicité. Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, cristallisables et ont une bonne



stabilité, ce qui en fait la forme commerciale habituelle. En solution et à l'état de base, les alcaloïdes sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène [2].

2.3 Classification

Les alcaloïdes sont classés en fonction de leurs précurseurs moléculaires et de la voie biologique utilisée pour les former. Structuralement, ils sont divisés en trois principaux types : les alcaloïdes vrais, les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes [11].

2.3.1 Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais sont des composés chimiques dérivés des acides aminés, caractérisés par un hétérocycle contenant de l'azote. Ils ont une activité biologique significative même à de faibles doses et sont hautement réactifs. Ces alcaloïdes, généralement solides et de couleur blanche (à l'exception de la nicotine qui est un liquide brun), ont un goût amer et peuvent former des sels solubles dans l'eau. Ils se distinguent par leur structure complexe résultant de la condensation d'acides aminés décarboxylés avec une partie non azotée. Parmi les alcaloïdes vrais biologiquement actifs, on retrouve la cocaïne et l'usambarensine (figure 2) [11].

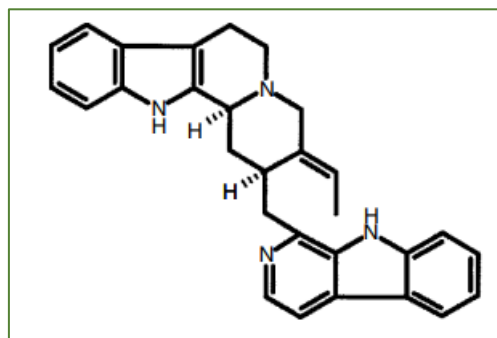


Figure I.2 : Usambarensine ; exemple d'alcaloïdes vrais [11].

2.3.2 Les protoalcaloïdes

Les protoalcaloïdes sont des alcaloïdes qui se distinguent par la présence d'un atome d'azote provenant d'un acide aminé, mais qui ne fait pas partie de l'anneau hétérocyclique caractéristique des autres alcaloïdes. Le L-tryptophane et le L-tyrosine sont les principaux précurseurs de ces protoalcaloïdes. Ils se caractérisent par leur structure relativement simple et constituent une minorité parmi les diverses classes d'alcaloïdes. La mescaline (figure 3), ayant de fortes propriétés psychoactives et hallucinogène en est un exemple [2,11].

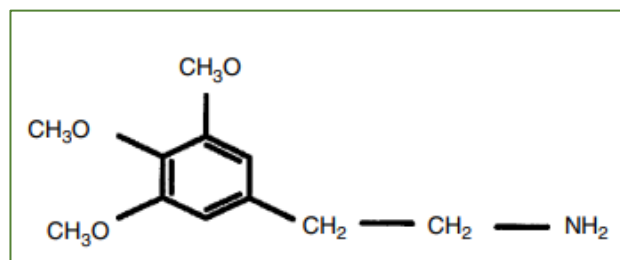


Figure I.3 : Mescaline ; un exemple de protoalcaloïdes [11].

2.3.3 Les pseudoalcaloïdes

Les pseudoalcaloïdes sont des composés qui se distinguent par le fait que leur structure carbonée de base n'est pas dérivée des acides aminés. Ces pseudoalcaloïdes appartiennent principalement à la classe des alcaloïdes terpéniques, qui sont des composés isoprénoïdes. Ils sont étroitement associés aux voies métaboliques des acides aminés, utilisant soit les précurseurs, soit les produits intermédiaires de ces voies par le biais de réactions d'amination ou de transamination. De plus, ces composés peuvent également être dérivés de précurseurs qui ne sont pas issus des acides aminés. La pinidine (figure 4) est un exemple de ces alcaloïdes [2, 11, 12].

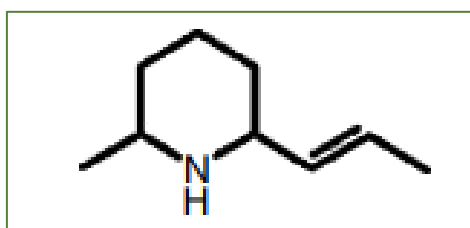


Figure I.4 : Pinidine ; exemple de pseudoalcaloïdes [11].

2.4 Alcaloïdes tropaniques

2.4.1 Définition

Les alcaloïdes tropaniques ; qui font partie des alcaloïdes vrais, sont un groupe de composés chimiques présents dans environ 250 espèces végétales. Leur structure caractéristique est l'azabicyclo[3.2.1]octane-8, dérivée de L-ornithine et/ou L-arginine.

Ces alcaloïdes sont classifiés en deux principaux groupes en fonction de la position du substituant sur le carbone 3 : les 3a-hydroxytropanes, où le groupe hydroxy est en position axiale, et les 3b-hydroxytropanes, où le groupe hydroxy est en position équatoriale. Ils sont synthétisés à partir de la tropinone par l'action de deux enzymes, la tropinone réductase

I et la tropinone réductase II. On les retrouve dans différentes familles végétales notamment dans les Solanaceae et les Erythroxylaceae [2,13].

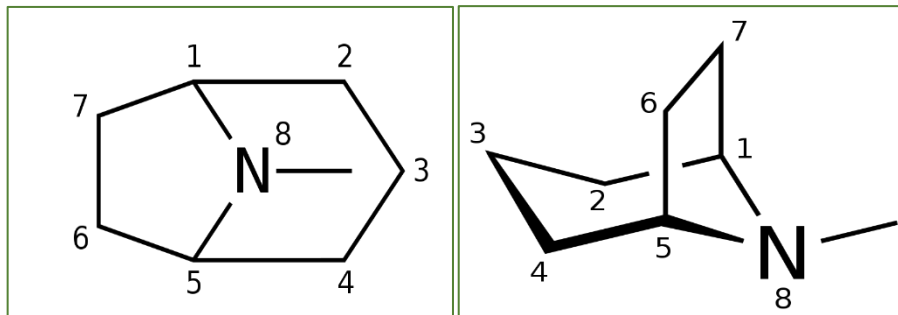


Figure I.5 : Structure de base du noyau tropanique [2].

L'hyoscyamine et la scopolamine sont les alcaloïdes les plus caractéristiques de ce groupe [13], (voir Tableau 1).

2.4.2 Propriétés pharmacologiques

Les alcaloïdes tropaniques sont des antagonistes compétitifs de l'acétylcholine, bloquant sa liaison aux récepteurs muscariniques. Ils sont utilisés pour leurs effets sur le système gastro-intestinal, bronchique, génito-urinaire et pupillaire, et sont classés comme des agents parasympholytiques. Certains de ces alcaloïdes, présents dans des espèces de la famille des Solanaceae, ont également des effets pharmacologiques sur le système nerveux central, expliquant leur utilisation historique en tant que substances narcotiques, hallucinogènes et toxiques [14].



Tableau I.1 : Les propriétés des alcaloïdes tropaniques majeurs [10,15].

Nom de la molécule	Description	Formule moléculaire	Propriétés physicochimiques	Nom IUPAC	Structure chimique
Atropine	Un ester formé par la réaction du tropanol avec l'acide tropique. L'atropine existe sous forme de mélange racémique.	$C_{17}H_{23}NO_3$	Cristal blanc ou incolore, soluble dans le chloroforme et l'éthanol, mais insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole et l'eau.	(8-Methyl-8-oxido-8-azoniabicyclo[3.2.1]octan-3-yl) 3-hydroxy-2-phenyl-propanoate	
Hyoscyamine	Un ester de l'acide tropique gauche et du tropanol. Est une substance lévogyre qui s'isomérisse facilement en atropine, dépourvue de pouvoir rotatoire. Elle a la même action que l'atropine mais deux fois plus active.	$C_{17}H_{23}NO_3$	Cristal blanc en forme d'aiguille, soluble dans les acides dilués, le chloroforme, l'éthanol et d'autres solvants organiques, insoluble dans l'éther ou l'eau froide.	(8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl) (2 S) 3-hydroxy-2-phenyl-propanoate	
Scopolamine	Un ester de l'acide tropique gauche du scopanol(un époxytropanol).	$C_{17}H_{21}NO_4$	Poudre cristalline blanche, inodore, amère, soluble dans l'éthanol et les acides dilués, soluble dans le chloroforme, l'eau, l'éther et le benzène.	9-Methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0(2,4)]nonan-7-ol (-)-alpha-(hydroxymethyl) benzèneacétate	

2.4.3 Biosynthèse

La biosynthèse de l'atropine (figure 6) commence par la formation de la putrescine à partir de l'arginine et de l'ornithine. La putrescine est ensuite méthylée pour produire la N-méthylputrescine. Cette dernière subit une cyclisation spontanée pour former le N-méthylpyrrolinium, point de départ de la synthèse des tropanes. À partir de la L-phénylalanine, une transamination conduit à la formation de l'acide phénylpyruvique, qui est réduit en acide phényllactique. Ensuite, l'acide phényllactique est couplé avec la tropine par l'intermédiaire de la coenzyme A pour former la littorine. Sous l'action d'une enzyme P450, la littorine subit un réarrangement radical pour se transformer en aldéhyde d'hyoscyamine. Enfin, cet aldéhyde est réduit en un alcool primaire, formant l'hyoscyamine qui subit une racémisation pour donner naissance à l'atropine [16].

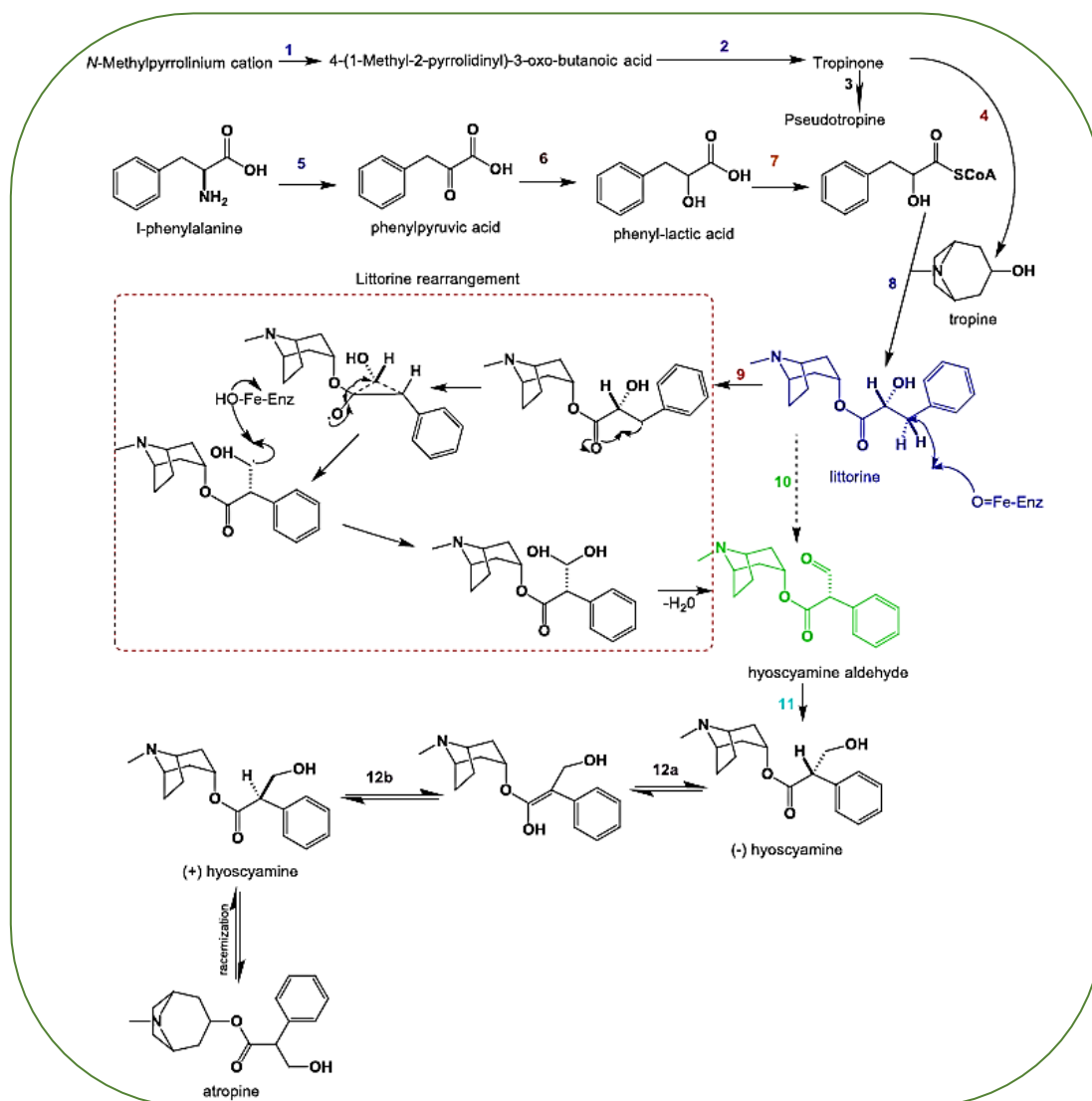


Figure I.6 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'atropine et l'hyoscyamine [16]

La biosynthèse de la scopolamine (figure 7) comprend plusieurs étapes interconnectées. L'ornithine subit d'abord une décarboxylation pour former de la putrescine, qui est ensuite méthylée en N-méthylputrescine. La déamination de la N-méthylputrescine produit du 4-méthylaminobutanal, qui se cyclise spontanément en un cation de N-méthylpyrrolium. Ce cation réagit avec de l'acide acétoacétique pour former de l'hygrine, qui subit une réorganisation pour donner de la tropinone. Par l'action de l'enzyme tropinone réductase I, la tropinone est réduite en tropine. La tropine réagit ensuite avec du phényllactate dérivé de la phénylalanine pour former de la littorine. Sous l'influence du cytochrome P450 Cyp80F1, la littorine est oxydée et réarrangée en aldéhyde hyoscyamine. Enfin, l'hyoscyamine subit une série d'hydroxylation et d'époxydation catalysées par l'enzyme hyoscyamine 6 β -hydroxylase, ce qui aboutit à la formation de la scopolamine [16].

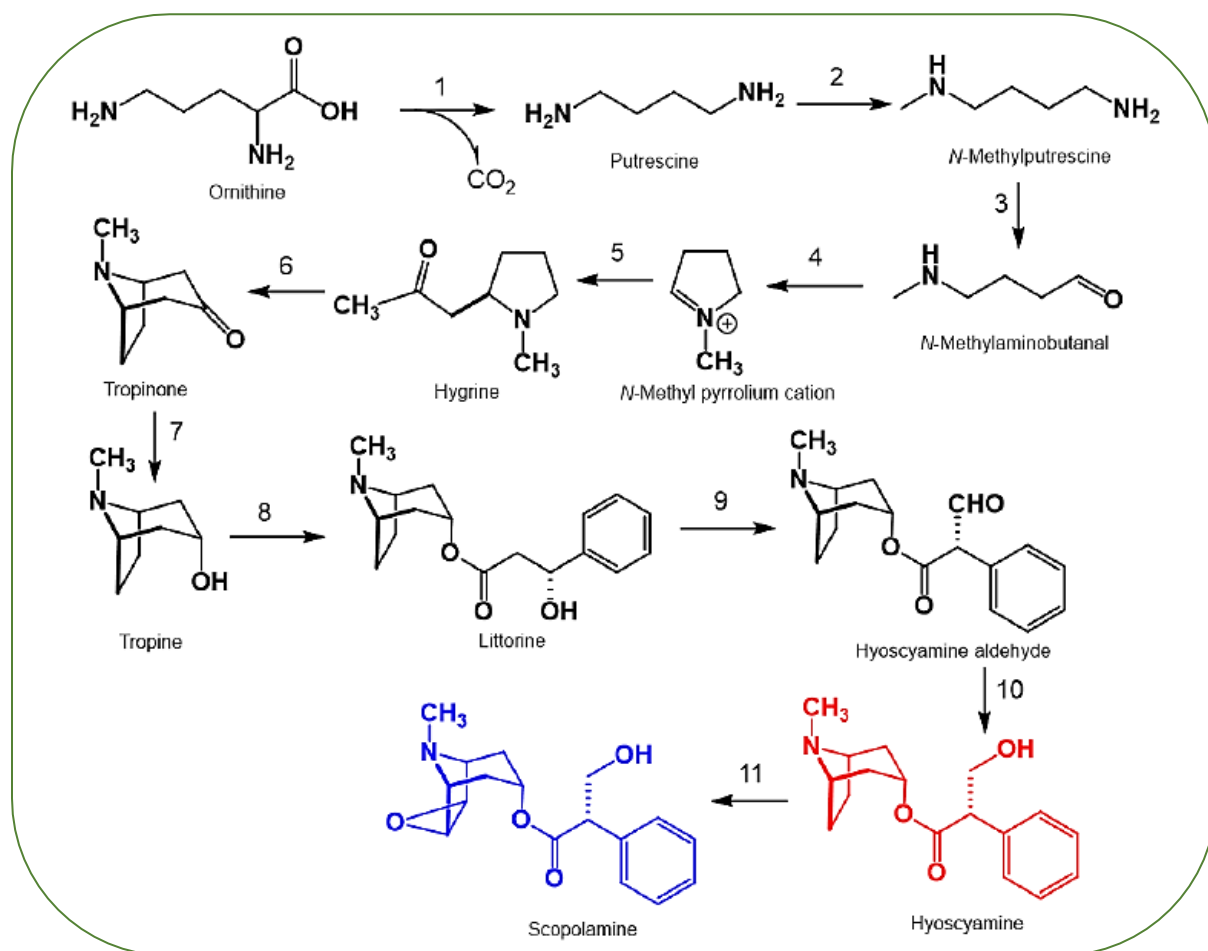


Figure I.7 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'hyoscyamine et la scopolamine [16]



2.5 Extraction

Les alcaloïdes peuvent être extraits sous forme de sels ou sous leur forme basique.

L'extraction peut se faire en milieu alcalin ou acide en utilisant un solvant organique ou aqueux [2].

2.5.1 Extraction en milieu alcalin

La plante ou sa partie pulvérisée et délipidée est mélangée à une solution aqueuse alcaline. Les bases libérées sont ensuite extraites par un solvant organique. L'extraction peut être réalisée par simple contact ou par contacts multiples (Soxhlet) [2].

2.5.2 Extraction en milieu acide

Dans ce cas, l'extraction peut être effectuée par macération à l'aide d'eau, d'une solution alcoolique ou d'une solution hydroalcoolique acidifiées. Les sels d'alcaloïdes peuvent être récupérés en alcalinisant la solution, suivie d'une extraction par un solvant apolaire, ou en les fixant sélectivement sur une résine échangeuse d'ions puis en les éluant à l'aide d'un acide fort [2].

Dans la littérature, plusieurs procédés ont été décrits pour l'extraction des alcaloïdes à partir des plantes, l'efficacité diffère selon la solvant et la méthode employés.

Parmi les différentes méthodes pouvant être utilisées, on retrouve l'extraction au soxhlet, aux ultrasons et aux micro-ondes, comme figuré dans le tableau 2.



Tableau I.2 : Méthodes d'extraction d'alcaloïdes [14]

Méthodes	Principe	Avantages	Inconvénients
Extraction au soxhlet	Son principe repose sur un processus de percolation cyclique qui permet de dissoudre et de récupérer le composé d'intérêt à partir d'un échantillon.	<ul style="list-style-type: none">✓ Contact rapide entre l'échantillon et le solvant favorisant le transfert du composé.✓ Pas besoin de filtration post-extraction.✓ Sélectivité pour extraire certains composés.	<ul style="list-style-type: none">✓ Durée d'extraction importante.✓ Grande quantité de solvant consommée.✓ Risque de dégradation thermique pour les composés thermolabiles.
Extraction assistée par sonication	Il repose sur l'utilisation d'ondes ultrasonores permettant de générer des conditions physiques favorisant la rupture des parois cellulaires, l'augmentation de la surface de contact et la diffusion des molécules cibles à partir de la matrice vers le solvant d'extraction.	<ul style="list-style-type: none">✓ Augmentation du rendement et accélération de la cinétique d'extraction.✓ Utilisation de températures relativement basses pour préserver les composés.	<ul style="list-style-type: none">✓ Efficacité dépendante de la nature de la matrice végétale✓ Impossibilité de renouveler le solvant pendant le processus.✓ Étape limitante : filtration et rinçage post-extraction.
Extraction assistée par microondes (MAE)	Usage de l'énergie des micro-ondes pour chauffer un échantillon solide immergé dans un solvant. Les micro-ondes, provoquent la rotation dipolaire et la conduction ionique des molécules polaires et des espèces ioniques présentes dans l'échantillon. Cette interaction génère de la chaleur, facilitant ainsi l'extraction des analytes de la matrice.	<ul style="list-style-type: none">✓ Rapidité accrue✓ Efficacité améliorée✓ Préservation des composés thermosensibles	<ul style="list-style-type: none">✓ Dépendance à la nature de la matrice✓ Besoin d'équipements spécifiques✓ Optimisation des paramètres requise



2.6 Analyse qualitative et quantitative

Les techniques d'analyse des alcaloïdes comprennent à la fois des méthodes qualitatives et quantitatives. Pour la caractérisation qualitative des alcaloïdes, les réactions générales de précipitation sont utilisées, en se basant sur leur capacité à former des complexes avec des métaux et des métalloïdes. Les réactifs de Mayer, Bouchardat et Dragendorff, considérés comme des réactifs généraux d'alcaloïdes, sont couramment utilisés dans ces réactions. La chromatographie sur couche mince (CCM) est une autre méthode qualitative utilisée pour la séparation des alcaloïdes dans un échantillon, en utilisant des révélateurs tels que le réactif de Dragendorff, la solution iodo-iodurée ou l'iodoplatinate de potassium pour visualiser les taches d'alcaloïdes sur les plaques.

En ce qui concerne les méthodes quantitatives, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la méthode privilégiée. L'HPLC permet la séparation, l'identification et la quantification précise des alcaloïdes en mesurant les aires des pics correspondants dans le chromatogramme.

En complément, d'autres méthodes quantitatives, comme les méthodes gravimétriques et les dosages volumétriques par acidimétrie directe ou en retour, peuvent être utilisées pour estimer la quantité totale d'alcaloïdes dans un échantillon. De plus, les méthodes spectrophotométriques, fluorimétriques et densitométriques exploitent les propriétés optiques et de fluorescence des alcaloïdes, et peuvent également être employées [2,17].

3 Aperçu bibliographique sur *Aphis fabae*

Les pucerons, présents dans des régions allant des tropiques aux steppes tempérées et subtropicales, sont des insectes répandus dans le monde. Leur influence néfaste sur l'agriculture s'est amplifiée en raison de leur incroyable aptitude à s'adapter aux plantes, les propulsant ainsi au rang supérieur parmi les nuisibles ayant un impact des plus dévastateurs sur le secteur agricole à l'échelle mondiale. Parmi ces espèces polyphages, se trouve le puceron noir de la fève *Aphis fabae* [18].

3.1 Position systématique

Classe : Insectes

Sous-classe : Ptérygotes

Ordre : Homoptères

Famille : Aphididae

Genre : *Aphis*

Espèce : *Aphis fabae* [19].

3.2 Description

Aphis fabae existe sous deux formes distinctes, à savoir aptère et ailée.

La forme aptère (figure 9) est de petite taille, mesurant environ 2 mm, avec un corps trapu, de couleur noire à mat verdâtre et présentant trois paires de taches blanches sur l'abdomen. En revanche, la forme ailée (figure 8) possède un corps plus allongé. Ses antennes sont courtes, représentant environ les deux tiers de la longueur du corps. L'abdomen de cette forme ailée est foncé, avec des taches blanches et des sclérites marginales noires. Les cornicules sont courtes et noires. La cauda est courte, trapue et noire [20].



Figure I.8 : Adulte ailé (à gauche) et adulte aptère (à droite) d'*Aphis fabae* [21]

3.3 Dégâts causés par *Aphis fabae*

Le puceron noir de la fève peut causer des dommages directs et indirects en raison de son mode de nutrition, comme le montre la figure 10.

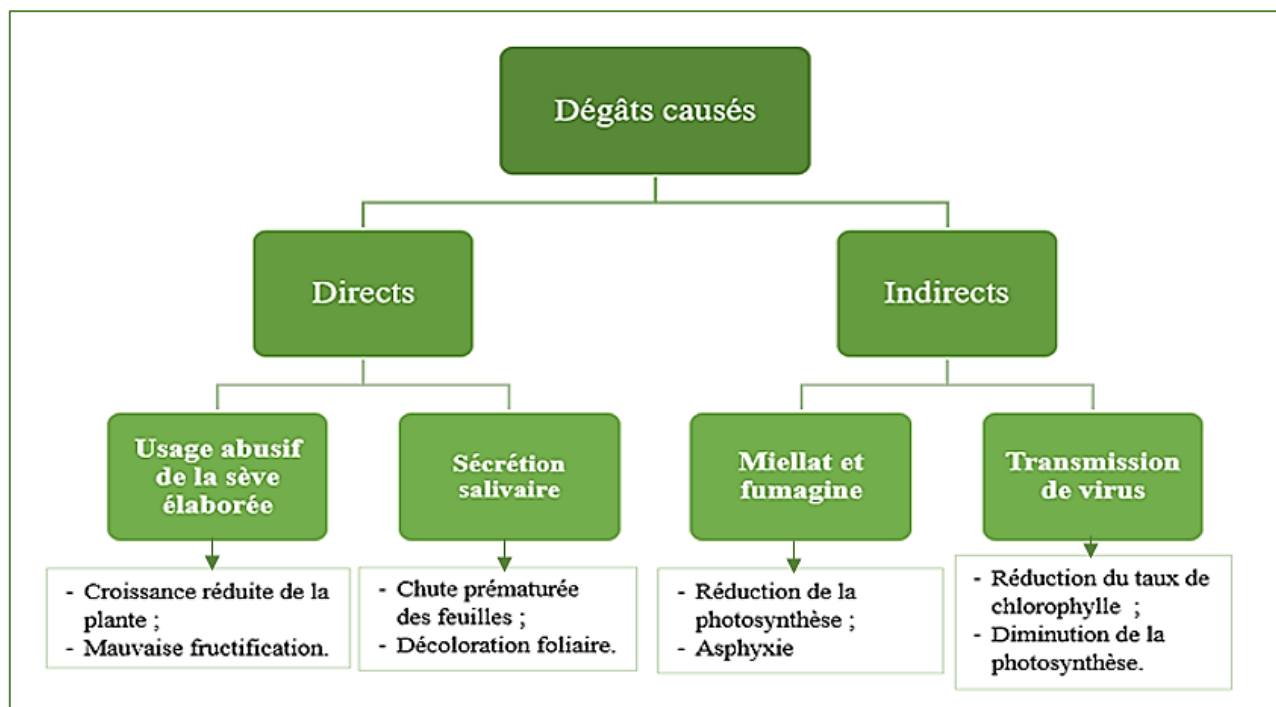


Figure I.9 : Schéma représentatif des dégâts causés par *Aphis fabae* [18,22]

3.4 Moyens de lutte

La lutte contre les pucerons noirs implique la mise en place de stratégies variées visant à réduire leurs populations et à minimiser les dommages causés. Ces stratégies englobent à la fois des approches préventives et curatives.

3.4.1 Lutte préventive

La mise en place de pratiques culturales adaptées constitue la meilleure méthode préventive pour lutter contre les ravageurs. Ces pratiques incluent entre autres la sélection d'une période de semis et de récolte appropriée, la rotation des cultures, l'élimination des plantes sauvages qui pourraient héberger des espèces nuisibles, et l'association de plantes compagnes pour perturber la localisation des pucerons. À titre d'exemple, l'association de fèves avec des céréales permet de réduire la contamination par *Aphis fabae* [23, 24].



3.4.2 Lutte curative

3.4.2.1 Lutte chimique

Les pesticides demeurent le moyen le plus répandu pour combattre les nuisibles, mais leur utilisation doit être guidée par la nécessité de préserver les espèces utiles. Il est donc crucial d'opter pour des insecticides chimiques qui soient sélectifs, efficaces et qui présentent une rémanence importante. De plus, pour éviter ou retarder l'apparition de résistance chez les ravageurs, il est recommandé d'utiliser des produits appartenant à des familles chimiques différentes. Enfin, l'utilisation de pesticides systémiques est préconisée pour cibler efficacement les pucerons, y compris ceux qui sont dissimulés dans les feuilles enroulées [22].

Compte tenu de leur impact potentiel sur la santé humaine et l'environnement, les insecticides chimiques ont suscité des préoccupations croissantes. En conséquence, la science agricole a commencé à se tourner vers des méthodes de lutte plus respectueuses de l'environnement et durables, notamment la lutte biologique.

3.4.2.2 Lutte biologique

Il existe plusieurs prédateurs naturels qui peuvent être utilisés de manière écologique pour contrôler les populations de pucerons. Les coccinelles, par exemple, pondent jusqu'à 20 œufs par jour près des colonies de pucerons. Leurs larves et adultes ont une capacité de consommation allant jusqu'à 100 pucerons par jour. Les chrysopes et leurs larves sont également très efficaces, étant capables de dévorer jusqu'à 500 pucerons par jour. Bien que les syrphes soient principalement des butineurs pollinisateurs, leurs larves peuvent dévorer environ 40 à 50 pucerons chaque jour. Les larves de parasitoïdes, quant à elles, vivent aux dépens des pucerons et sont très efficaces pour leur contrôle. L'un des parasitoïdes les plus couramment utilisés dans la lutte biologique contre les pucerons est *Aphidius* sp. [18, 25].

Les plantes ont également développé des composés métaboliques secondaires qui ont des propriétés insecticides, aseptiques ou régulent la croissance des plantes et des insectes pour se protéger des herbivores. Dans la lutte contre le puceron noir, différents biopesticides sont utilisés, tels que les biofertilisants à base de thé de vermicompost, qui ont eu un impact sur la fécondité et la disponibilité des populations d'*Aphis fabae*. De plus, les extraits phénoliques et terpénoïdes bruts provenant de feuilles de *Carissa macrocarpa* ont montré des taux de mortalité de 46,4 % et 52,3 % pour les adultes exposés à une concentration de 10 mg/mL d'extraits phénoliques et terpénoïdes bruts pendant 48 heures [26-28].



CHAPITRE II

Matériels et méthodes



1 Matériels

1.1 Verrerie, équipements et autres

La verrerie, les équipements ainsi que les autres matériels utilisés dans ce travail sont résumés dans le tableau (4) ci-dessous :

Tableau II.1 : Verrerie, équipements et autres matériels utilisés.

Verrerie	Equipements	Autres
<ul style="list-style-type: none">• Fioles jaugées ;• Béchers ;• Pipettes graduées ;• Eprouvettes ;• Entonnoirs ;• Tubes à essai ;• Pipettes pasteur• Erlenmeyers ;• Ampoules à décanter ;• Flacons ombrés ;• Lames et lamelles ;• Mortier ;• Flacons	<ul style="list-style-type: none">• Broyeur électrique;• Sonicateur ;• Soxhlet ;• Evaporateur rotatif ;• Centrifugeuse ;• Plaque chauffante ;• Balance analytique ;• Microscope optique ;• Spectrophotomètre UV-VIS ;• HPLC ;• Microondes ;• pH-mètre ;• Agitateur magnétique.	<ul style="list-style-type: none">• Filtre membrane;• Papiers filtres ;• Papier aluminium ;• Pissettes ;• Spatules ;• Para film ;• Barreaux magnétiques ;• Plaques CCM ;• Loupes ;• Pinceaux ;• Aiguilles,• Lame de rasoir ;• Boîtes de Pétri ;• Thermomètre ;• Cartouche en cellulose ;• Pots en plastique ;• Tourbe ;• Gravier ;• Protections en tulle.

1.2 Réactifs et produits

Les produits et réactifs utilisés sont illustrés dans le tableau (5) qui suit :



Tableau II.2 : Produits et réactifs utilisés.

Réactifs et produits	Fournisseurs	Données physicochimiques	Réactifs et produits	Fournisseurs	Données physicochimiques
Sulfate d'atropine monohydrate	BIOCHEM	Mr = 405,46 g/mol Pureté ≥ 98% N° CAS :5908-99-6	Réactif Folin-Ciocalteu	SIGMA-ALDRICH	Pureté : 2M N° CAS :7647-01-0
Diethyl ether	Fisher Chemical	Mr = 74,12 g/mol Pureté ≥ 99,5% N° CAS : 60-29-7	Thiourée	MERCK	Mr = 76,12 g/mol Pureté ≥ 98% N° CAS :62-56-6
Ammoniaque	SIGMA-ALDRICH	Mr = 35,05 g/mol Pureté : 30-33% N° CAS : 1336-21-6	Carbonate de sodium	FLUKA	Mr = 106 g/mol Pureté ≥ 99,5% N° CAS :497-19-8
Acide acétique	SCHARLAU	Mr = 60,05 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :64-19-7	Acide sulfurique	Honeywell	Mr = 98,08 g/mol Pureté : 95-98% N° CAS :7664-93-9
Ether de pétrole	LOBA CHIMIE	Mr = 86,18 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :64742-49-0	Sulfate de sodium anhydre	FLUKA	Mr = 142,04 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :7757-82-6
Dichlorométhane	Fisher Chemical	Mr = 84,93 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :75-09-2	Sulfure de sodium	FLUKA	Mr = 78,04 g/mol Pureté ≥ 98% N° CAS :1313-84-4
Acide chlorhydrique	SIGMA-ALDRICH	Mr = 36,46 g/mol Pureté : 36-38% N° CAS :7647-01-0	Trichlorure de fer	Prolabo	Mr = 162,2 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :7705-08-0
Acide nitrique	PANREAC	Mr = 63,01 g/mol Pureté : 53% N° CAS :7697-37-2	Dichlorure de mercure	FLUKA	Mr = 271,52 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :7487-94-7
Méthanol	Honeywell Riedel-de Haën	Mr = 32,04 g/mol Pureté ≥ 99,7% N° CAS : 67-56-1	Hydroxyde de potassium	SCHARLAU	Mr = 56,10 g/mol Pureté ≥ 99,5 N° CAS :1310-58-3
DPPH	SIGMA-ALDRICH	Mr = 394,32 g/mol Pureté ≥ 90% N° CAS :1898-66-4	Iodure de potassium	SCHARLAU	Mr = 166 g/mol Pureté ≥ 99% N° CAS :7681-11-0



2 Méthodes

2.1 Vérification de l'identité de la plante

La vérification de l'identité de la plante *Datura* a été réalisée au laboratoire de pharmacognosie, à la faculté de médecine de Tizi-Ouzou, et ce, en cherchant les caractères de reconnaissance de la plante pour éviter toute confusion et falsification.

2.1.1 Récolte et conservation du matériel végétal

Les plantes ont été récoltées par nos soins en octobre 2022, dans les environs du col de Chellata, situé entre les communes d'Ililten (Tizi-Ouzou) et de Chellata (Bejaïa). Les fruits ont été décortiqués et les graines ont été séchées à l'air libre.

2.1.2 Etude botanique de la plante

2.1.2.1 Etude histo-anatomique

La technique de la double coloration (vert d'iode – rouge congo) a été effectuée sur des coupes histologiques au niveau des feuilles, et ce afin de déceler au microscope optique les diverses caractéristiques morphologiques et anatomiques de la plante.

➤ Réalisation des coupes transversales :

Après avoir réalisé des coupes transversales minces des feuilles de *Datura* (au niveau de la région centrale du limbe) à l'aide d'une lame de rasoir, celles-ci ont été placées dans une boîte de Petri contenant de l'eau distillée. Cette étape avait pour but de préserver les tissus et d'éviter leur dessèchement. Ensuite, une double coloration a été réalisée.

➤ Technique de la double coloration :

La double coloration (figure 11) permet de préciser l'anatomie et de déterminer les caractéristiques de l'organe en question :

- Les sections sont immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant au moins 20 minutes pour détruire le contenu cellulaire, éliminer les pigments et les inclusions, et ne laisser que les parois squelettiques ;
- Après un lavage minutieux à l'eau distillée, les échantillons sont immergés dans une solution d'acide acétique pour neutraliser le réactif alcalin utilisé précédemment ;



- Les coupes sont soumises par la suite à une coloration en deux étapes distinctes. Dans un premier temps, elles sont imprégnées de vert d'iode pendant 3 minutes, ce qui confère une teinte verte aux tissus lignifiés et scléreux présents dans les échantillons. Puis, les coupes sont délicatement rincées à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de colorant. Dans un second temps, une deuxième coloration est réalisée en utilisant du rouge Congo pendant 10 minutes, ce qui permet de colorer les tissus cellulotiques en rose. Afin d'arrêter l'action du colorant, les coupes sont ensuite soigneusement lavées à l'eau distillée.
- Pour prévenir la déshydratation, les coupes sont maintenues dans de l'eau distillée, les meilleures sont sélectionnées et sont délicatement placées entre une lame et une lamelle, en ajoutant une petite goutte d'eau. Cela permet de les observer au microscope optique à différents niveaux de grossissement.

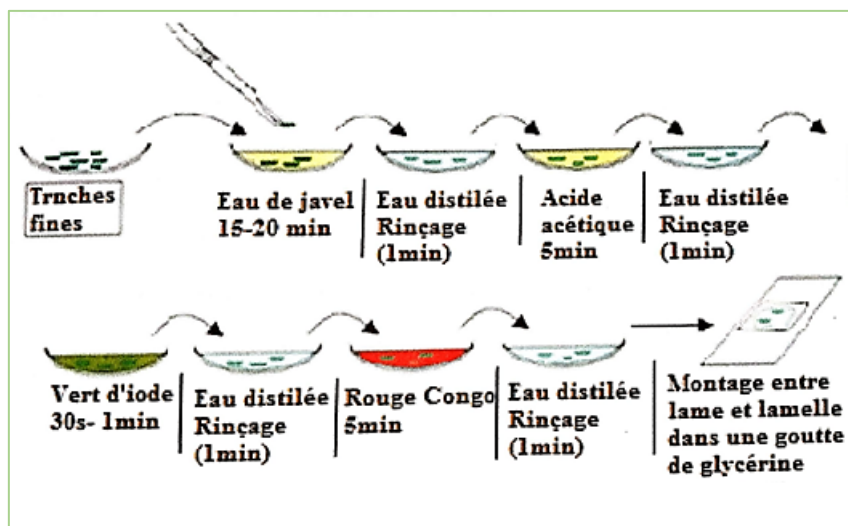


Figure II.1 : Schéma représentatif des étapes de la double coloration.

2.1.2.2 Etude de la poudre L'étude de la poudre d'une plante est un moyen de diagnose qui permet de chercher les éléments caractéristiques de la drogue non mis en évidence par les coupes anatomiques.

➤ **Protocol expérimental**

Après avoir broyé minutieusement les feuilles sèches de la plante médicinale à l'aide d'un mortier, une fine couche de la poudre de *Datura* a été préparée et traitée avec le réactif de Gazet Le Chatelier, placée entre une lame et une lamelle. Les observations ont été réalisées en utilisant un microscope optique aux grossissements 10×10 et 10×40. Sous l'effet du réactif de Gazet Le



Chatelier, tous les constituants de la poudre végétale subissent des transformations visibles, se rendant transparents ou prenant des colorations spécifiques :

- Les éléments lignifiés tels que les vaisseaux du bois, les fibres, les cellules scléreuses et certains types de poils, prennent une teinte jaune-vert très claire.
- Les éléments subérifiés sont colorés en rouge brun.
- Les lipides, les huiles essentielles, les résines et le latex se teintent en rouge orangé.
- L'amidon révèle une coloration allant du bleu foncé au noir, suite à l'interaction avec l'iode.

2.2 Préparation de l'extrait brut

Après broyage de 50 g de graines du *Datura innoxia* à l'aide d'un broyeur électrique, la fine poudre obtenue est macérée dans 200 ml d'eau acidifiée par l'acide acétique à un pH = 5, dans un erlenmeyer, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 72 heures. L'extrait brut de l'étude est obtenu après filtration.

2.3 Screening phytochimique

Les réactions de caractérisation ont impliqué la réalisation d'un ensemble de tests visant à rechercher et détecter qualitativement les principaux phytoconstituants présents dans l'extrait, connu sous le nom de screening ou criblage phytochimique. Ces tests permettent d'obtenir des informations préliminaires sur la composition chimique en utilisant des procédures standard telles que décrites par la littérature selon Trease et Evans [29] ainsi que Harborne [30].

Les résultats obtenus ont été évalués selon les critères suivants :

- ❖ Réaction fortement positive : +++
- ❖ Réaction moyennement positive : ++
- ❖ Réaction faiblement positive : +
- ❖ Réaction négative : -
- ❖ Réaction non déterminée : ND

Les tests de caractérisation reposent sur l'emploi de réactifs adaptés qui induisent des réactions de précipitation ou de coloration. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux données présentes dans la littérature pour évaluer la composition chimique de la plante.



2.3.1 Recherche des alcaloïdes

La mise en évidence des alcaloïdes repose sur une approche prédominante qui implique leur précipitation à l'aide des "réactifs généraux des alcaloïdes". Cette méthode se fonde sur la propriété des alcaloïdes à former des complexes insolubles avec des métalloïdes, donnant ainsi lieu à la formation de précipités colorés spécifiques, permettant ainsi leur détection.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Réactif de Mayer (solution iodo-mercurique de potassium) ;
- Réactif de Bouchardat (solution iodo-iodurée) ;
- Réactif de Dragendorff (solution iodo-bismuthique de potassium).

❖ Protocole expérimental

1 ml de chaque réactif a été ajouté à 1 ml de l'extrait brut à analyser.

La présence d'alcaloïdes dans l'échantillon se manifeste par l'apparition des précipités suivants :

- Réactif de Mayer : précipité de couleur blanc-jaunâtre
- Réactif de Bouchardat : précipité de couleur brun
- Réactif de Dragendorff : précipité de couleur orange

2.3.2 Recherche des flavonoïdes

La révélation des flavonoïdes se fait par une réaction avec la potasse. Ils réagissent avec les alcalis et se colorent en jaune vif.

❖ Protocole expérimental

1 ml de l'extrait brut a été introduit dans un tube à essai, auquel 1 ml d'une solution aqueuse de KOH a été ajouté.

L'apparition d'une coloration jaune vif indique la présence de flavonoïdes.

La caractérisation des flavonoïdes est réalisée par une réaction spécifique appelée "réaction à la cyanide".



La réaction repose sur la capacité de réduction du noyau flavonoïdique en présence de métaux en milieu acide. Elle se base sur l'obtention de colorations spécifiques du noyau après réduction par l'hydrogène libéré.

❖ Protocole expérimental

1 ml de l'extrait a été introduit dans un tube à essai, suivi de quelques centigrammes de magnésium métallique (Mg) et de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). Le mélange a été laissé à réagir pendant 3 minutes dans un bain d'eau froide afin d'éviter toute élévation de la température et une réaction trop violente (réaction exothermique).

L'apparition d'une coloration spécifique du noyau flavonoïdique indique la présence de flavonoïdes :

- Rouge cerise : flavonols
- Orange : flavones
- Rouge violacé : flavanones
- Absence de coloration : chalcones

2.3.3 Recherche de tanins

❖ Protocole expérimental

1 ml de l'extrait préalablement placé dans un tube à essai a été mélangé avec 1 ml de la solution aqueuse de trichlorure de fer ($FeCl_3$) à 1%, et une coloration a été observée.

Les résultats sont exprimés de la manière suivante : en présence de tanins galliques (hydrolysables), une coloration bleu noirâtre se développe, tandis qu'avec les tanins catéchiques (condensés), la couleur vire au brun verdâtre.

2.3.4 Recherche des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont des sucres simples capables de donner des électrons dans une réaction d'oxydoréduction, tels que le glucose, le fructose et le maltose.

Il repose sur la réduction de l'oxyde cuivrique CuO (de couleur bleue en milieu basique) contenu dans la liqueur de Fehling par les sucres présents dans une solution, formant ainsi de petits grains rouges-briques d'oxyde cuivreux Cu_2O .



❖ Protocol expérimental

Après l'ajout de 2 ml de la liqueur de Fehling (1 ml de solution A + 1 ml de solution B) à 2 ml de l'extrait déjà introduits dans un tube à essai, l'ensemble a été placé dans un bain-marie bouillant pendant 8 minutes.

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

2.4 Extraction des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes peut être réalisée par diverses méthodes :

2.4.1 Extraction au soxhlet

Une fine poudre homogène a été obtenue en broyant 50 g de graines de la plante à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre est laissée macérer dans 200 ml d'éther de pétrole pendant 4 heures à température ambiante et sous agitation magnétique afin d'être délipidée.

Après délipidation, l'éther de pétrole chargé en matière grasse a été éliminé par filtration et le marc est alcalinisé avec une solution de 40 ml d'ammoniaque à 0.5N pendant plus de 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, pour permettre la conversion des alcaloïdes de leur forme sel à leur forme base.

L'extraction des alcaloïdes au Soxhlet a été réalisée avec 300 ml de dichlorométhane, en effectuant 5 cycles de 30 minutes chacun, tout en maintenant la température entre 55 °C et 60°C.

Une fois l'opération terminée, l'extrait a été concentré puis lavé par l'acide sulfurique à 0.5N (3 fois). Les volumes récupérés ont été combinés et alcalinisés en ajoutant quelques gouttes d'une solution d'ammoniaque jusqu'à l'atteinte d'un pH de 9.

Après transfert de la solution dans une ampoule à décanter, une extraction par l'éther diéthylique a été réalisée (3 répétitions). Les volumes obtenus ont été recueillis dans un ballon préalablement pesé en passant à travers un papier filtre soutenant du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer les traces d'eau.

Après évaporation du solvant, un résidu sec est obtenu et qui représente les alcaloïdes totaux extraits [2].



2.4.2 Extraction assistée par sonication

Une fine poudre homogène a été obtenue en broyant 25 g de graines de la plante à l'aide d'un broyeur électrique. Ensuite, la poudre a été délipidée par macération dans 100 ml d'éther de pétrole, sous agitation magnétique pendant 4 heures, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le marc récupéré après filtration est mis dans un ballon avec 200 ml de méthanol. Le ballon est placé dans un bain à ultrasons à une fréquence de 20 kHz pendant 3 heures à 25 °C. Après élimination du solvant, le marc a été traité avec 100 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 3% (pH de 1 à 2), et laissé pendant 24 heures.

Après filtration, la solution est lavée l'éther de pétrole (3x100 ml). La phase aqueuse est alcalinisée à un pH de 9 à 10 en y ajoutant quelques millilitres d'une solution aqueuse d'ammoniac (NH_4OH) à 30%, afin de faire passer les alcaloïdes de leur forme sel à leur forme base.

Ces derniers sont ensuite extraits avec le dichlorométhane (3x100 ml). Après séchage sur le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et évaporation du solvant, un résidu sec d'alcaloïdes est obtenu sous leur forme basique [31].

2.4.3 Extraction assistée par microondes

Le protocole suivi est similaire à celui de l'extraction assistée par ultrasons, la seule différence réside dans le mode d'extraction : au lieu d'être soumis aux ultrasons, le marc a été exposé à trois cycles de micro-ondes pendant 10 secondes chacun, à une puissance de 300W. Il était important de refroidir la solution entre chaque cycle afin d'éviter que la température du solvant ne dépasse son point d'ébullition [31].

2.5 Analyse qualitative et quantitative

Après extraction, il est primordial d'analyser et de caractériser l'échantillon obtenu sur les plans qualitatif et quantitatif :

2.5.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de détecter la présence d'atropine dans l'extrait, une chromatographie sur couche mince a été réalisée en utilisant une plaque en gel de silice. La phase mobile est un mélange d'ammoniaque concentré, eau et acétone, dans un rapport de 3:7:90 (V/V/V). Le standard



utilisé, le sulfate d'atropine monohydraté, était une poudre blanche provenant de la société "BIOCHEM". Le standard et l'extrait ont été dissous dans du méthanol, et la révélation des tâches a été faite par le réactif de Dragendorff [32].

2.5.2 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

❖ **Protocole expérimental**

➤ **Traitement des échantillons**

Dans un tube à essai, 5 ml de la solution d'alcaloïdes ont été prélevés. Ensuite, quelques gouttes d'acide chlorhydrique ont été ajoutées pour acidifier la solution à un pH de 2 à 2,5. Les alcaloïdes présents dans l'extrait ont été précipités en ajoutant 2 ml de réactif de Drangendorff, formant ainsi un complexe entre l'alcaloïde et le bismuth présent dans le réactif.

Une centrifugation est effectuée à 6000 tr/min pendant 3 minutes pour séparer complètement le précipité du solvant. La vérification de la précipitation complète des alcaloïdes est réalisée en ajoutant quelques gouttes supplémentaires du réactif de Drangendorff. Le filtrat a ensuite été éliminé, et le précipité obtenu est traité avec 2 ml d'une solution à 1% de sulfure de sodium (Na_2S) pour libérer le bismuth complexé avec les alcaloïdes.

Le précipité noir obtenu est centrifugé à 6000 tr/min pendant 3 minutes. La confirmation de la précipitation complète des alcaloïdes est réalisée en ajoutant deux gouttes de la solution de sulfure de sodium à 1%. Une fois le filtrat éliminé, le précipité a été dissous avec 2 ml d'acide nitrique concentré, en chauffant si nécessaire. La solution a été diluée à 10 ml avec de l'eau distillée.

Ensuite, 1 ml de cette solution a été prélevé, auquel 5 ml d'une solution de thiourée à 3% ont été ajoutés. Cela a donné une solution de couleur jaune due à la formation du complexe bismuth-thiourée. L'absorbance de l'échantillon a ensuite été mesurée par spectrophotométrie UV-Visible à 464 nm [33].

➤ **Courbe d'étalonnage**

La courbe d'étalonnage a été générée en utilisant la solution mère de nitrate de bismuth pentahydraté. À partir de cette solution, neuf autres solutions ayant un volume de 10 ml chacune ont été préparées en prélevant respectivement 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 ml de la solution mère, puis en complétant avec de l'eau distillée.



Ensuite, une quantité de 1 ml de chaque solution étalon a été prélevée, à laquelle 5 ml de solution de thiourée ont été ajoutés. L'absorbance de chaque solution jaune a été mesurée à 464 nm par rapport à des blancs contenant uniquement les réactifs [33].

2.5.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse par HPLC a été réalisée au laboratoire de Chimie analytique de la faculté de Médecine (UMMTO).

L'extrait sec contenant les alcaloïdes totaux et le standard de sulfate d'atropine ont été dissous dans du méthanol de qualité HPLC.

Les échantillons ont été analysés par HPLC en phase inversée tel décrit par Hosseini, N. et al [34], en utilisant une phase mobile composée d'un tampon d'acide orthophosphorique dihydrogène de potassium ajusté à un pH de 3,0 avec de l'acide orthophosphorique, mélangé avec de l'acétonitrile dans un rapport de 80:20 v/v. La phase mobile a été pompée à un débit constant de 1 ml/min en mode isocratique, et la détection a été effectuée à une longueur d'onde de 215 nm

La concentration d'atropine est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie en utilisant des solutions d'alcaloïdes commerciaux de concentrations connues.

2.6 Evaluation de l'activité antioxydante

❖ Principe

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est une molécule connue comme étant un radical libre stable en raison de la délocalisation de son électron libre à travers toute la molécule, ce qui l'empêche de se dimériser comme le font les autres radicaux libres. Cette délocalisation est responsable de sa couleur violette profonde, qui se manifeste par une bande d'absorption autour de 520 nm.

Lorsque le DPPH est mélangé à une substance capable de fournir un atome d'hydrogène, il est réduit, ce qui entraîne la perte de sa couleur violette (on observe plutôt une couleur jaune pâle en raison de la présence du groupe picryle -figure 12-).

En notant le radical DPPH comme Z^\bullet et la molécule donneuse comme AH, la réaction primaire peut être exprimée de la manière suivante : $Z^\bullet + AH = ZH + A^\bullet$ [35].

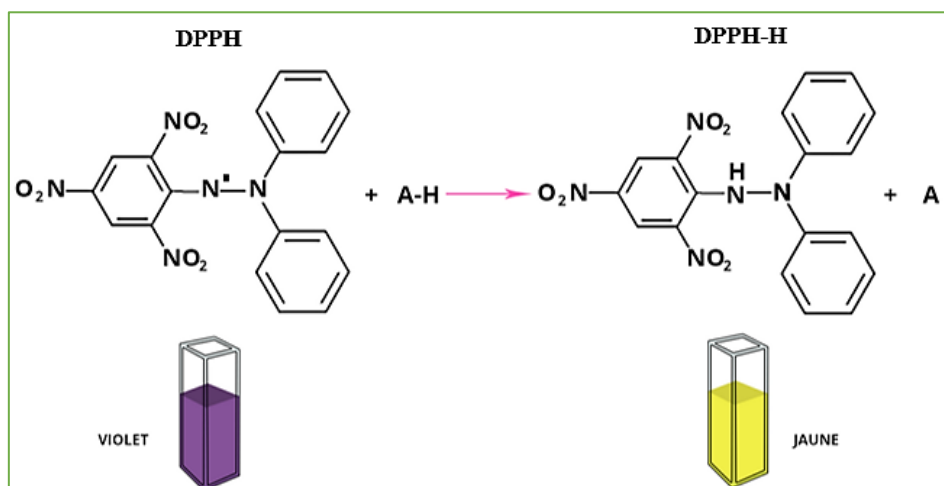


Figure II.2 : Réaction générale de réduction de la DPPH en DPPH-H [36].

❖ Mode opératoire

Un volume de 4 ml d'une solution de DPPH (0,04 mg/ml) a été mélangé avec 1 ml d'extrait. Après une incubation d'une heure à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm. L'activité antiradicalaire a été quantifiée en utilisant les valeurs PI (% d'inhibition), qui ont été calculées en comparant la diminution de l'absorption de la solution de test DPPH-extrait par rapport à l'absorption de l'échantillon de référence (contrôle) où un volume équivalent de solvant a été ajouté à la solution de DPPH [37].

La préparation des échantillons et les contrôles ont été réalisés de la manière suivante :

- Echantillon : 4 ml de DPPH + 1 ml d'extrait à tester :
 - Echantillon ₁ : 4 ml de DPPH + 1 ml d'extrait brut
 - Echantillon ₂ : 4 ml de DPPH + 1 ml de sulfate d'atropine (1mg/ml)
- Contrôle : 4 ml de DPPH + 1 ml du solvant :
 - Contrôle ₁ : 4 ml de DPPH + 1 ml d'eau acidifiée
 - Contrôle ₂ : 4 ml de DPPH + 1 ml de méthanol
- Témoin positif (standard de référence) : 4 ml de DPPH + 1 ml d'acide ascorbique (1mg/ml)

La formule suivante a été utilisée pour déterminer les valeurs PI (%) :

$$\text{PI (\% d'inhibition)} = \left(\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \right) \times 100$$

Avec : - Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle

- Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon [37].



2.7 Dosage des polyphénols

❖ Principe

Le dosage des phénols totaux est basé sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques. Cette réaction conduit à la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'ajout de carbonate de sodium (NaCO_3) [38,39].

Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

❖ Protocole expérimental

Après avoir mélangé 0,5 ml d'échantillon de plante avec 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10% dans un tube à essai, le mélange a été laissé reposer pendant 10 minutes à 25 °C après avoir été vigoureusement agité pendant 30 secondes. Ensuite, 2 ml de carbonate de sodium anhydre à 7,5% ont été ajoutés à la solution. Le contenu du tube à essai a été à nouveau agité pendant 30 secondes.

Les tubes à essai ont été incubés dans un bain-marie à 40 °C pendant 30 minutes, permettant ainsi le développement d'une couleur caractéristique. L'absorbance de la solution a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm par rapport à un blanc (solution de référence ne contenant pas d'échantillon). Cette mesure a permis de quantifier la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (mg/g). Cela signifie que la teneur totale en polyphénols est rapportée en milligrammes d'acide gallique équivalent par gramme d'échantillon [38,39].

2.8 Etude de l'effet bioinsecticide des extraits végétaux

Pour évaluer l'effet biocide sur le puceron noir de la fève *Aphis fabae*, des expérimentations de lutte ont été menées en utilisant la pulvérisation d'extraits végétaux issus des graines de *Datura innoxia*.



2.8.1 Plante hôte : la fève *Vicia fabae*

Au laboratoire, les graines de fève utilisées pour les semis sont de variété haute, semi-précoce et présentant une bonne résistance au froid. Ces graines sont disponibles sur le marché.

2.8.2 Puceron noir de la fève *Aphis fabae*

Dans le cadre de cette étude, les individus de pucerons ont été collectés dans une parcelle de fèves au village Aït Bouhini, niché à une altitude de 800 mètres, à l'Est de la wilaya de Tizi-Ouzou. Ce village est bordé par Yakouren à l'Est et Azazga à l'Ouest.

2.8.3 Mode opératoire

Le travail expérimental a commencé au laboratoire d'Entomologie du département de Biologie le 24/04/2023, en effectuant le semis des graines de fève dans des pots en plastique. Ces pots étaient remplis avec un mélange de gravier occupant un quart du pot et de la tourbe occupant les trois quarts restants. L'expérience consistait en trois pots témoins traités avec de l'eau acidifiée, ainsi que 18 pots traités par deux extraits différents (un extrait brut et un extrait d'alcaloïdes), appliqués par contact. Neuf pots ont été utilisés pour chaque extrait. Les pots traités ont été répartis de manière aléatoire en blocs correspondant à différentes doses, avec trois répétitions pour chaque dose (10%, 50%, et 100%).

2.8.3.1 Méthode d'obtention des extraits végétaux

Les extraits végétaux utilisés proviennent des graines de *Datura innoxia*. Après la récolte et la décortication des fruits, les graines sont soigneusement lavées, séchées à l'abri de la lumière, puis broyées dans un moulin à café jusqu'à obtenir une poudre.

Pour obtenir l'extrait brut, une macération est réalisée en utilisant 50g de graines par 200 ml d'eau acidifiée avec de l'acide acétique pendant 72 heures. Pendant ce processus, le mélange est soumis à des ultrasons pendant une heure toutes les 24 heures.

En ce qui concerne l'extrait d'alcaloïdes, il est obtenu en effectuant une extraction au soxhlet en utilisant un milieu alcalin.

2.8.3.2 Préparation des doses

À partir de la solution mère des deux extraits, des dilutions sont effectuées à différentes concentrations de la manière suivante :



- ❖ Les doses T1, T2 et T3 correspondent à la dose témoin (10ml d'eau acidifiée) ;
- ❖ Les doses A1, A2 et A3 (10%) correspondent à 1ml d'extrait d'alcaloïdes et 9ml d'eau acidifiée ;
- ❖ Les doses A4, A5 et A6 (50%) correspondent à 5ml d'extrait d'alcaloïdes et 5ml d'eau acidifiée ;
- ❖ Les doses A7, A8 et A9 (100%) correspondent à 10ml d'extrait d'alcaloïdes ;
- ❖ Les doses B1, B2 et B3 (10%) correspondent à 1ml d'extrait brut et 9ml d'eau acidifiée ;
- ❖ Les doses B4, B5 et B6 (50%) correspondent à 5ml d'extrait brut et 5ml d'eau acidifiée ;
- ❖ Les doses B7, B8 et B9 (100%) correspondent à 10ml d'extrait brut ;

2.8.3.3 Méthode d'infestation et applications des traitements

Le processus d'infestation des plants de fève (figure 13) a été réalisé le 04/05/2023, en déposant soigneusement 30 pucerons par pied à l'aide d'un pinceau. Afin d'éviter la dispersion des insectes, chaque pot a été recouvert d'une protection en tulle. Les traitements par pulvérisation des extraits ont été appliqués le même jour.

2.8.3.4 Dénombrement de la population d'*Aphis fabae*

Suite au traitement, des observations quotidiennes ont été réalisées à l'aide d'une loupe manuelle afin de comptabiliser les individus vivants et morts.



Figure II.3 : Méthode d'infestation et de traitement des plants de fève (Originale, 2023).

- a Semis
- b Jeune plantule de fève
- c Infestation
- d Application du traitement
- e Couverture du pot
- f Dénombrement des populations.



CHAPITRE III

Résultats et Discussion



Chapitre III : Résultats et discussion

1 Etude botanique de la plante

1.1 Etude histo-anatomique

La feuille du *Datura*, qui présente une symétrie bilatérale, se compose de deux parties distinctes, le limbe et la nervure centrale. Cette structure peut être observée dans la coupe transversale de la feuille à un grossissement de 10x10, comme illustré dans la figure 14.

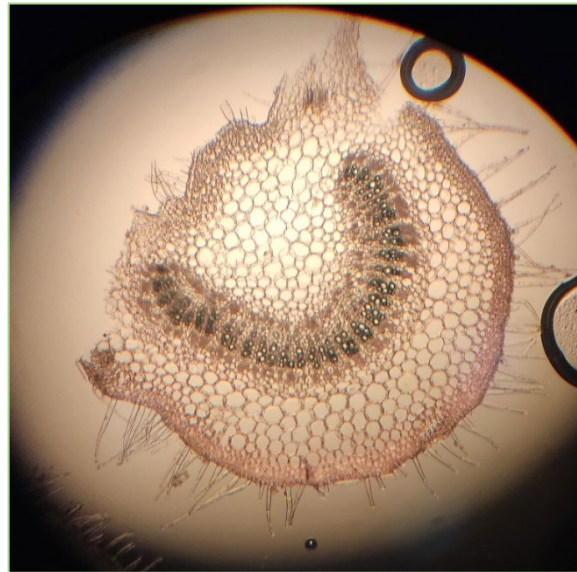


Figure III.1 : Aspect général d'une coupe transversale de la feuille du *Datura* observée au microscope au G10x10

Dans la section de la nervure principale, en partant de l'extérieur vers l'intérieur, divers éléments peuvent être observés (comme illustré dans la figure 15):

- L'épiderme supérieur est constitué d'une seule couche de cellules à paroi fine et cellulosique, qui sont colorées en rose grâce à la coloration au rouge Congo. Son rôle principal est d'assurer la protection de la nervure.
- Les faisceaux libéro-ligneux, qui sont les éléments conducteurs, se trouvent après l'épiderme. Ils comprennent le liber, formé de cellules à paroi épaisse et cellulosique également colorées en rose, et le bois, composé de cellules à paroi épaisse lignifiée, qui prennent une coloration verte avec le vert d'iode. Le liber assure le transport de la sève élaborée, tandis que le bois assure le transport de la sève brute.
- Le collenchyme, constitué de deux à trois couches de cellules arrondies à paroi épaisse et cellulosique colorées en rose, apporte un soutien structurel à la nervure principale.



La nervure principale est également entourée d'un épiderme inférieur.

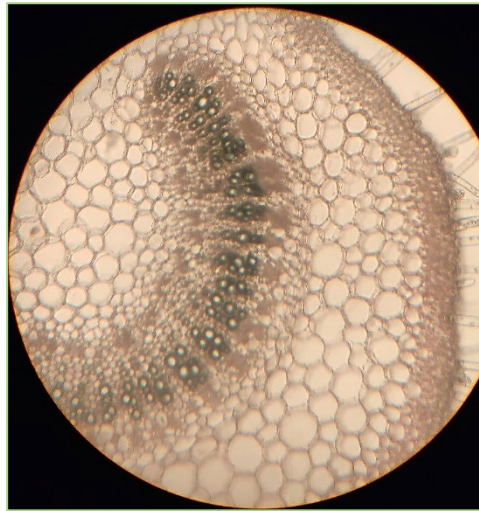


Figure III.2 : Coupe anatomique de la nervure principale du *Datura* observée au microscope au G10x10

Concernant le limbe de la feuille, les éléments suivants peuvent être observés (figure 16) :

- L'épiderme du limbe, à la fois supérieur et inférieur, présente les mêmes caractéristiques que l'épiderme des parties non vascularisées de la feuille. Il peut comporter des stomates en quantité variable, permettant ainsi les échanges gazeux.
- Sous l'épiderme supérieur se trouve le parenchyme palissadique, constitué d'une ou plusieurs couches de cellules rectangulaires allongées, qui jouent un rôle de remplissage.
- Le parenchyme lacuneux est composé de cellules irrégulières et moins compactes, ayant une paroi fine et cellulosique colorée en rose grâce au rouge Congo. Ce tissu contient des espaces intercellulaires appelés lacunes, favorisant les échanges gazeux et la circulation de l'eau à travers la feuille.



Figure III.3 : Coupe anatomique du limbe du *Datura* observée au microscope au G10x10.

D'autres éléments peuvent également être observés, tels que :

- Des poils sécréteurs, comprenant un pied unicellulaire et une tête pluricellulaire.
- Des poils tecteurs pluricellulaires unisériés, caractérisés par une paroi épaisse.
- Des macles d'oxalates de calcium présentes dans le limbe.
- Des cristaux d'oxalates de calcium se présentant sous forme de sable dans la nervure.



Figure III.4 : Poil sécréteur observés au microscope optique au G10x40



Figure III.5 : Poils tecteurs observés au microscope optique au G10x10



Figure III.6 : Macles d'oxalate de calcium observés au microscope optique au G10x40



1.2 Etude de la drogue pulvérisée

Lors de l'observation de l'échantillon de poudre des feuilles de *Datura* dilué dans une goutte du réactif de Gazet Le Chatelier au microscope optique, utilisant des grossissements de 10x10 et 10x40, plusieurs éléments ont été identifiés :

- Des fragments d'épiderme présentant des cellules avec une paroi sinueuse et une cuticule lisse.
- Des stomates composés de 4 ou 5 cellules annexes qui facilitent les échanges gazeux.
- Une faible présence de poils tecteurs pluricellulaires, disposés en une seule rangée.
- Une rareté de poils sécréteurs.
- Des débris de vaisseaux sanguins.
- Des macles d'oxalates de calcium.



Figure III.7 : Débris de vaisseaux rayés observés au microscope au G10x10

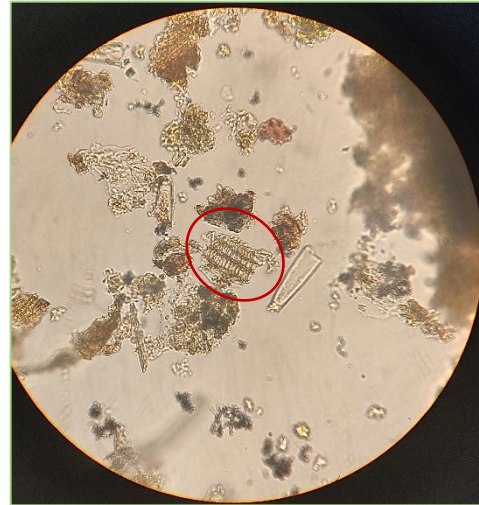


Figure III.8 : Débris de vaisseaux spiralés observés au microscope au G10x10



Figure III.9 : cristaux d'oxalates de calcium observés au niveau de la feuille du *Datura* via le microscope au G10x40

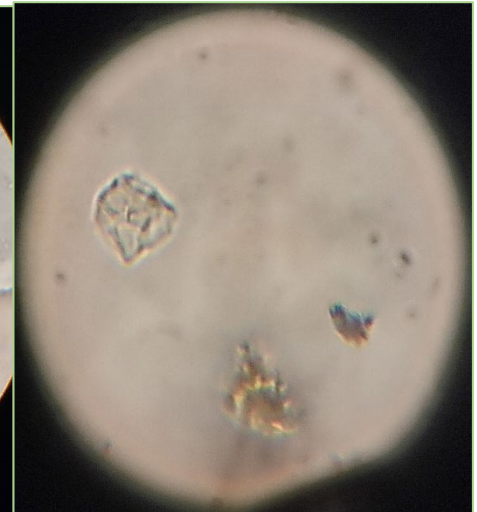


Figure III.10 : Poil tecteur pluricellulaire observé au microscope au G10x40



Figure III.11 : Tête d'un poil sécréteur observée au microscope au G10x40



Figure III.12 : Vue microscopique de l'élément étranglé caractéristique du poil tecteur du *Datura*.

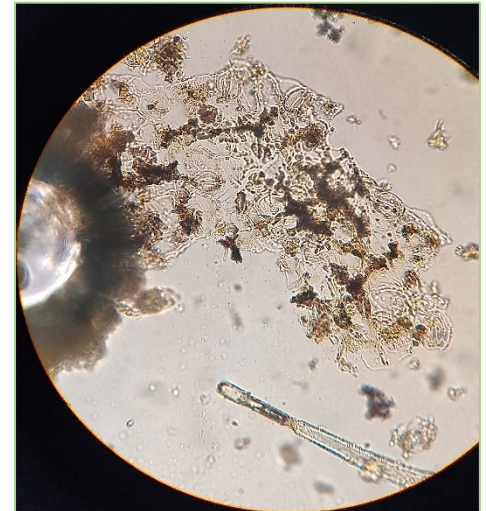


Figure III.13 : Fragment d'épiderme avec stomates observé au microscope au G10x10.



Les résultats des analyses histo-anatomiques et de la poudre mettent en évidence la présence d'éléments qui rappellent les caractéristiques générales des plantes de la famille des solanacées, en particulier le *Datura*.

En croisant ces résultats avec d'autres études morphologiques provenant de diverses sources bibliographiques, les conclusions nous orientent vers une espèce spécifique, à savoir le *Datura innoxia*.

2 Screening phytochimique

Les tests phytochimiques sont utilisés pour détecter les différentes familles de composés présentes dans les parties de la plante étudiée. Ces tests reposent sur des réactions qualitatives de caractérisation, telles que la précipitation, la coloration avec des réactifs spécifiques ou la fluorescence sous une lampe UV.

Les résultats du screening phytochimique de l'extrait brut des graines du *Datura innoxia* sont consignés dans le tableau 5.

Tableau III.1 : Résultats du screening phytochimique de l'extrait brut des graines du *Datura innoxia*.

Métabolites	tanins	Flavonoïdes	Sucres réducteurs	Alcaloïdes		
				Mayer	Bouchardat	Dragendorff
Extrait brut	+++	+++	+	+++	+++	+++

(+++): Test fortement positif

(++): Test moyennement positif

(+): Test faiblement positif



Figure III.14 : Caractérisation des sucres réducteurs.

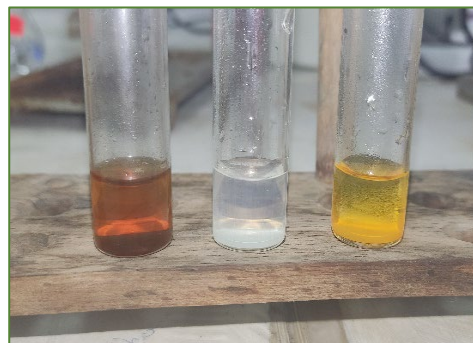


Figure III.15 : Caractérisation des alcaloïdes.

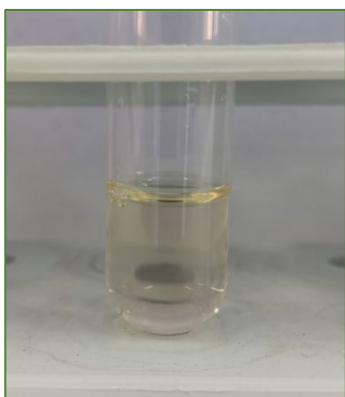


Figure III.16 : Caractérisation des flavonoïdes.

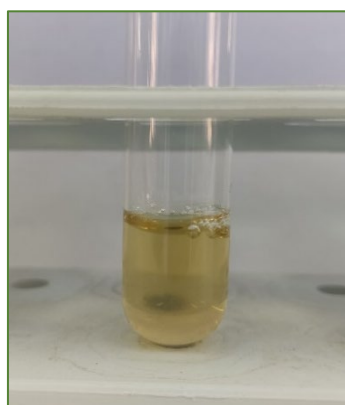


Figure III.17 : Caractérisation des tanins.

L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux des graines du *Datura innoxia* a révélé la présence de divers métabolites secondaires, tels que des alcaloïdes (figure 28), des tanins, des flavonoïdes et des sucres réducteurs (figure 27).

Deux classes de polyphénols ont été identifiées dans cette étude. En ce qui concerne les flavonoïdes, leur présence a été initialement détectée à l'aide de la réaction générale à la potasse. De plus, la réaction spécifique à la cyanide a confirmé la présence d'une classe particulière de flavonoïdes, à savoir les chalcones (figure 29).

Concernant les tanins, leur présence a été indiquée par une coloration brun verdâtre, ce qui suggère la présence de tanins condensés ou catéchiques (figure 30).

Ces résultats sont en accord avec les études antérieures décrites dans les travaux de Sharma, M. et al [6], référencés dans la littérature.



3 Extraction des alcaloïdes

L'extraction solide-liquide des alcaloïdes tropaniques totaux à partir des graines du *Datura innoxia*, au soxhlet, par microondes et par sonication a permis d'obtenir un extrait de couleur vert jaunâtre (figure 31), avec des rendement de 0.04%, 0.12% et 0.15% respectivement.

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse du résidu sec obtenu et la masse du matériel végétal traité, il est calculé en utilisant cette équation [40] :

$$R\% = (Me/Ms) \times 100$$

Avec : R% : le rendement d'extraction

Me : masse du résidu sec (après évaporation du solvant)

Ms : masse de la partie sèche de la plante

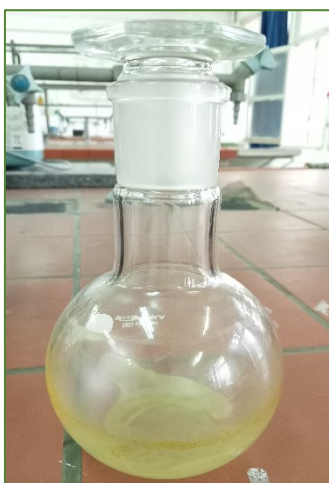


Figure III.18 : Résidu sec d'alcaloïdes totaux.

Dans cette étude, l'extraction des alcaloïdes tropaniques à partir des graines du *Datura innoxia* a été réalisée en utilisant diverses méthodes. Une comparaison entre ces méthodes a été effectuée, mettant en évidence l'efficacité de l'extraction assistée par ultrasons, qui a montré le rendement le plus élevé.

Cette constatation est en accord avec les études antérieures menées par Istatkova, R. et al [31] qui ont également documenté la performance de l'extraction assistée par ultrasons pour l'extraction des alcaloïdes tropaniques à partir de plantes médicinales différentes.



4 Analyse qualitative et quantitative

4.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse qualitative des alcaloïdes totaux des graines du *Datura innoxia* a été réalisée par CCM. Cette méthode a permis de séparer deux substances qui sont apparues sous forme de taches colorées après révélation (figure 32). La première tache, située en bas de la plaque au même niveau que celle du sulfate d'atropine (standard), correspond à l'atropine ($R_f = 0.14$). La deuxième tache, située dans la partie supérieure de la plaque, correspond à la scopolamine ($R_f = 0.71$) d'après les références bibliographiques.



Figure III.19 : Séparation chromatographique (par CCM) des alcaloïdes tropaniques majoritaires extraits des graines du *Datura innoxia*.

T : correspond au spot du témoin : sulfate d'atropine (standard)
E : correspond au spot de l'échantillon.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince réalisée dans la présente étude, a permis de déterminer la présence de deux alcaloïdes tropaniques dans l'extrait à base des graines du *Datura innoxia*, à savoir la scopolamine et l'atropine.

La présence de l'atropine a été confirmée grâce à l'observation d'une tache ayant un rapport frontal similaire à celui du témoin (sulfate d'atropine). En ce qui concerne la scopolamine, bien que nous n'ayons pas pu obtenir une confirmation directe en raison de la non-disponibilité de la matière première nécessaire, nous avons extrapolé sa présence en nous appuyant sur les résultats de l'étude réalisée par Bouzidi, A. et al [41].



4.2 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

Le dosage des alcaloïdes extraits a été réalisé par spectrophotométrie UV-Visible selon la méthode décrite par Sreevidya, N. et Mehrotra, S [33] basé sur la formation d'un complexe de bismuth-thiourée.

Les résultats de la courbe d'étalonnage sont représentés dans la figure 33.

L'absorbance a été mesurée à 464nm, qui correspond à la longueur d'absorption maximale obtenue lors du scan du complexe nitrate de bismuth-thiourée.

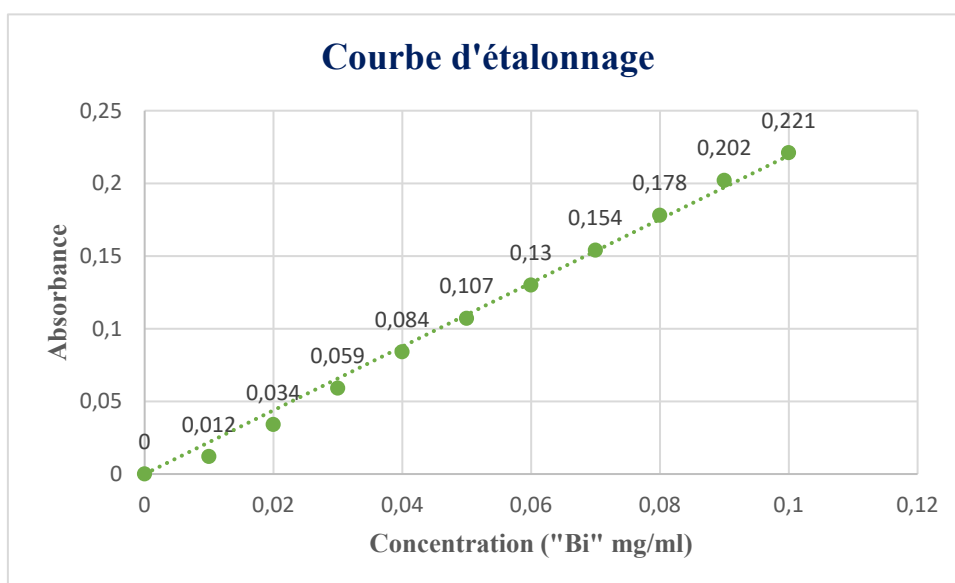


Figure III.20 : Courbe d'étalonnage pour le dosage UV-Vis des alcaloïdes

Le graphique de calibration entre la concentration et l'absorbance est linéaire avec une valeur de R^2 de 0.9984 et obéit à la loi de Beer-Lambert.

Comme le complexe formé est de type 1 : 1, la quantité de bismuth correspond à la quantité d'alcaloïdes présents et qui est calculée en divisant l'absorbance sur le facteur (K) qui correspond au coefficient d'absorption molaire, déduit à partir de la courbe d'étalonnage.

En se basant sur la courbe d'étalonnage, la concentration en alcaloïdes totaux extraits par Soxhlet, microondes et sonication sont respectivement 0.07 mg/ml, 0.13 mg/ml et 0.16 mg/ml, qui correspondent à des rendements de 0.03%, 0.10% et 0.13%.

L'analyse quantitative par spectrométrie UV-visible a permis de déterminer des taux d'alcaloïdes totaux qui présentent une concordance notable avec les rendements obtenus par la méthode de pesée. La similitude entre ces deux méthodes de mesure met en évidence une corrélation satisfaisante, ce qui renforce la crédibilité et la fiabilité des procédés employés.



4.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'identification de l'atropine, composé extrait des alcaloïdes totaux, a été réalisée en comparant les temps de rétention du standard et des échantillons. Les temps de rétention de l'atropine dans le standard, l'extrait obtenu par le soxhlet et l'extrait par microondes sont respectivement de 7,10 min, 7,05 min et 6,98 min.

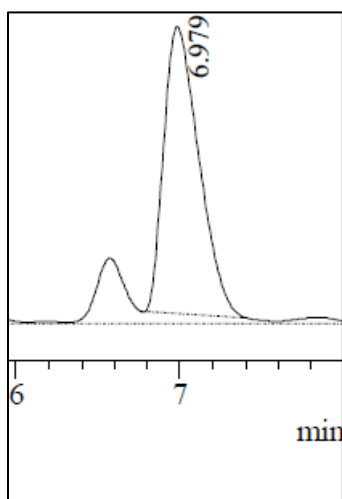


Figure III.21 : Pic chromatographie de l'échantillon obtenu par extraction aux microondes

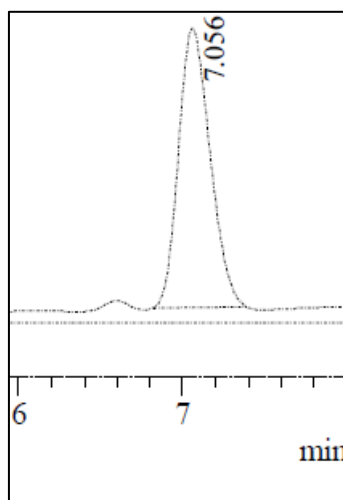


Figure III.22 : Pic chromatographie de l'extrait du soxhlet

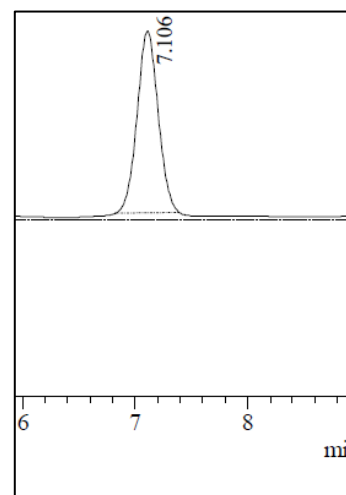


Figure III.23 : Pic chromatographie du Standard (Sulfate d'atropine)

Les valeurs des temps de rétention sont très proches, nous permettent de confirmer la présence de l'atropine dans nos échantillons.

Pour déterminer la concentration de cet alcaloïde, une courbe d'étalonnage (aires des pics en fonction des concentrations du standard -figure 37-) a été utilisée.

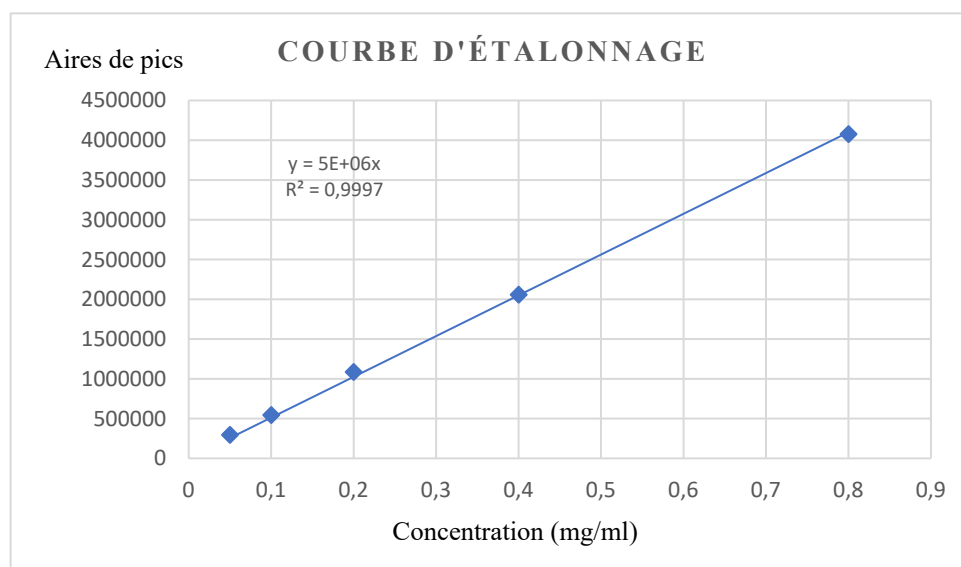


Figure III.24 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'atropine dans les extraits d'alcaloïdes



Le graphique d'étalonnage entre la concentration et l'aire du pic est linéaire, avec une valeur de R^2 de 0,99.

La courbe a révélé des taux d'atropine de 0,02 % et de 0,09 % pour les extraits obtenus par Soxhlet et par microondes respectivement.

Ces taux se retrouvent inférieurs à ceux obtenus par dosage spectrophotométrique ou par pesée, ce qui est justifié par la présence d'autres alcaloïdes, notamment la scopolamine, voire d'autres pseudoalcaloïdes.

5 Evaluation de l'activité antioxydante

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique et les extraits testés sont représentés dans la figure 38.

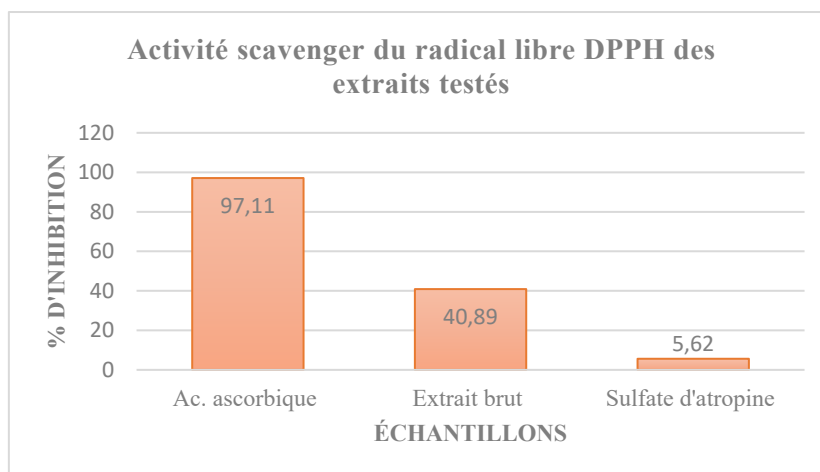


Figure III.25 : Graphique représentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de l'extrait testé.

Selon les données recueillies, il est observé que les taux d'inhibition des deux extraits testés sont inférieurs à celui de l'acide ascorbique (PI = 97,11 %) or qu'une activité antioxydante est démontrée pour l'extrait aqueux des graines du *Datura innoxia*, avec un taux d'inhibition du radical DPPH de 40,89%. Des résultats similaires ont été observés dans une étude antérieure menée par Akharaiyi, F.C. [42], où un extrait aqueux d'une espèce apparentée de la même plante (*Datura metel*) a révélé des taux d'inhibition allant de 23,82% à 49,30%.

Cependant, il apparaît que cette activité ne peut être attribuée principalement aux alcaloïdes présents dans la plante, comme en témoigne le faible taux d'inhibition du radical DPPH de l'atropine commerciale. Par conséquent, une hypothèse plausible se dessine : le pouvoir



antioxydant de l'extrait de *Datura* pourrait être attribué à des composés autres que les alcaloïdes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à la quantification des polyphénols.

6 Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux présents dans l'extrait brut ont été déterminés à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu.

L'absorbance a été mesurée à 723 nm, qui correspond à la longueur d'absorption maximale obtenue lors du scan.

Les résultats de la courbe d'étalonnage sont présentés dans la figure 39.

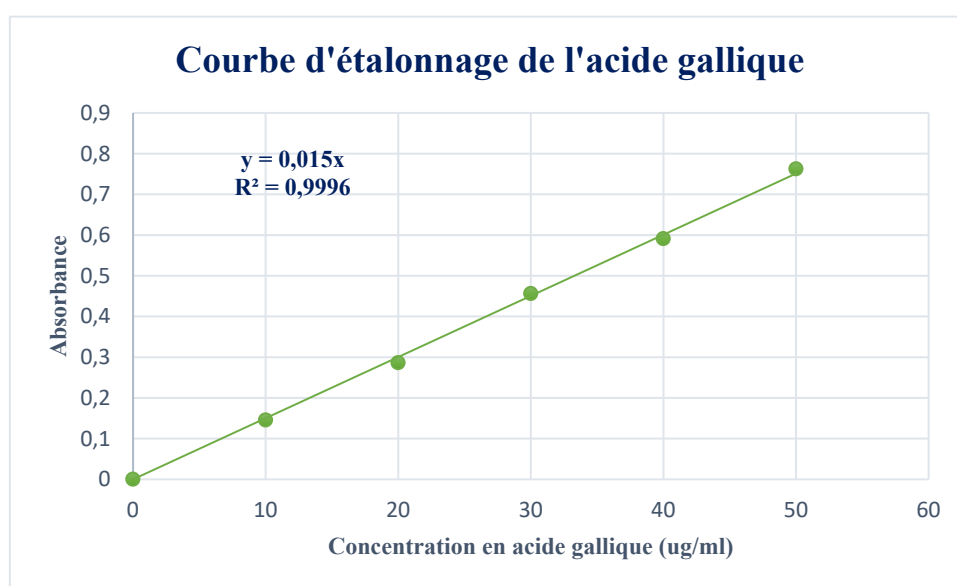


Figure III.26 : Courbe d'étalonnage pour la quantification des polyphénols

Le graphique de calibration entre la concentration et l'absorbance est linéaire et obéit à la loi de Beer-Lambert avec une valeur de R^2 de 0.9996.

La quantité de polyphénols a été exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E).

Le dosage de ces composés présents dans l'extrait brut par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé une concentration de 2,88 mg EAG/g E ; un taux assez bas justifiant la faible activité antioxydante de l'extrait à base de graines du *Datura*.



7 Effet bioinsecticide des extraits végétaux

Dans cette section, nous présentons les résultats obtenus concernant l'impact de la dose, du temps et de la nature des extraits testés sur les populations d'*A. fabae*.

7.1 Effet de la dose sur l'efficacité de l'extrait sur les populations d'*A. fabae*

Les résultats relatifs à l'effet de la dose ont été enregistrés pour chaque extrait, à savoir l'extrait brut et l'extrait à base d'alcaloïdes.

➤ Effet de la dose sur l'efficacité de l'extrait brut du *Datura* sur les populations d'*A. fabae*

Les résultats de l'effet de la dose de l'extrait brut du *Datura* sont représentés dans la figure 40.

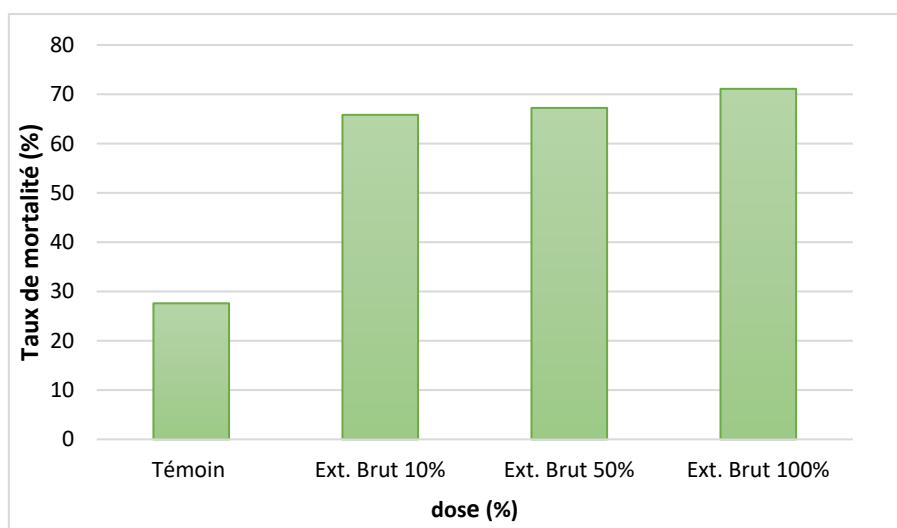


Figure III.27 : Taux de mortalité des populations d'*A. fabae* traités par l'extrait brut de *Datura innoxia* en fonction de la dose

À une concentration de 100%, l'extrait brut du *Datura* démontre un effet toxique observable (71.11%) qui n'évolue pas de manière significative lors de la diminution de la dose à 50% ou même à 10%. Malgré cette diminution de concentration, son effet toxique demeure relativement stable, sans présenter de réponse dose-dépendante prononcée.

➤ Effet de la dose sur l'efficacité de l'extrait d'alcaloïdes du *Datura* sur les populations d'*A. fabae*

Les résultats relatifs à l'effet de la dose de l'extrait d'alcaloïdes du *Datura* sont illustrés dans la figure 41.

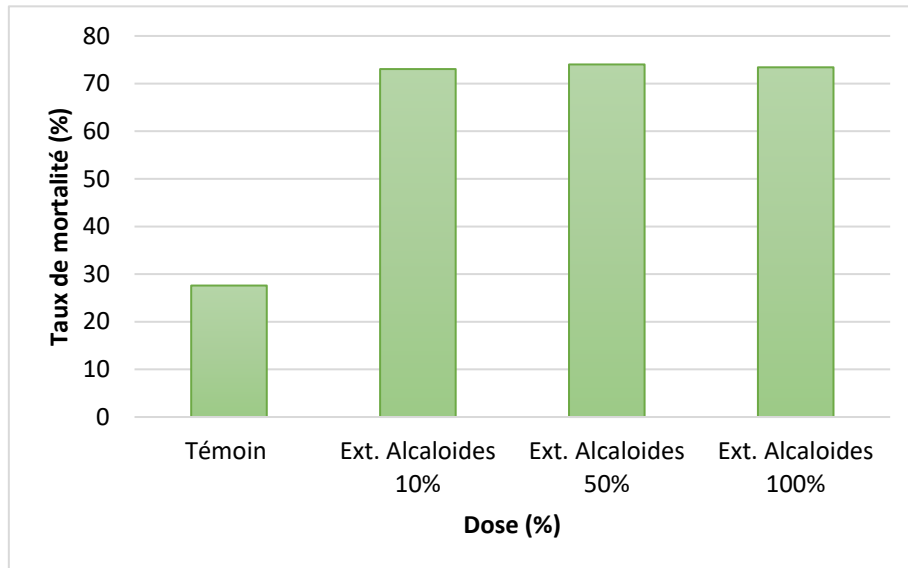


Figure III.28 : Taux de mortalité des populations d'*A. fabae* traités par l'extrait d'alcaloïdes en fonction de la dose.

L'extrait contenant des alcaloïdes du *Datura*, utilisé à une concentration de 100%, démontre un effet toxique observable (73.42%), qui ne présente pas de variation significative lorsque la dose est diminuée à 50% ou même à 10%. Malgré la diminution de la concentration, l'effet toxique de cet extrait demeure relativement constant, sans afficher une réponse dose-dépendante marquée.

7.2 Effet du temps sur l'efficacité de l'extrait sur les populations d'*A.fabae*

Dans cette partie, nous exposons les résultats de l'effet du temps des deux extraits testés.

➤ Effet du temps sur l'efficacité de l'extrait brut du *Datura* sur les populations d'*A.fabae*

Les résultats de l'expérimentation sur l'effet du temps de l'extrait brut du *Datura* sont représentés dans la figure 42.

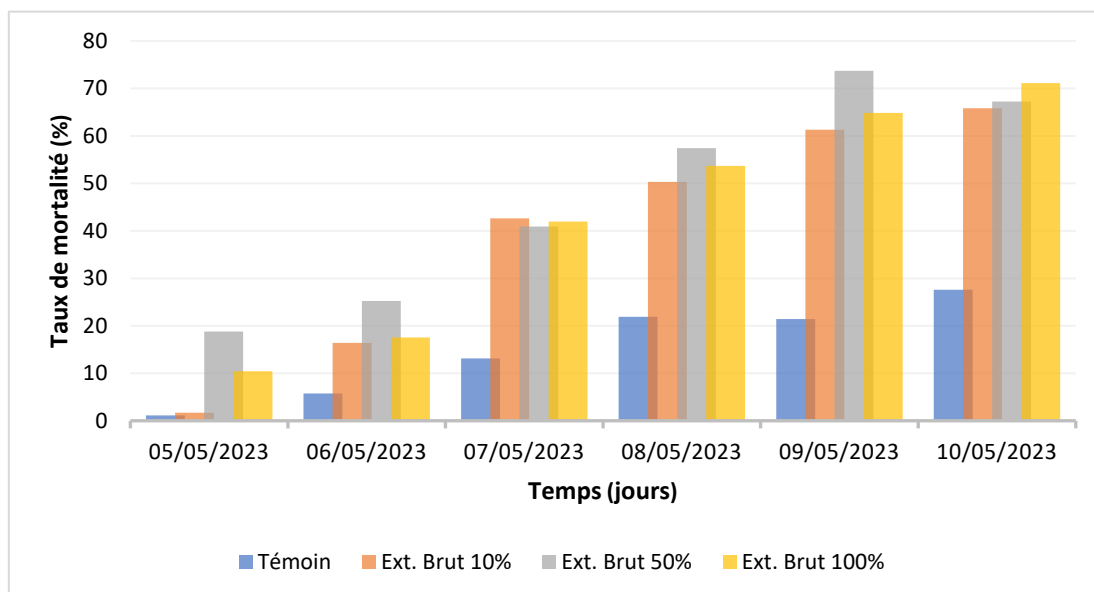


Figure III.29 : Taux de mortalité des populations d'*A. fabae* traités par l'extrait brut de *Datura innoxia* en fonction du temps.

Une augmentation du taux de mortalité des pucerons est observée au fil du temps, en passant d'une moyenne de 10.3% le premier jour à 68% après 6 jours de traitement, ce qui représente le taux moyen d'efficacité maximale. On peut conclure que l'effet du temps a un impact significatif sur le taux de mortalité.

➤ **Effet du temps sur l'efficacité de l'extrait d'alcaloïdes du *Datura* sur les populations d'*A. fabae***

Les résultats concernant l'effet du temps de l'extrait d'alcaloïdes sont illustrés dans la figure 43.

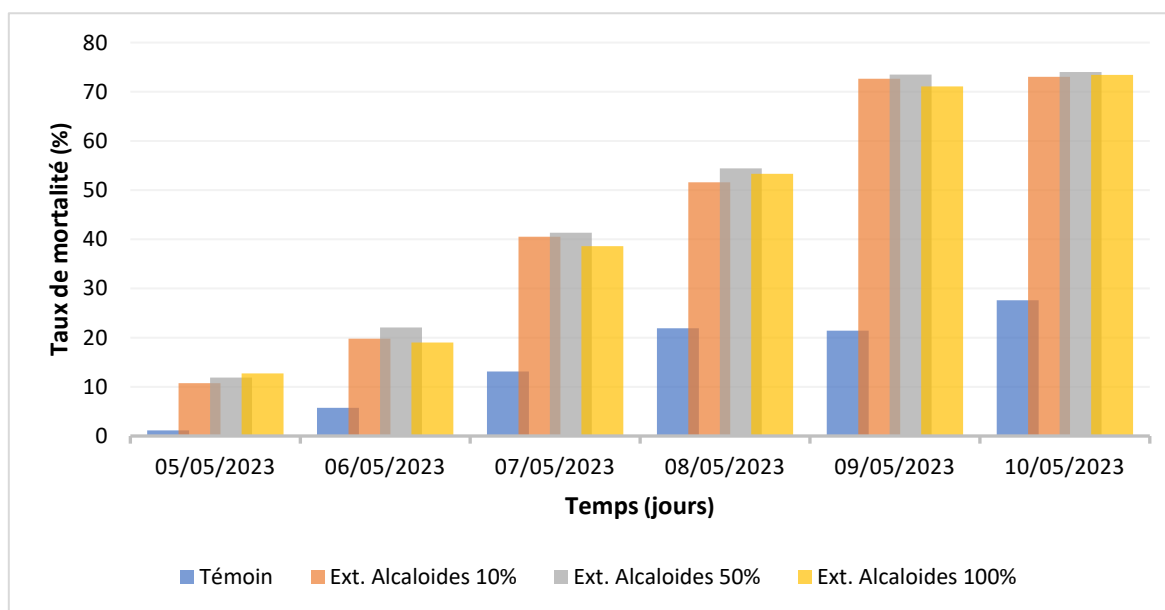


Figure III.30 : Taux de mortalité des populations d'*A. fabae* traités par l'extrait d'alcaloïdes en fonction du temps.



Une augmentation progressive du taux de mortalité au fil du temps est observée, atteignant un taux maximal après 6 jours, avec une efficacité relativement similaire pour les trois doses testées. En conclusion, ces résultats suggèrent que l'effet du temps a une influence significative sur le taux de mortalité des pucerons.

7.3 Effet de la nature de l'extrait sur les populations d'*A.fabae*

Les résultats de l'expérimentation sur l'effet de la nature de l'extrait sur les pucerons noirs de la fève sont représentés dans la figure 44.

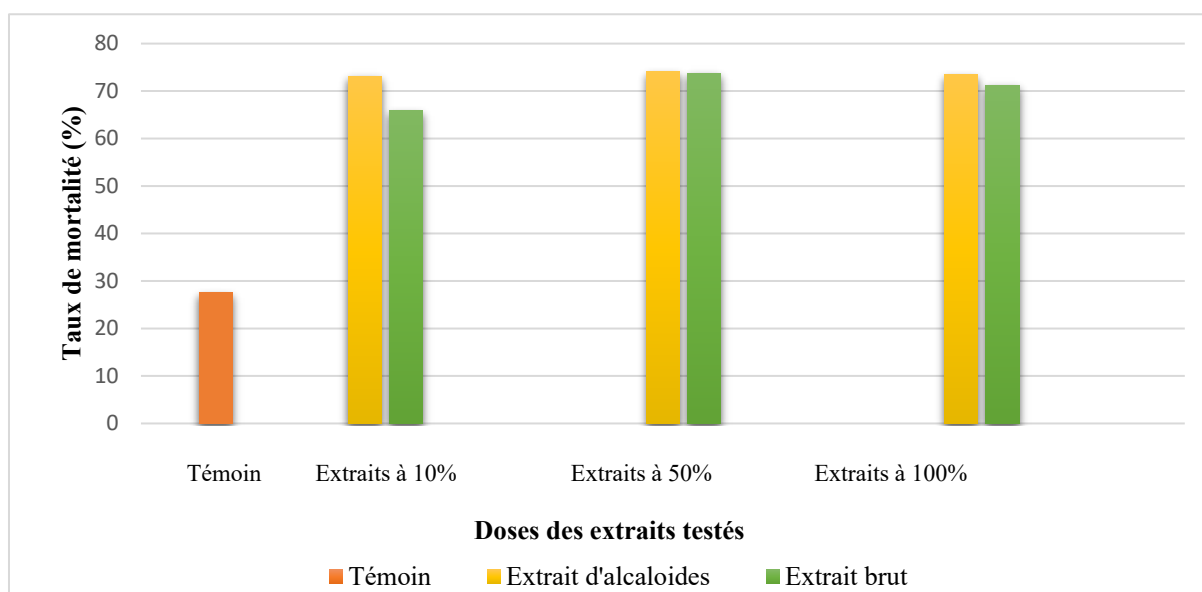


Figure III.31 : Variation du taux de mortalité des populations d'*A. fabae* selon l'extrait testé.

Les résultats obtenus démontrent que les deux types d'extraits, qu'ils soient bruts ou à base d'alcaloïdes, présentent une activité biocide contre les pucerons noirs de la fève. Leur efficacité est pratiquement équivalente, atteignant un taux de mortalité d'environ 70%.

Pour résumer, les extraits aqueux dérivés des graines du *D.innoxia* ont présenté un effet significatif sur la mortalité des populations d'*A. fabae*. Les résultats obtenus indiquent que cette plante testée est toxique pour ce ravageur, et que les taux de mortalité dépendent de la durée d'exposition plutôt que de la concentration des produits. Par rapport aux biopesticides testés, le groupe témoin de référence a entraîné des taux de mortalité relativement faible.

Conclusion

Au fil de ce travail qui porte sur l'extraction des alcaloïdes à partir des graines de *Datura* et l'évaluation de leur activité insecticide, nous avons été amené à réaliser des recherches et des manipulations relevant de divers domaines scientifiques, réaffirmant ainsi le caractère pluridisciplinaire de notre spécialité. Nous en avons tiré diverses conclusions.

D'abord, dans le cas de l'extraction des alcaloïdes à partir des graines de *Datura innoxia*, nous avons aboutis au fait que les techniques d'extractions modernes telles que : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons présentent un rendement d'extraction bien plus important que la technique d'extraction conventionnelle (Soxhlet). De plus, l'utilisation de solvants d'extraction moins dangereux pour la santé et l'environnement (méthanol et dichlorométhane) en font des méthodes plus sûres à employer. En ce qui concerne le temps d'extraction, l'extraction aux micro-ondes (30 secondes), offre un gain de temps significatif par rapport aux deux autres méthodes (150 minutes pour l'extraction au Soxhlet et 180 minutes pour celle aux ultrasons), ce qui en fait, au vue de nos résultats, la technique la plus efficace en terme de gain de temps.

Pour ce qui est du pouvoir insecticide des graines de *Datura*, nous pouvons affirmer qu'il est principalement si ce n'est totalement, dû aux alcaloïdes. Et ce, du fait que l'extrait aqueux brute des graines de *Datura* et la solution d'alcaloïdes purs présentent un taux de mortalité moyen similaire autour des 70% au 5ème jour après pulvérisation. On déduit également que le pouvoir insecticide de ces extraits est dépendant du temps et indépendant de la concentration en alcaloïdes, du fait que l'on observe une augmentation du taux de mortalité des pucerons au cours du temps passant d'une moyenne d'environ 10% le premier jour à une moyenne de 70% au 5ème jour, tandis que l'on ne dénote aucune différence notable de mortalité entre les trois concentration d'extraits qui ont été pulvérisés.

Nous avons également démontré, le pouvoir antioxydant des graines de *Datura*, qui n'est, cependant pas dû aux alcaloïdes, mais plutôt à d'autres composés chimiques qu'elles renferment, notamment les polyphénols, et cela au vu des résultats du test d'évaluation de l'activité antioxydante, au cours duquel nous avons observé un taux d'inhibition du radical DPPH de 40,89% pour l'extrait aqueux des graines de *Datura* contre 5,62% pour la solution d'atropine commerciale. Ce pouvoir antioxydant reste cependant relativement faible, à cause de la faible concentration en polyphénols dans les graines de *Datura*, comme le montre les résultats du dosage qu'on leur a fait, qui donne une concentration de 2.88 mg EAG/g E.

Enfin, nous avons utilisé au cours de ce mémoire une multitude de techniques d'identification et d'analyse tel que : l'étude de l'aspect botanique, l'étude histo-anatomique et l'études de la poudre de feuilles pulvérisées dans le but de l'identification du genre et de l'espèce de la plante utilisé. L'analyse par colorimétrie, la chromatographie sur couche mince (CCM), la spectrométrie UV-visible, chromatographie sur colonne à haute pression (HPLC), les dosages, nous ont quant à eux renseigné sur la composition chimique des différents extraits obtenus. Toutes ces techniques et tous les résultats obtenus se sont avérés être concluants, cohérents et en accord avec la bibliographie.

À l'issu de ce travail, nous arrivons à la conclusion, que les alcaloïdes et les extraits de graines de *Datura innoxia*, pourraient présenter une alternative viable aux insecticides chimiques actuellement utilisés. L'utilisation de techniques d'extraction modernes, pour la réalisation de ce bioinsecticide est recommandée, tout en envisageant le recours à des méthodes relevant de la chimie verte. L'évaluation du pouvoir insecticide d'extraits d'autres parties de la plantes, d'autres espèces de *Datura* et même à d'autre solanacées, ainsi que leur application sur d'autres espèces d'insectes ravageurs, voire de champignons et de bactéries ; présentent un intérêt remarquable.

Références bibliographiques

- [1] Bodeau, S., Bennis, Y., Knapp, A., Mayer, C., Alvarez, J. C., Bricca, G., & Lemaire-Hurtel, A. S. (2015). Hallucinations sous *Datura*: le piège atropinique. *Toxicologie Analytique Et Clinique*, 27(4), 246-250.
- [2] Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.
- [3] Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- [4] Morsli, A. (2013). *Caractérisation de la diversité génétique de quelques espèces de Datura L. en Algérie* (Doctoral dissertation, Tizi Ouzou).
- [5] Céspedes-Méndez, C., Iturriaga-Vásquez, P., & Hormazábal, E. (2021). Secondary metabolites and biological profiles of *Datura* genus. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 66(2), 5183-5189.
- [6] Sharma, M., Dhaliwal, I., Rana, K., Delta, A. K., & Kaushik, P. (2021). Phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *Datura* species—A review. *Antioxidants*, 10(8), 1291.
- [7] Bouhas-Boubekka, A. (2011). Activité insecticide du *Datura innoxia* et *Azadirachta indica* sur deux espèces d'orthoptères *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775)(Cyrtacanthacridinae, Acrididae) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758)(Oedipodinae, Acrididae).
- [8] Lockwood, T. E. (1973). Generic recognition of *Brugmansia*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 23(6), 273-284.
- [9] Della-Torre A. et Bellenot D. (2015). Des plantes au secours des plantes : Les extraits végétaux en protection des cultures. *Vivre la vigne en bio (N° 137-138-139-140)*, p. 46-55 (10).
- [10] Shi, Z., Zou, W., Zhu, Z., Xiong, Z., Li, S., Dong, P., & Zhu, Z. (2022). Tropane alkaloids (hyoscyamine, scopolamine and atropine) from genus *Datura*: Extractions, contents, syntheses and effects. *Industrial Crops and Products*, 186, 115283.
- [11] Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.
- [12] Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., ... & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In *Recent advances in natural products analysis* (pp. 505-567). Elsevier.
- [13] Christen, P., Bieri, S., & Veuthey, J. L. (2007). Analysis of tropane alkaloids in biological matrices. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*, 339-367.
- [14] Christen, P., Bieri, S., & Berkov, S. (2013). Methods of analysis: Tropane alkaloids from plant origin. *Natural Products; Ramawat, KG, Mérillon, JM, Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany*, 1009-1048.

- [15] Lailheugue, P. (1983). *La stramoine: Datura stramonium linne; son usage, ses effets* (Doctoral dissertation).
- [16] Mohanlall, V., & Ally, F. (2020). An overview of tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry; Vol. 9, Issue 3*.
- [17] Badiaga, M. (2011). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II
- [18] Benoufella-Kitous, K. (2005). Les pucerons des agrumes et leurs ennemis naturels à Oued-Aïssi (Tizi-Ouzou) (Doctoral dissertation, INA, p. 222.
- [19] Remaudière, G., & Remaudiere, M. (1997). Catalogue of the world's Aphididae: Homoptera Aphidoidea. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France, p. 484.
- [20] Hullé, M. Ighil, E. T. A., Robert, Y. & Monnet Y., (1999). Les pucerons des plantes maraîchères: cycles biologiques et activités de vol. Editions Quae, p. 136.
- [21] Encyclopedie-pucerons [Available from: <https://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Especes/Pucerons/Aphis/A.-fabae>], consulté le 06 avril 2023.
- [22] Dedryver, C. A. (2010). Les pucerons: biologie, nuisibilité, résistance des plantes. Journées Techniques, p. 23.
- [23] Lambert, L. (2005). Les pucerons dans les légumes de serre: Des bêtes de sève. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec, p. 7.
- [24] Ould El Hadj, M. D. (2004). Le problème acridien au Sahara algérien (Doctoral dissertation, PhD Thesis, Institut National Agronomique El Harrach, Alger), p. 320
- [25] Jactel, H., Barrès, B., Bonafos, R., Desneux, N., Escobar-Gutiérrez, A., Siegwart, M., ... & Gachet, E. (2021). Efficacité des traitements disponibles pour lutter contre les pucerons de la betterave, p. 137.
- [26] Deravel, J., Krier, F., & Jacques, P. (2013). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 18(2), 220-232.
- [27] Mohmed, A. S. (2019). Evaluation of the crude phenolic and terpenoid extracts of *Carissa macrocarpa* against *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) in-vitro. *Journal of Biopesticides*, 12 (1) : 72-75.
- [28] Chaichi, W., & Djazouli, Z. E. (2017). Impact du thé de vermicompost sur la qualité phytochimique de la fève et sur la réduction des populations du puceron noir de la fève *Aphis fabae*. *Revue Agrobiologia*, 7(1) : 247-262.
- [29] Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans' pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences.

- [30] Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- [31] Istatkova, R., Kostova, N., Tuleva, P., Christov, V., & Philipov, S. (2009). Ultrasound-and Microwave-Assisted Extractions of Alkaloids from Medicinal Plants. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 62(8).
- [32] Pharmacopée Européenne (7ème édition).
- [33] Sreevidya, N., & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC international*, 86(6), 1124-1127.
- [34] Hosseini, N., Ebrahimi, S. N., Salehi, P., Asghari, B., & Ahmadi, M. (2011). Simultaneous determination of atropine and scopolamine in different parts of *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark plants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Med Plants Res*, 5(2012), 3552-3557.
- [35] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- [36] Détermination de l'activité d'un antioxydant par le test DPPH [Available from: <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>] , consulté le 20 juin 2023.
- [37] Izuegbuna, O., Otunola, G., & Bradley, G. (2019). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Opuntia stricta* cladodes. *Plos one*, 14(1), e0209682.
- [38] Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.
- [39] Dif, M. M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., & Bouterfas, K. (2015). Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*, 13(5), 314-319.
- [40] Bouchouka, E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. *Badji Mokhtar Annaba University—Faculty of Sciences*.
- [41] Bouzidi, A., Mahdeb, N., Kara, N., & BENOUDAH, Z. (2011). Analyse qualitative et quantitative des alcaloïdes totaux des graines de *Datura stramonium* L.
- [42] Akharaiyi, F. C. (2011). Antibacterial, phytochemical and antioxidant activities of *Datura metel*. *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), 478-483.

Annexes

Annexe 1

Composition des réactifs généraux d'alcaloïdes

- Réactif de Mayer (mercuri-iodure de potassium) : de couleur blanche, composé de :
 - Chlorure de mercure (HgCl_2) 1.36 g
 - Iodure de potassium (KI) 25 g
 - Eau distillé 100 ml

- Réactif de Bouchardat (iodo-ioduré) : de couleur brune, composé de :
 - Diiodure (I_2) 2.5 g
 - Iodure de potassium (KI) 5 g
 - Eau distillée 100 ml

- Réactif de Dragendorff (tétraiodo-bismuthate de potassium) : de couleur orange, composé de :
 - Solution A 1 ml
 - Solution B 1 ml
 - Acide acétique 2 ml
 - Eau distillée 6 ml

Tels que :

- solution « A » est composée de :
 - Carbonate de bismuth 5 g
 - Eau distillée 40 ml
 - Acide acétique 10 ml
- Solution « B » est composée de :
 - Iodure de potassium (KI) 25 g
 - Eau distillée 20 ml

Annexe 2

Composition de la liqueur de Fehling

La liqueur de Fehling est composée de deux solutions A et B :

Solution A :

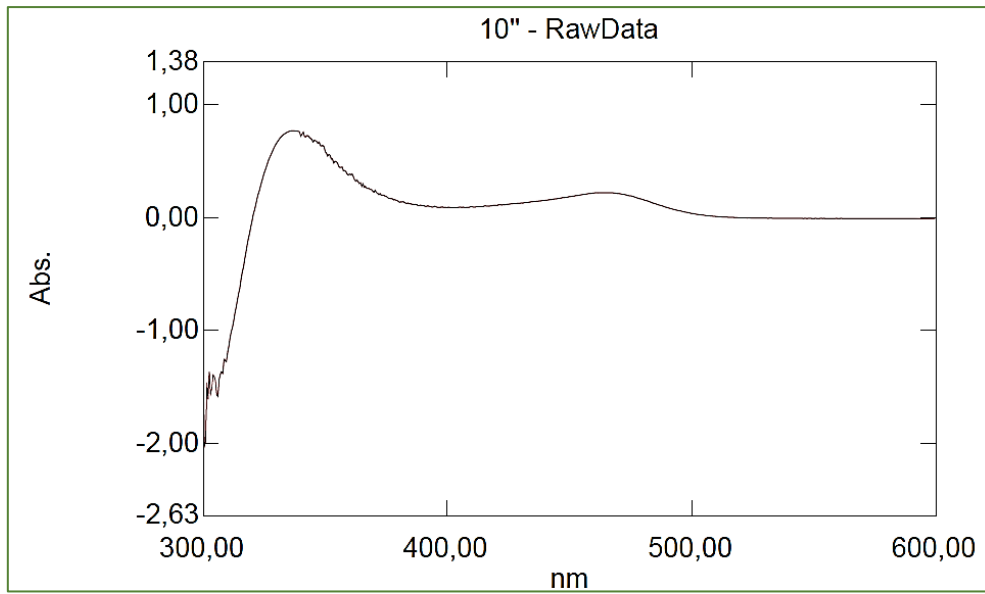
- Sulfate de cuivre (CuSO_4) : 4,5 g
- Eau distillée : 100 ml

Solution B :

- Sel de Seignette (tartrate de sodium et de potassium, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) : 20 g
- Hydroxyde de sodium (NaOH) : 15 g
- Eau distillée : 100 ml

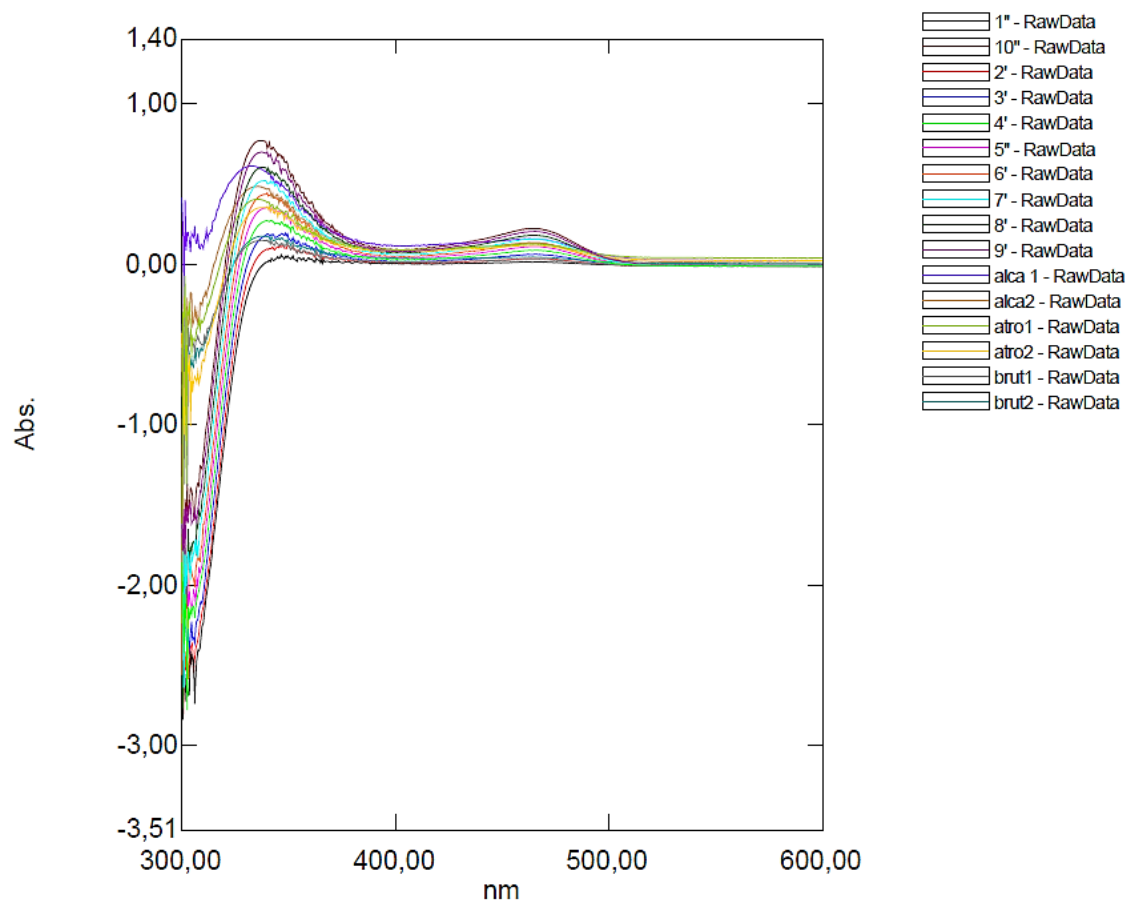
Annexe 3

Le spectre d'absorption UV-Visible du complexe nitrate de bismuth-thiourée



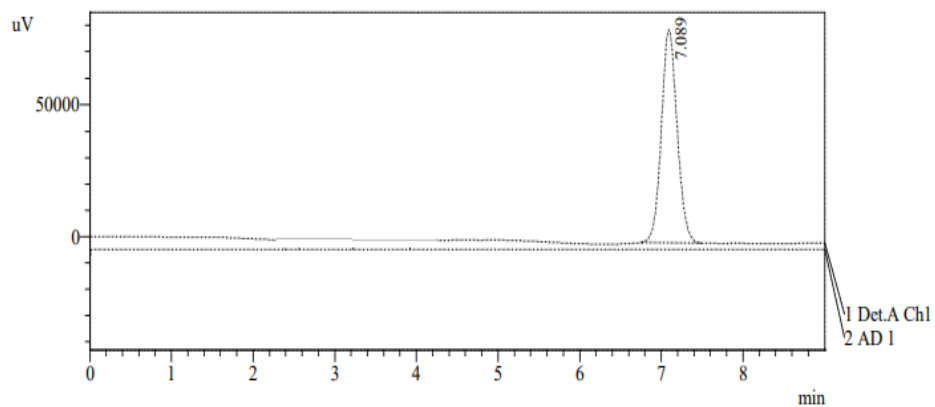
Annexe 4

Spectres d'absorption des échantillons obtenus après dosage par spectrophotométrie UV-Visible

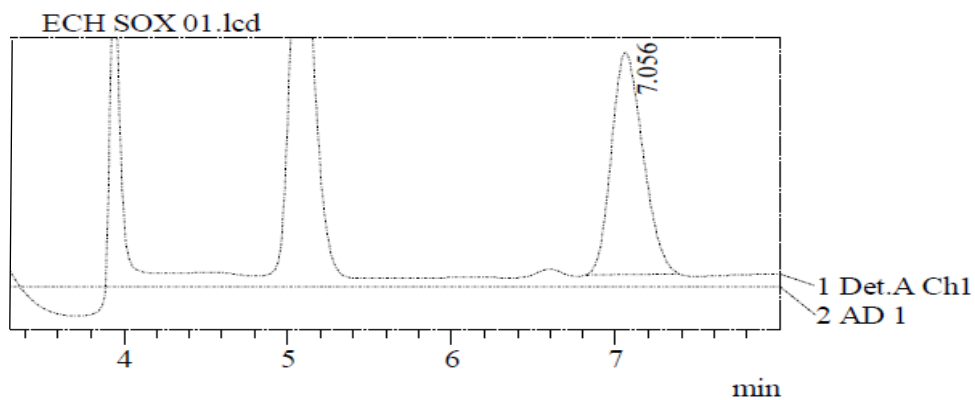
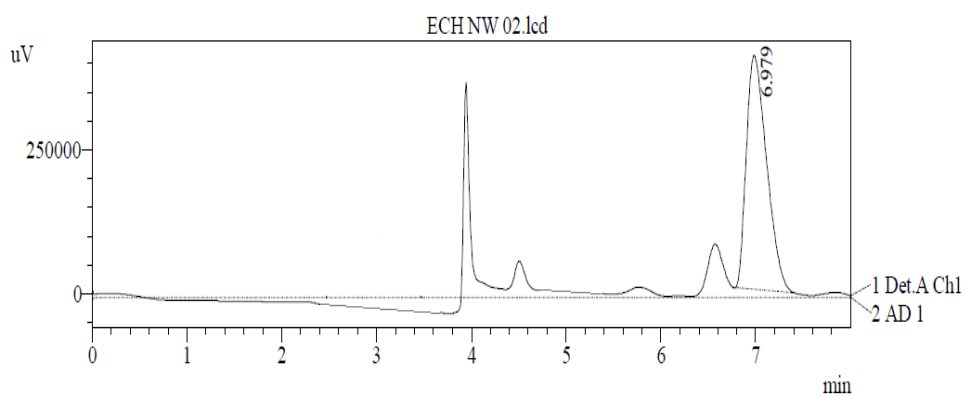


Annexe 5

Chromatogramme du standard (sulfate d'atropine) obtenu après analyse par HPLC



Chromatogrammes des extraits d'alcaloïdes après analyse par HPLC



Résumé

Ce travail vise à comparer différentes méthodes d'extraction des alcaloïdes du *Datura innoxia*, à exploiter les propriétés insecticides de cette plante et à mettre en évidence le rôle des alcaloïdes dans ces propriétés. Tout d'abord, la plante est identifiée sur le plan botanique et pharmacognosique.

Ensuite, trois méthodes d'extraction sont utilisées : extraction au Soxhlet, extraction aux micro-ondes et extraction par ultrasons et les résultats obtenus sont les suivants : l'extraction par ultrasons donne le rendement le plus élevé, suivi de l'extraction aux micro-ondes, puis de l'extraction au Soxhlet, avec des rendements respectifs de 0,15%, 0,12% et 0,04%.

Les résidus obtenus par ces trois méthodes d'extraction sont ensuite caractérisés à l'aide de quatre techniques d'analyse : coloration, chromatographie sur couche mince (CCM), spectroscopie UV-visible et chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Toutes ces techniques confirment la présence d'alcaloïdes.

Enfin, l'activité insecticide est évaluée par le biais d'un test *in vivo* sur des plants de fèves infestés par l'insecte ravageur *Aphis fabae*. Des extraits d'alcaloïdes purs et des extraits bruts de graines de *Datura* à différentes concentrations sont appliqués, sous contrôle d'un témoin. Cette évaluation met en évidence l'effet insecticide de l'extrait brut des graines de *Datura*, attribué aux alcaloïdes qu'il contient, avec des taux moyens de mortalité d'environ 70% pour les deux types d'extraits.

Mots clés : *Datura*, alcaloïdes, extraction, insecticide.

Abstract

This work aims to compare different methods of extracting alkaloids from *Datura innoxia*, exploit the insecticidal properties of this plant, and highlight the role of alkaloids in these properties. Firstly, the plant is identified from a botanical and pharmacognostic perspective.

Next, three extraction methods are employed: Soxhlet extraction, microwave extraction, and ultrasound extraction and the results obtained are as follows: ultrasound extraction provides the highest yield, followed by microwave extraction, and finally Soxhlet extraction, with respective yields of 0.15%, 0.12%, and 0.04%.

The residues obtained from these three extraction methods are then characterized using four analysis techniques: staining, thin-layer chromatography (TLC), UV-visible spectroscopy, and high-pressure liquid chromatography (HPLC). All these techniques confirm the presence of alkaloids.

Finally, the insecticidal activity is evaluated through an *in vivo* test on bean plants infested with the pest *Aphis fabae*. Pure alkaloid extracts and crude *Datura* seed extracts at different concentrations are applied, with a control group. This evaluation highlights the insecticidal effect of the crude *Datura* seed extract, attributed to the alkaloids it contains, with average mortality rates of around 70% for both types of extracts.

Keywords: *Datura*, alkaloids, extraction, insecticide.