

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de chimie

Mémoire

Pour obtenir le diplôme de Master en Chimie

Spécialité : Chimie des produits naturels

Intitulé :

**Contribution à l'étude phytochimique et
biologique d'une espèce de la famille des
Fabacées**

Présenté Par

Hayet SALAH

Selma TOUDJI

Devant le jury composé de :

Mr. ABDALLAH EL HADJ.A

Professeur

Président

M^{me} BOUKAABACHE.R

Maître de conférences B

Examinatrice

M^{me} AISSAOUI. M

Maître de conférences B

Promotrice

Blida, 6 juillet 2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique, et biologiques d'une espèce de la famille Fabacée (leguminosae). L'objectif de notre contribution consiste en la valorisation de la flore algérienne par la recherche des composés qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique.

L'étude que nous avons menée dans le cadre de notre mémoire porte sur un screening chimique des parties aériennes d'une espèce du genre *Ononis*, la quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits chloroforme, chlorométhanol, et méthanol par les méthodes colorimétriques, l'évaluation de l'activité antioxydante par trois méthodes différentes: la méthode de réduction de radical libre DPPH, réduction du fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène, et enfin l'évaluation de l'activité antibactérienne des trois extraits.

Le screening chimique effectué sur l'espèce étudiée a permis la mise en évidence de plusieurs groupes chimiques comme les flavonoïdes, les tanins galliques, les quinones, les alcaloïdes, les triterpènes, et les saponines.

Les résultats des dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes ont montré que l'extrait méthanolique présente les taux les plus élevés en polyphénols et en flavonoïdes totaux et par conséquent une activité antioxydante remarquable vis à vis le radical libre DPPH et le test de blanchissement du β -carotène.

Pour le pouvoir réducteur, les résultats montrent que l'extrait chloroforme présente une capacité la plus élevée de réduction du fer ferreux.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Bacillus cerous* et *Pseudomonas aeruginosa* . Selon la méthode de diffusion de disque. La concentration manifestée par les trois extraits est de 50 mg/ml pour l'extrait méthanolique et 25mg/ml pour les extraits chloroformique et chlorométhanolique .

Tous les extraits ont un effet sur les microorganismes testés sauf les extraits chloroformique et chlorométhanolique sur *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : Phytochimie, *ononis*, fabacée, dosage, activité antioxydante, DPPH, FRAP, blanchissement du β -carotène. Activité antibactérienne.

Abstract

This work is devoted to the phytochemical and biological study of a species of the Fabaceae family. The objective of our contribution is the valorization of the Algerian flora by the search for compounds which can find a therapeutic use.

The study we carried out in our manuscript deals with a chemical screening of the aerial parts of a species of the genus *ononis*, quantification of the total polyphenols and flavonoids of the chloroform, chloromethanol and methanol extracts by colorimetric methods, evaluation of antioxidant activity using : the DPPH free radical reduction method, iron reduction (FRAP) and β -carotene bleaching and finally the evaluation of the antibacterial activity of the three extracts against some bacterial strains.

Chemical screening carried out on the specie *A. tenuifolius* allowed the detection of several chemical groups such as flavonoids, tannins, quinones, alkaloids, saponisids, triterpenes.

The results of the total polyphenols and flavonoids assays showed that the methanol extract exhibits the highest levels of total polyphenols and flavonoids and therefore a remarkable antioxidant activity against the DPPH free radical and bleaching of β -carotene tests.

For the reducing power, the results show that the chloroforme extract showed the highest capacity reduction of ferrous iron. followed by the methanolic extract and the chloromethanolic extract. For the reduction of free radical DPPH, the plant gave a better result compared to the positive control.

Antimicrobial activity was determined on four bacterial strains, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Bacillus cerous* and *Pseudomonas aeruginosa* according to the disk diffusion method. The concentration shown by the three extracts 50mg/ml for the methanolic extract and 25mg/ml for the chlroformic and chlromethanolic extracts All the extracts have an effect on the microorganisms tested except the chlroformic and chlromethanolic extracts on *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Phytochemistry, *ononis*, fabaceae, assay, antioxidant activity, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching. Antibacterial activity.

الملخص

هذا العمل مكرس للدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية لأنواع من عائلة البقول البقولية (البقول البقولية). يتمثل الهدف من مساهمتنا في تبيين النباتات الجزائرية من خلال البحث عن المركبات التي يمكن أن تجد استخدامًا علاجيًا. تتعلق الدراسة التي أجريناها كجزء من أطروحتنا بالفحص الكيميائي للأجزاء الهوائية لنوع من جنس *Ononis* ، والتقدير الكمي للبوليفينول والفلافونويد الكلي لمستخلصات الكلوروفورم والكلوروميثانول والميثانول بالطرق اللونية وتقييم مضادات الأكسدة بثلاث طرق مختلفة: طريقة تقليل DPPH الجذور الحرة ، تقليل الحديد (FRAP) وتبييض بيتا كاروتين ، وأخيرًا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الثلاثة. سمح الفحص الكيميائي الذي تم إجراؤه على الأنواع المدروسة بتحديد العديد من المجموعات الكيميائية مثل مركبات الفلافونويد ، والعفص الغالي ، والكينون ، والقلويدات ، والترتريين ، والصابونين. أظهرت نتائج فحوصات البوليفينول والفلافونويد الكلية أن مستخلص الميثانول يحتوي على أعلى مستويات البوليفينول والفلافونويد الكلي وبالتالي له نشاط مضاد للأكسدة ضد الجذور الحرة DPPH واختبار التبييض. بالنسبة لقوة الاختزال ، أظهرت النتائج أن مستخلص الكلوروفورم لديه أعلى قدرة على تقليل الحديدوز. تم تحديد نشاط مضادات الميكروبات على أربع سلالات بكتيرية هي *Staphylococcus aureus* و *Escherichia Coli* و *Bacillus cerous* و *Pseudomonas aeruginosa*. حسب طريقة انتشار القرص. التركيز الموضح في المستخلصات الثلاثة هو 50 مجم / مل للمستخلص الميثانولي و 25 مجم / مل لمستخلصات الكلوروميثانول والكلوروميثانول. جميع المستخلصات لها تأثير على الكائنات الحية الدقيقة المختبرة ما عدا مستخلصات الكلوروميثانول والكلوروميثانول على المكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحية: كيمياء النبات ، *ononis* ، *fabaceae* ، المقايسة ، نشاط مضادات الأكسدة ، DPPH ، FRAP ، تبييض بيتا كاروتين. نشاط مضاد للجراثيم.



Remerciement

Nous remercions tout d'abord Allah tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions nos chers parents qui nous ont aidés à être ce que nous sommes et Qui nous ont entourés avec tant d'amour et d'affection. On remercie leur dévouement, leur consacre de temps et leur présence constante au cours de toutes ces années d'études .et un merci du fond du nos coeur à nos sœurs qui ont été toujours à notre côtés, qui nous ont soutenues et sur tout nous ont supportées au moment difficiles.

Nous avons la reconnaissance et la gratitude à remercier Madame AISSAOUI Meriem, notre encadreur, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour nous avoir guidées dans notre travail,

Nous tenons à remercier Monsieur ABDELLAH ELHADJ Abdellah pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance. Nous voudrions exprimer notre gratitude à Madame BOUKAABACHE pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous remercions sincèrement Monsieur MEZRAG Abderrahmane pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils au cours de notre formation

A toutes les personnes dont les noms ne sont pas cités mais qui se reconnaîtront, je leur adresse un hommage pour tous ses encouragements



Dédicace



*Je dédie ce modeste travail
Tout d'abord et spécialement à mes parents pour leurs
Encouragements,
Tendresse, disponibilité et leurs sacrifices durant toutes
Mes années d'étude, c'est
Grâce a eu que je suis arrivée à cette étape de ma vie merci
Ma mère, merci mon père.
Mes chères soeurs : nassima, zola, zineb je vous dis merci
infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci
pour votre aide, vos conseils et aussi vos encouragements.
A mes frères :fatah,fares,salim
A toutes mes amies
A mon binôme Selma qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce travail et sa famille
A tous ceux qui nous ont aidés pour réaliser ce travail
De près ou de loi*



Hayet



Dédicace

*A l'aide de dieu "ALLAH" tout puissant
Qui m'a tracé le chemin de ma vie
J'ai pu réaliser ce travail.*

Que je dédie :

*A ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mon père **Djamel el-Dinne** et ma mère **Nadia**, qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apporté son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.*

*A mes yeux chers sources **Fella** et **soumia**.*

*A mon cher binôme **hayet** avec qui j'ai partagé mes bons moments.*

*A tous nos **professeurs** qui nous ont enseigné.*

*A tous ceux qui aiment la **science**.*

Selma



LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Distribution géographique de la famille Fabacées.	5
Figure I.2 : photos des plantes de genre Ononis.....	7
Figure II.1: broyage de la plante	20
Figure II.2 : macération a froide d'extrait Chloroforme	20
Figure II.3: filtration d'extrait Chloroforme	21
Figure II.4 : évaporation sous pression réduite à 35-40 C°	21
Figure II.5: Extrait methanol.....	21
Figure II.6: Extrait Chloroforme	21
Figure II.7 : Extait chloromethanol	21
Figure II.8 : Protocole d'extraction	22
Figure II.9 : Préparation des extraits	23
Figure II.10: protocole de dosage des polyphénols totaux.....	28
Figure II.11: protocole de dosage des polyphénols totaux	29
Figure II.12: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	30
Figure II.13: Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH [25].....	31
Figure II.14:Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant	32
Figure II.15: Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur fer	34
Figure II.16: Mécanismes de l'action antioxydante retardeur briseur de chaîne..	35
FigureII.17 : Protocole du blanchissement du β -carotène.....	36
Figure III.1: Histogrammes schématiques des résultats obtenus pour l'extraction des 185 g sèche de la plante étudiée.....	38
Figure III.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	43
Figure III.3: Dosage des polyphénols totaux	43
Figure III.4 : Les histogrammes de la quantité en ($\mu\text{g EAG/mg}$) des polyphénols dans les trois extraits.....	44
Figure III.5: Courbe d'étalonnage de la quercétine	45
Figure III.6 : Dosage des flavonoïdes totaux	45
Figure III.7 : Les histogrammes de la quantité en ($\mu\text{g EQ/mg PS}$) des Flavonoïdes dans les trois extraits.....	46
Figure III.8: Activité anti radicalaire (DPPH).....	48

Figure III.9: Courbes représentants le % d'inhibition du DPPH par différents extraits	48
Figure III.10: Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par standard testé (Acide ascorbique) En fonction de la concentration.....	49
Figure III.11 : Les valeurs d'inhibition (IC50) des extraits et des standards.....	50
Figure III.12: Pouvoir réducteur frappe des extrais de Ononis	50
Figure III.13: Courbe d'absorbance de test FRAP en fonction de la concentration	51
Figure III.14: Courbe d'absorbance de BHT en fonction de la concentration.....	51
Figure III.15 : Les histogrammes des concentration efficace (EC50) des extraits et de standard BHT.....	52
Figure III.16: Courbe d'absorbance de β -carotène en fonction du temps en présence des extraits et de référence	53
Figure III.17: Activités de blanchiment de β -carotène.....	53
Figure III.18 : Histogramme représentatif d'activité antioxydante % des extraits et de BHA pour le test de blanchissement de β -carotène.....	54
Figure III.19 : activité de E.Co.....	56
Figure III.20 : activité de P. aeruginosa.....	56
Figure III.21 : activité de Staphylococcus Aureus.....	56
Figure III.22 : activité de Bacillus cerous.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Position systématique des Fabacées	4
Tableau I.2: Classification systématique de genre Ononis	7
Tableau I.3: quelque polyphénols et acide phénoliques isolé de genre Ononis	10
Tableau I.4: Quelques flavonoïdes isolé du genre Ononis	12
Tableau III.1: Rendement de l'extraction des extraits de l'espèce du genre Ononis	38
Tableau III.2.: Résultats de screening phytochimique	39
Tableau III.3 : Taux des polyphénols dans les extraits de notre plante	44
Tableau III.4: Taux des flavonoïdes dans les différents extraits.....	46
Tableau III.5: valeur des IC50 des extraits	49
Tableau III.6: Les valeurs de EC50 des extraits.....	51
Tableau III.7 : Activité de blanchissement du β -carotène des extraits et de standard	53
Tableau III.8: Résultats de l'antibiogramme des extraits de Ononis	55

LISTE DES ABRIVIATIONS

O: *Ononis*

BHT: butyl hydroxy toluéne

BHA: butyl hydroxy anisole

DPPH: 2,2-déphenyle-1-picryldrazyl

FRAP: ferric reducing antioxidant power

FCR : Folin-Ciocalteu

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium

µg EAG/mg : microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme

µg EQ/mg : microgrammes d'équivalents quercétine par milligramme

HgCl₂ : chlorure mercurique

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

NaH₂PO₄ : sodium d'hydrogène phosphate

TCA : acide trichloro acétique

DMSO : diméthyle sulfonyle

TP : tampon phosphate

TPTZ: tripyridy-s-tri-azine ferrique

IC₅₀ : concentration d'inhibition médiane à 50%

EC₅₀ : concentration efficace à 50%

I% : pourcentage d'inhibition

ATCC : American type culture collection

TABLE DES MATIERES

Remercîment	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Listes des figures	
Listes des tableaux	
Abréviations	
Table des matieres	
Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1. Introduction.....	3
I.2. La famille des Fabacées (Les légumineuses).....	3
I.2.1. Généralités	3
I.2.2 Place dans la systématique :	3
I.2.3 Description botanique :	4
I.2.4 Répartition géographique :	5
I.2.5 Importance économique des fabacées :	5
I.2.6 Usage traditionnel et intérêt thérapeutique :	6
I.3. Le genre <i>Ononis</i>	6
I.3.1. Description botanique du genre <i>Ononis</i>	6
I.3.2. Classification systématique :	7
I.3.3. Usage traditionnel	7
I.3.3.1 En médecine traditionnelle :	7
I.4. Pharmacologie du genre <i>Ononis</i>	8
I.5. Les métabolites secondaires chez le genre <i>Ononis</i>	9
I.5.1 Les polyphénols	9
I.5.2. Les flavonoïdes	12
I.5.3. Les tanins	17
I.5.3.a Tanins hydrolysables :	17
I.5.3.b. Tanin condensés.....	17

I.6 Activité biologique.....	17
I.6.1 Activité antioxydante	17
I.6.2. Définition.....	17
I.6.3. Les radicaux libres.....	17
I.6.4. Le stress oxydatif.....	18
I.7. Les polyphénols comme antioxydants	18
I.7.1. Activité des flavonoïdes vis-à-vis des radicaux libres	18
I.8. Activité antibactérienne	19
I.9. Conclusion	19

Référence bibliographiques

Chapitre II : Partie expérimentale

II.1. Introduction	20
II.2 Etude phytochimique.....	20
II.2.1. Récolte du matériel végétal	20
II.2.2. Préparation des extraits	20
II.3. Screening phytochimique:	23
II.3.1. Préparation des extraits	23
II.3.2. Tests de caractérisations	24
II.3.2.1. Test de flavan 3, 4diols (test bate-smith).....	24
II.3.2.2. Test de flavonols et flavanones (test de Wilstater)	24
II.3.2.3. Test des tanins	24
II.3.2.4. Test des quinones	24
II.3.2.5. Test des antraquinones	25
II.3.2.6. Test des alcaloïdes	25
II.3.2.7. Test des terpènes et des stérols insaturés	25
II.3.2.8. Test des triterpénoïdes	26
II.3.2.9. Test des saponines (indice de mousse).....	25
II.3.2.10. Test des coumarines.....	27
II.4. Quantification des composés phénoliques.....	27
II.4.1. Dosage des polyphénols totaux :.....	27
II.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux:	29
II.5. Evaluation de l'activité antioxydante	30
II.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	30
II.5.2. Test de détermination du pouvoir réducteur FRAP	32
II.5.3. Test de blanchissement du β -carotène:.....	34

II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	36
II.7.1. Stérilisation du matériel	36
II.7.2. Préparation des dilutions d'extraits.....	37
II.7.3. Préparation de l'inoculum.....	37
II.7.4. Ensemencement et dépôt des disques.....	37
II.8 conclusion	37

Référence bibliographiques

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Introduction	38
III.2. Etude phytochimique.....	38
II.2.1. Rendement de l'extraction	38
III .2.2. Screening phytochimique	39
III.2.3.Résultats de l'étude quantitative :.....	43
III.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :.....	43
III.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	45
III.3. Activités biologiques <i>in vitro</i>	47
III 3.1. Activité antioxydante.....	47
III 3.1.1. Évaluation de pouvoir antiradicalaire par le DPPH :.....	47
III 3.1.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)	50
III 3.1.3. Test de blanchissement du β -carotène	52
III .4. L'Activité antimicrobienne	54
III.5. Conclusion	57

Références bibliographiques

Conclusion générale et Prescriptives

Introduction générale

Depuis de nombreuses années, les plantes médicinales jouent un rôle important dans la médecine et la pharmacologie. Aujourd'hui, on estime qu'environ 80% de la population mondiale repose sur des préparations botaniques comme médicaments pour répondre à leurs besoins de santé. [1] Les plantes médicinales demeurent une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement en l'absence d'un système médicinal moderne. Ceci est dû au fait que les plantes médicinales offrent diverses biomolécules utilisées comme remèdes contre plusieurs maladies [2]. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires et constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques. C'est le cas par exemple des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme antimicrobiens, antioxydants et antihémolytiques [3] c'est pour cela que ces produits naturels sont très demandés dans le monde. D'autre part, l'industrie pharmaceutique s'appuie amplement sur les métabolites secondaires végétaux pour l'élaboration de nouveaux médicaments.

A partir du positionnement et des enjeux de la recherche mentionnés précédemment, et au regard des besoins d'identifier des nouvelles molécules à activités biologiques nous avons pu poser notre problématique de recherche et pour cela nous avons donc décidé de rechercher au sein de la biodiversité végétale algérienne, de nouvelles molécules ayant de grande potentialité. Malgré son importance seule une petite partie des espèces végétales est étudiée du point de vue chimique et pharmacologique. Par conséquent, les chances sont importantes d'isoler de nouveaux métabolites actifs ou de découvrir d'autres activités à des composés connus.

C'est dans cette optique que se situe notre travail qui s'attèle à l'étude à une espèce du genre *Ononis* en se basant sur l'endémisme et les caractéristiques médicinales. Cette espèce appartenant à la famille Fabacées (Légumineuses) qui est la plus importante famille parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

La présentation de ce mémoire sera comme suit :

- Le premier chapitre consacré à la synthèse bibliographique, la description de la famille des fabacées et particulièrement le genre *Ononis* et ses métabolites secondaires
- Le second chapitre sera consacré aux travaux expérimentaux qui comportent :

Screening phytochimique, extraction, le dosage polyphénols et flavonoïdes ainsi l'activité antioxydante des extraits par trois méthodes (DPPH, réduction du fer FRAP, blanchissement du β -carotène), et l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de notre plante.

- Le dernier chapitre regroupe les différentes observations et la discussion des résultats obtenus.
- Nous terminerons notre étude par une conclusion et des prescriptives.

Références bibliographiques

- [1] Sofowora A. Plantes Médicinales Et Médecine Traditionnelle D'afrique. Edition Karthala. (2010) P.22.
- [2] Khadhri .A, El Mokni.R, Smiti.S, Composes Phenoliques Et Activites Antioxydantes De Deux Extraits De Chardon A Glu: *Atractylis Gummifera* Article ·(January 2013) Pp 44-52
- [3] F. Haddouchi · T.M. Chaouche · N. Halla. Phytochemical Screening, Antioxidant Activities And Hemolytic Power Of Four Saharan Plants From Algeria, *Phytotherapie*, V .5, N°2 (December 2018)

I.1. Introduction

L'Algérie, grâce à sa situation géographique, son relief, sa grande variété de climats et de sols, possède une flore variée dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. On y trouve plus de 3000 espèces végétales constituant ainsi une source remarquable de métabolites secondaires dotés d'activités pharmacologiques

I.2 La famille des Fabacées (Les légumineuses)

I.2.1. Généralités

La grande famille des Fabacées (de *Faba*= la fève), s'appelle aussi famille des Légumineuses puisque leurs fruits se nomment gousses ou légumes [1]. Cette famille est la troisième plus grande famille de plantes à fleurs, derrière seulement les orchidées (Orchidaceae) et les asters (Asteraceae). Avec environ 700 genres et 20 000 espèces dans le monde [2]. Les légumineuses viennent juste après les Poacées (les graminées) en importance agricole et économique. La famille comprend des variétés horticoles et de nombreuses espèces récoltées comme cultures et pour les huiles, les fibres, le carburant, le bois, les médicaments et les produits chimiques[3].

L'évolution des Fabacées se traduit par : *la réduction du nombre des étamines*, et surtout la création d'une fleur *zygomorphe*. Ces tendances évolutives, plus ou moins synchrones, conduisent à de très nombreux types floraux, des plus archaïques aux plus évolués.

Les Fabacées peuvent être subdivisées en quatre sous-familles :

- ❖ Les *Bauhinioïdées* comprenant les arbres à orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*) ;
- ❖ Les *Césalpinioïdées* et les *Mimosoïdées* qui comprennent surtout des arbres des pays chauds : *Mimosa*, *Acacia*, *Cassia* ;
- ❖ Les *Faboïdées* (du genre *Faba*, Fève), autrefois appelées Papilionacées, en raison de la forme de la corolle en « papillon », les Trèfles, les Pois, les Haricots... [4]

I.2.2. Place dans la systématique :

La classification phylogénétique (APG 2009), est une classification scientifique moderne des angiospermes établies selon les travaux d'une équipe de chercheurs (The Angiosperms Phylogeny Group). Reflet d'un consensus sur les connaissances acquises lors de sa publication en 1998, cette classification a été révisée en 2003 et en 2009, elle traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique

Tableau I.1 : Position systématique des Fabacées [5]

Classification	APGIII (2009)
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae
Classe	Eudicotyledonae
Sous classe	Rosidae
Ordre	Eurosidae I(fabidées)
Sous ordre	Fabales
Famille	Fabaceae (Leguminosae)
Sous Famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinoideae Bauhinioides

I.2.3. Description botanique :

Les plantes de la famille Fabacées des sont incroyablement diverses de toutes les manières imaginables et défient toute généralisation sur presque tous les attributs. Leur nom est très variable et va des minuscules formes à une seule graine aux gousses ligneuses d'un mètre de long et des légumineuses déhiscentes typiques aux ailées indéhiscentes dispersées par le vent. [2].

Les racines présentent des renflements ou *nodosités*. Ce sont des radicelles déformées à la suite d'une infestation par des bactéries, les *Rhizobium*, dont il existe plusieurs variétés ou espèces suivant la Fabacée atteinte. Il s'établit une symbiose entre cette dernière et la bactérie. Celle-ci fixe l'azote atmosphérique, empruntant l'énergie nécessaire dans les sucres formés par la plante. En retour, cette dernière utilise la majeure partie de l' NH_3 synthétisée par la bactérie [4].

Les feuilles, primitivement alternes, composées-imparipennées et stipulées, peuvent évoluer vers une feuille simple, ou vers une feuille composée-pennée ; en particulier, la foliole terminale se transforme souvent en *vrille* et les *stipules* peuvent devenir plus importantes que les feuilles, voire les remplacer [4].

Les fleurs sont solitaires ou rassemblées en panicules, en fascicules, en racèmes, en épis ou en têtes axillaires et terminales ou opposées aux feuilles comme chez certains membres des *Bossiaecae* [6]

Le fruit est une gousse ou un légume qu'on appelle un fruit sec a deux ouvertures :

Ventrale et dorsale. Le nombre d'ovules dans chaque fruit est variable selon les espèces. Les graines résultant d'un ovule courbe, sont elles-mêmes arquées. Elles sont exalbuminées et riche en amidon (pois, fèves et lentilles), en huile (arachides, graines de Soja), et en matières protéiques (graines de soja). [4,7]

I.2.4. Répartition géographique :

La famille Fabacées est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes comme en Afrique du Sud ou le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées [8].



Figure I.1 : Distribution géographique de la famille Fabacées. [8]

I.2.5. Importance économique des fabacées :

Les Légumineuses ont une grande importance économique, étant une source de protéines végétales (graines en particulier des *Papilionaceae*) pour l'alimentation animale ou humaine dont la culture ne nécessite pas d'engrais azotés. C'est aussi une source de matières grasses (huile d'arachide) et de bois (légumineuses des régions tropicales). On y rencontre aussi des espèces qui présentent un intérêt en plus que plantes alimentaires comme plantes fourragères, pharmaceutiques, industriels et ornementales. [9]

I.2.6. Usage traditionnel et intérêt thérapeutique :

Certaines espèces de la famille Fabacées ont été utilisées pendant de nombreuses années de médecine traditionnelle pour traiter le rhumatisme, l'arthrite, l'inflammation, le néoplasme, L'hémorroïde, la bronchite, l'asthme, les infections des voies urinaires et les maladies du foie, Il est rapporté que la famille Fabacées ait une riche tenace d'acides phénoliques et de flavonoïdes [10].

I.3. Le genre *Ononis*

Ononis L., est un grand genre de la sous famille faboideae tribuononideae famille fabaceae, ce genre il a d'abord été reconnu par Linnaeus (1753, 1754) décrite 17 espèces. Et maintenant, c'est comme environ 86 espèces dans le monde, le nom d'*Ononis* à été donné du mot grec onos signifiant âne et un aliment préféré de cet animal. [11], ce genre et distribuée par deux sections, la première section qui s'appelle *Ononis* et la deuxième section qui s'appelle *natrix* [12]. Ce genre et répondu en Europe, dans les îles de l'Atlantique, en Asie de l'ouest et en Afrique de Nord et surtout distribué près des côtés de la mer méditerranée [13], En Algérie on rencontre principalement les espèces suivantes : [14]

<i>O. cenisia</i> (L.)	<i>O. alba</i> (Poiret.)	<i>O. spinosa</i> (L.)
<i>O. hispida</i> (Desf.)	<i>O. euphrasiaefolia</i> (Desf.)	<i>O. pusilla</i> (L.)
<i>O.serotina</i> (Pomel.)	<i>O. reclinata</i> (L.)	<i>O. ornithopodioides</i> (L.)
<i>O. biflora</i> (Desf.)	<i>O. viscosa</i> (L.)	<i>O. antennata</i> (Pomel.)
<i>O. laxiflora</i> (Desf.)	<i>O. sicula</i> (Guss.)	<i>O. mitissima</i> (L.)
<i>O. laxiflora</i> (Desf.)	<i>O. natrix</i> (L.)	<i>O. variegata</i> (L.)
<i>O. pendula</i> (Desf.)	<i>O. aragonensis</i> (Asso.)	<i>O. crinita</i> (Pomel.)
<i>O. alopecuroides</i> (L.)	<i>O. fruticosa</i> (L.)	

I.3.1. Description botanique du genre *Ononis*

Les plantes appartenant au genre *ononis*, les élamines sont réunies ensemble par leur base, la gousse et renflée, sessile, et renforme un petit nombre de graines, herbes ou sous arbrisseaux à feuille ternées, à folioles dentés en scie, à stipules adhérent ou pétale, a fleure rarement terminales, presque toujours axillaires, sessiles ou pédonculées, jaunes ou rougeâtres. [15]

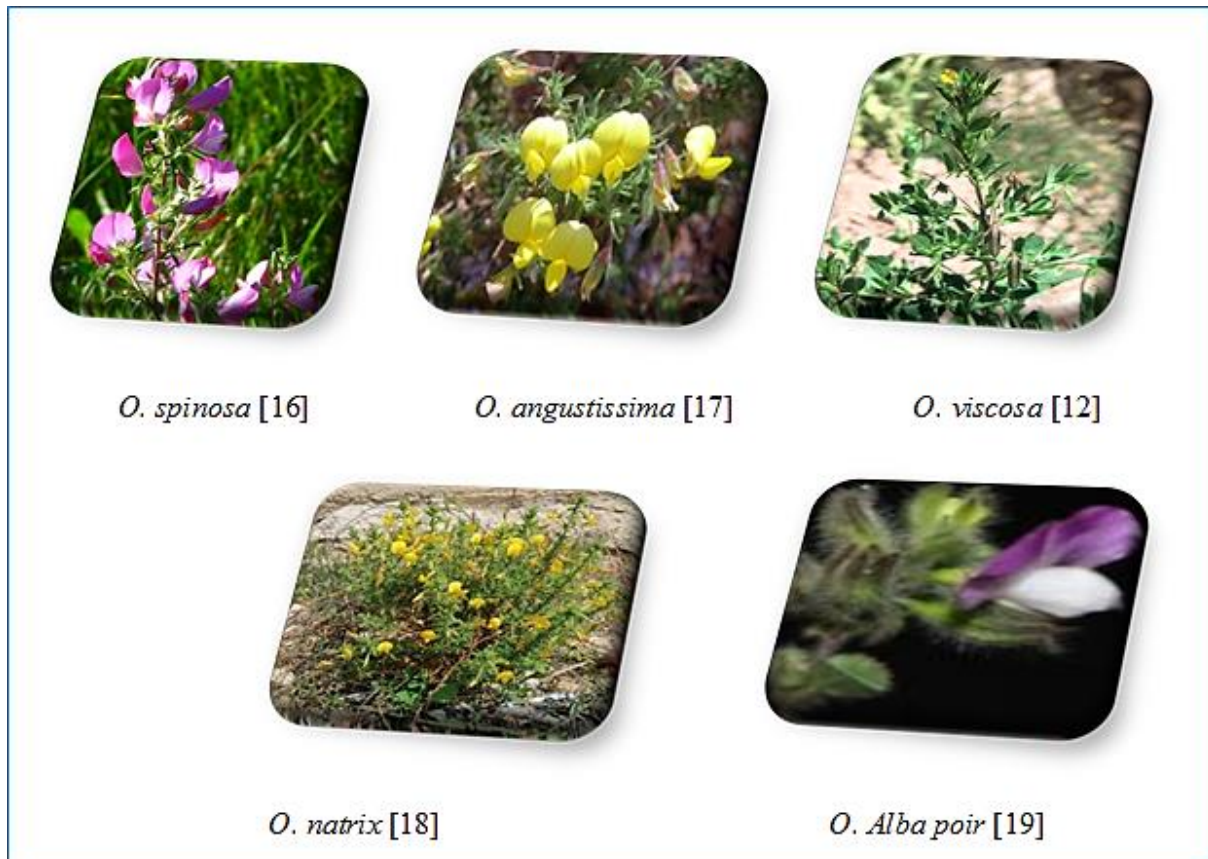


Figure I.2 : photos des plantes de genre *Ononis*.

I.3.2. Classification systématique :

D’après Al- Sanafi, A.E [20], La classification de ce genre et comme suit :

Tableau I.2: Classification systématique de genre *Ononis*

Rayaume	Plante
Sous Rayoume	Tracheobionta.
Super division	Spermatophytes.
Classe	Magnoliophyta.
Sous classe	Rosidés.
Ordre	Fabales.
Famille	Fabacées
Genre	<i>Ononis</i>

I.3.3. Usage traditionnel

I.3.3.1. En médecine traditionnelle :

D'après les recherches biologiques sur le genre *Ononis* nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs effets laxatifs, diurétique, antitussif, apéritif, lithontriptique [19], ainsi que contre les maladies de la peau [13].

Parmi ces espèces on cite :

- *Ononis spinosa* : l'infusion de l'espèce était utilisée dans le traitement de l'hydropisie, des infections des voies urinaires, des inflammations et des rhumatismes, ainsi qu'utilisé pour la cicatrisation des plaies, de l'eczéma et des autres affections cutanées [19].
- Une sous espèce de *Ononis spinosa L. (leiosperma)* de la région iraquienne, la partie aérienne de cette décoction d'espèce est utilisée comme diurétique, laxatif doux, les racine étaient utilisées comme diurétique, purification sanguine et expectorant. [11].
- *Ononis hirta* : l'extrait ou méthanol de parties aériennes a inhibé la prolifération de différentes lignées cellulaires cancéreuses [11].
- *Ononis natrix* : utilisée comme antirhumatisme, diurétique, urolithiatique et pour réduire la tension artérielle [13].
- Les racines de *Ononis spinosa L*, *Ononis arvensis L*, *Ononis hirsinajacg* et *Ononis antiquorum L*, sont utilisées contre les irritations de la peau, les démangeaisons, les plaies et les dermatites [13].
- *Ononis sicula* : utilisée pour la cicatrisation des plaies ainsi que contre les boutons de fièvre. [13].
- *Ononis angustissima* : Cette plante est utilisée traditionnellement en Algérie pour leur propriété hémostatique [21].

I.4. Pharmacologie du genre *Ononis*

D'après les recherches scientifiques monteraient que les espèces de genre *Ononis* ayant plusieurs activités biologiques : analgésiques, antiviraux, antifongique, antiseptique. [13], antimicrobienne, dermatologiques, anticancéreux, hépatoprotecteur et antibiofilm. [20], anti-hémolytique [22], antipyrétique, antibiotique, antidiabétique [23], anti-inflammatoire, [13] [22,36], antioxydant. [17,18,23], antibactérienne. [24,26], cytotoxique [13,24,25], anti-obésité. [26].

- ➔ Les résultats d'étude des extraits brut éther de pétrole, acétate d'éthyle le *n*-butanol de l'espèce *Ononis mitissima*, montre que les extraits testés ont des activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-hémolytique, l'activité anti-hémolytique la plus forte a été observée par l'extrait acétate d'éthyle. [22]

- ➔ *Ononis viscosa* à montre une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram⁺ [24]
- ➔ Dans une recherche de niveaux produits naturels à explorer comme médicament anticancéreux, deux espèce (*O. Diffusa*, *O. variegata*), ont été criblées contre des lignées cellulaire de cancer colorectal, L'activités cytotoxique des extraits bruts de *O. Diffusa* à montrait une activités cytotoxique remarquable. [25]
- ➔ Diverses activités biologiques ont été décrites pour les extraits de *O. spinosa* telles qu'antibactérienne, antifongique, inhibiteur de la hyaluronidase-1, activité antiinflammatoire en inhibant la 5-lipoxygénase et la voie de signalisation du récepteur de type Toll 4., les racines sont utilisées comme composant de combinaisons à base de plantes anti-obésité [26].
- ➔ Les résultats d'étude phytochimique et biologique des extraits de partie aériennes et l'exsuda tde *Ononis angustissima* montré une activités antioxydant. [17], une autre étude montre que l'huile essentielle de la partie aérienne de cette plante exprimé une activité cytotoxique contre la ligne de cellule hélicoïdales, et un effet anti bactérienne important contre les souches bactérienne *P. aeruginosa* et *E. faecalis*. [24]

I.5. Les métabolites secondaires chez le genre *Ononis*

Des études phytochimiques sur les espèces de *ononis* révèlent que ces plantes contiennent du sucre, du tanin, de la saponine, des lectines, des dérivés de flavonoïdes (tels que la trifolirhizine, l'ononine, la formononétine, la génistéine,...), des acides phénoliques (gallique, protocatéchique, phydroxybenzoïque, vanillique, caféique, p-coumarique, férulique, acide sinapique), huiles essentielles (anéthol, carvon et menthol comme principaux composants), stérols (β -sitostérol, campestérol, stigmastérol), substances terpéniques (β -amyrine, α -onocérine), dérivés de l'acide anthranilique et du résorcinol, lactones aromatiques et coumarines. [13]

I.5.1 Les polyphénols

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble des substances chimiques l'élément structurel fondamentale qui les caractérise et la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié directement ou moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...), ces composés forment le principe actif de nombreuses plantes médicinales, ils sont abondants chez les plantes vasculaires et localisés dans : racines, tige, bois, et fruit.

Chapitre I

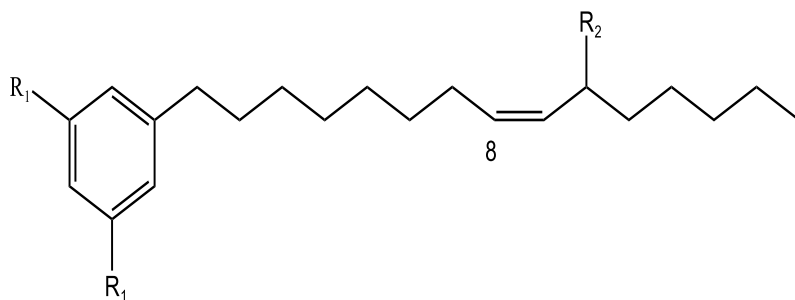
Synthèse bibliographique

Les composés phénoliques sont issus de deux grands voies d'aromagenèse, la voie plus courante est celle qui via le shikimate (l'acideshikimique) conduit les oses ou acides aminés aromatique (phényl alanine et tyrosine) puis par désamination de ces dernier ou acide cinnamique et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, coumarine, lignanes et lignines...ect [27].

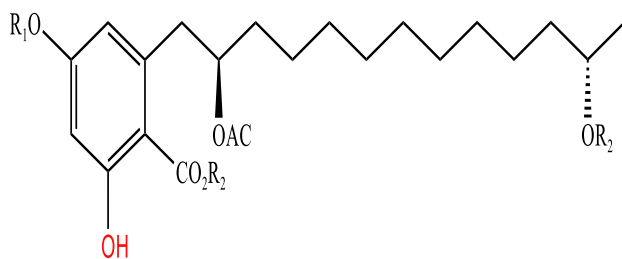
Tableau I.3: quelque polyphénols et acide phénoliques isolé de genre *Ononis*

Nom de l'espèce	Nom de produit	Référence
<i>O. speciosa</i>	<p>1.5-(10- acetoxy- pentadec-8Z- enyle)- resorcinol</p> <p>2. 5-(10- hydroxy- pentadec-8Z- enyle)- resorcinol</p> <p>3.5-(10- acetoxy- pentadec-8Z- enyle) - resorcinoldimethylether</p> <p>4.5-(10-oxo-pentadec-8Z-enyle)resorcinol dimethylether</p>	[28]
<i>O. viscosa</i>	<p>5. Acide (2' R, 12'S) -6-(2,12 diacetoxytridecyl)- 2,4- dihydroxy benzoïque</p> <p>6. methyl (2' R, 12'S) -6-(2,12 diacetoxytridecyl)- 2- hydroxy-4- methoxy benzoate</p> <p>methyl (2' R, 12'S) -6-(2,12 diacetoxytridecyl)-2,4- dihydroxy benzoate</p> <p>2-acetoxy-12-,hydroxytridecyl)-2- hydroxy-4- methoxy benzoate</p> <p>9.Acide(2'R,12'S) -6-(2-acetoxy-12-hydroxytridecyl)-2,4- dihydroxy benzoïque</p> <p>10.methyl(2'R,12'S)-6-(2-acetoxy-12hydroxytridecyl) -2,4- dihydroxy benzoate.</p>	[29]
<i>O. natrix</i>	<p>11. 1-O- methyl-5-(2- acetoxy tridecyle) resorcinol</p> <p>12.1-O-methyl-5-(2-acetoxy-8-oxotridecyle) resorcinol</p> <p>13.1-O- methyl-5-(2- acetoxy-8- hydroxy tridecyle) resorcinol</p> <p>14.1-O- methyl-5-(2- hydroxy tridecyle) resorcinol</p> <p>15.1-O- methyl-5-(2- hydroxy -8- oxo tridecyle) resorcinol</p>	[30]

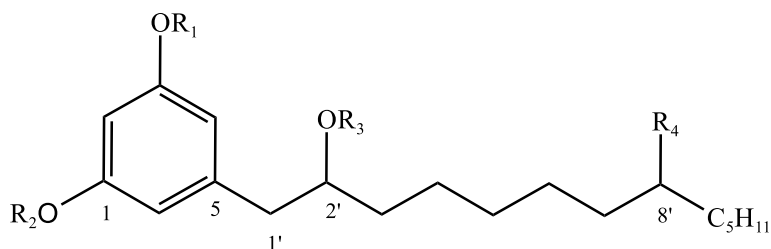
	16.1-O-methyl-5-(2-8-dihydroxy tridecyle) resorcinol	
<i>O.natrix.subramosissima</i>	17.5-(2- acetoxy-8- oxo tridecyle) resorcinol 18.5-(2-acetoxy-7-hydroxy-8-oxotridecyle) resorcinol	[31]



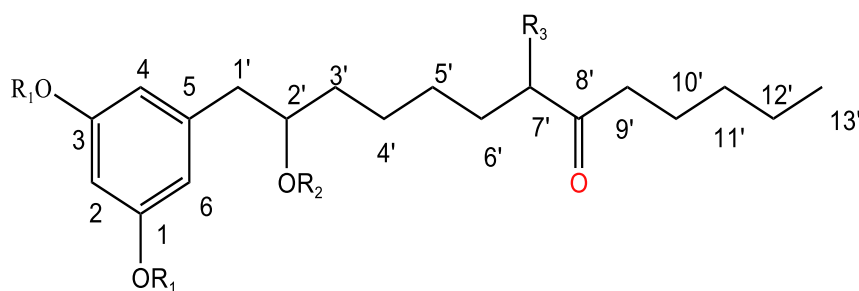
	R ₁	R ₂
1	OH	OAC
2	OH	OH
3	OMe	OAC
4	OMe	O=



	R ₁	R ₂	R ₃
5	H	H	OAC
6	Me	Me	OAC
7	H	Me	OAC
8	Me	Me	OH
9	H	H	OH
10	H	Me	OH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
11	CH ₃	H	H	H
12	CH ₃	H	AC	O=
13	CH ₃	AC	AC	OH
14	CH ₃	H	H	H
15	CH ₃	H	H	O=
16	CH ₃	H	H	OH



17	H	AC	H
18	H	AC	OH

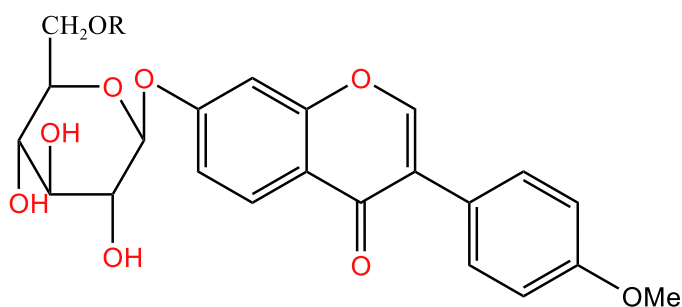
I.5.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigment quasiment universels des végétaux, il sont responsable de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait, possèdent la mémé élément structural de base , à savoir l’enchentot 2- phényl chromons[27], les trois carbone servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné.[32], il peuventêtre regroupés en une douzaine de classes (flavones, dihydroflavovols, flavonols, flavonones, flavan-3-ols, flavan-3,4,diols, chalcones, auronnes, anthosyanidols)selon le degré d’oxydation du noyau pyranique centrale, lequel peut être ouverte et recyclisé en un motif furanique.[27].

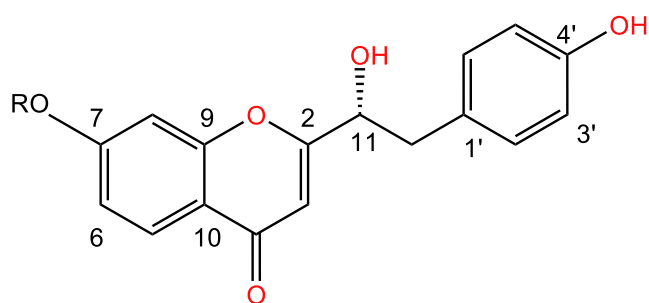
Tableau I.4: Quelque flavonoïdes isolé du genre *Ononis*

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	Référence
<i>O.spéciosa</i>	1.Ononine	[28]
	2. 6"-O-acetylononine	
<i>O.varginalise</i>	3.bishomoflavoneononine	[33]
	4.bishomoflavone glucoside	
<i>O.natrixsspramosissima</i>	5.Nevadensine	[34]
	6. Sideritiflavone	
	7. Acerosine	
	8. Hymenoxine	
	9. Xanthomicrol	
	10.Hypolaetin-8,3'-,4'- trimethyl	

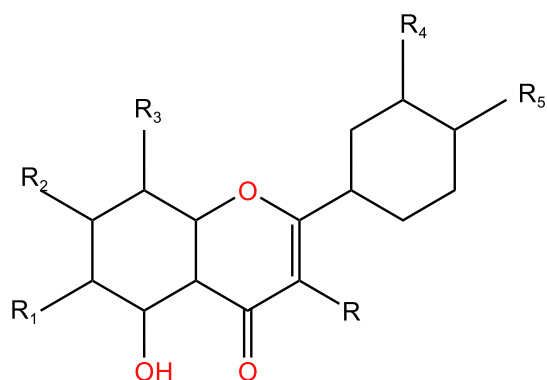
<i>O. angustissima</i>	<p>11. 2',3',4'- trihydroxychalcone</p> <p>12. 6- hydroxy aurone</p> <p>13. 2',4'- dihydroxychalcone</p> <p>14. 5- hydroxy-7 methoxy flavone (tectochry sine)</p>	[35]
	<p>15. (3S)-7- hydroxy-4'- methoxy- isoflavanon- 3- β- D glucopyranoside.</p> <p>16. Citrusine</p> <p>17. chavicol 1- O- β- D glucopyranoside.</p>	[17]
	<p>18. 3- (4-(glucopyranosyloxy)- 5- hydroxy- 2- methoxyphenyl)-7- hydroxy-4H- chromen-4- one</p> <p>19. Ononine</p> <p>20. Formononetine</p> <p>21. (+) puerol- A- 2'-O-β-D- glucopyranose</p> <p>22. (-) puerol- B- 2'-O-β-D- glucopyranose((-)-sophoraside A)</p> <p>23. (+) puerol- A</p> <p>24. (-)- trifolirhizine</p> <p>25. (-)- trifolirhizine-6'- O- malonate</p> <p>26. (-)- maackiaine</p> <p>27. (-)- medicarpine</p>	[36]
<i>O. spinosa</i>	28. Sapinonine	[16]
<i>O. angustissima</i>	29. kaempferol 3- Oβ- D- glucopyranoside- 7- O(2'''- acetoxy) – β-D- galactopyranoside	[17]



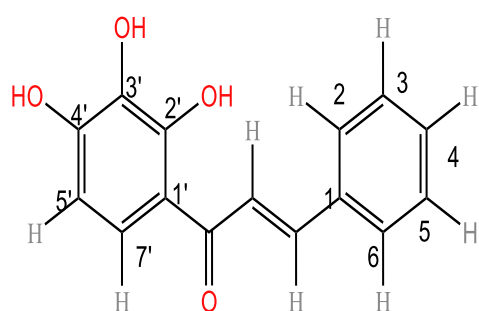
R1	
1	H
2	AC



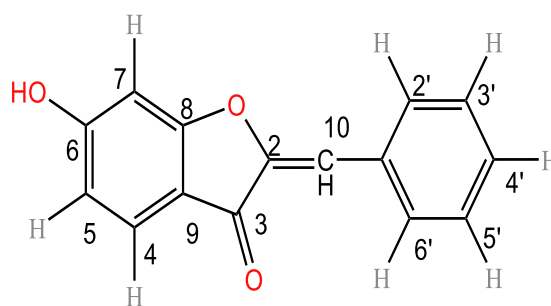
R1	
3	H
4	β -D-Glucopyranosyl



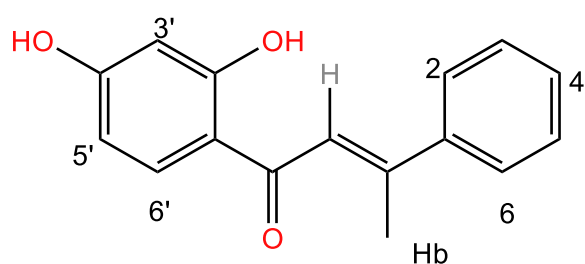
	R1	R2	R3	R4	R5
5	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
6	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
7	H	OCH ₃	OH	HO	OCH ₃
8	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
9	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
10	H	H	OH	H	H



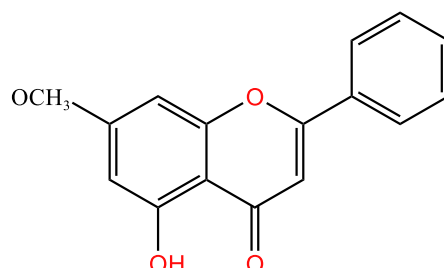
11



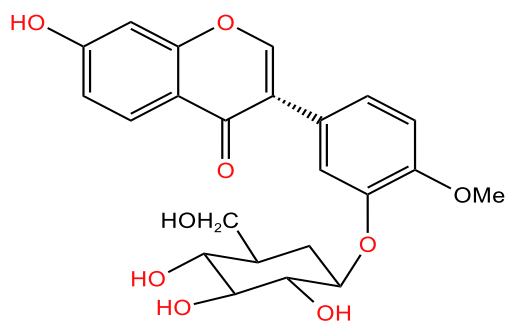
12



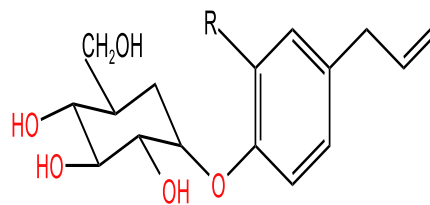
13



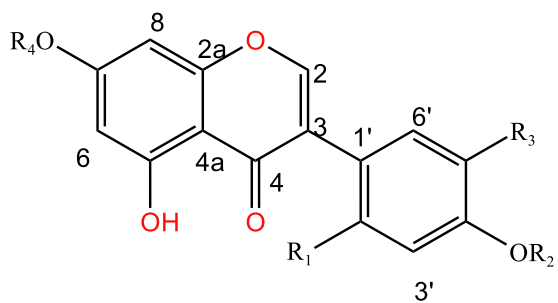
14



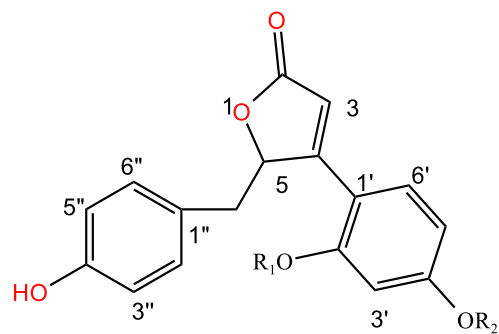
15



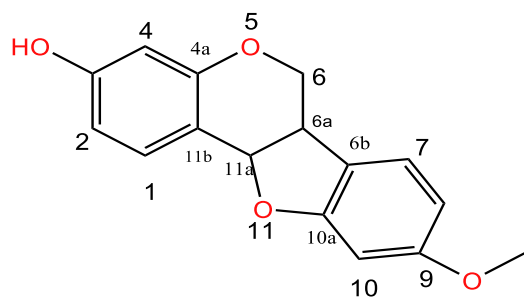
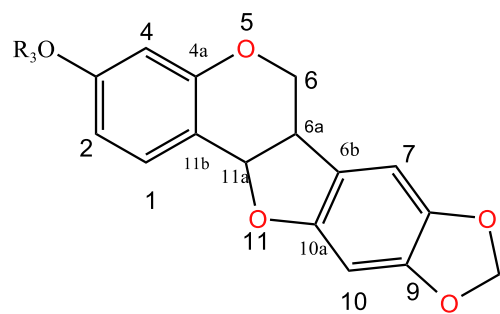
R	
16	OH
17	H



	R1	R2	R3	R4
18	OCH ₃	Glu	OH	H
19	H	CH ₃	H	Glu
20	H	CH ₃	H	H

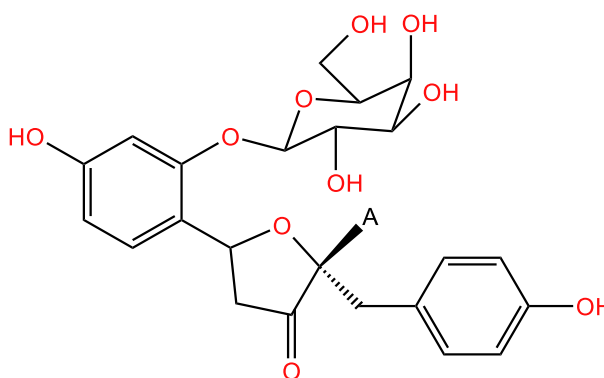


	R1	R2
21	Glu	H
22	Glu	CH ₃
23	H	H

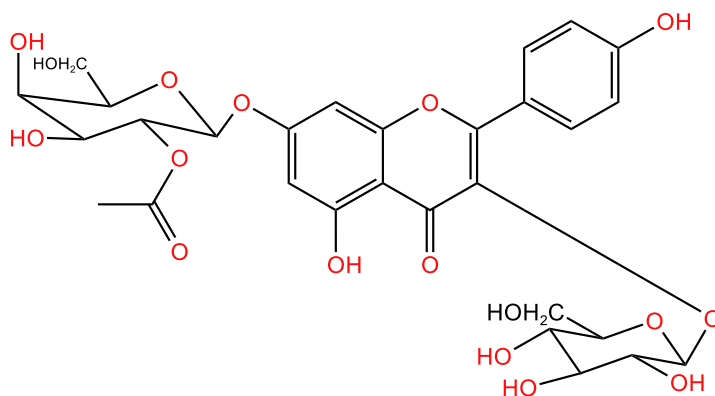


27

R1	
24	Glu
25	6'-O-malonate-Glu
26	H



28



29

I.5.3. Les tanins

Les tanins se sont des composés phénoliques hydrosoluble ayant une masse moléculaire plus élevée, qui présentant la propriété de précipités les alcaloïdes, la gélatine et d'autre protéines. Les tanins sont classés en deux groupe déférent, tanins hydrolysables et les tanins condensé [27].

I.5.3.a Tanins hydrolysables :

Ce sont des Oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide- phénol, le sucre est très générale d'acide – phénol, le sucre et très généralement le glucose, l'acide phénol et soient l'acide gallique dans le cas d'acide galliques, soient l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins ellagiques.

I.5.3.b Tanins condensés :

Tanins condensé ou proanthocyanidolssont des polymèreflavaniques. Ils sont constituées d'unités de flavan -3-ols liées entre elles par des liaison carbone- carbone le plus souvent 4->8 ou 4->6.

I.6. Activité biologique

I.6.1. Activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire [37].

I.6.2. Définition

Un antioxydant est une substance capable de prévenir, réduire ou réparer des dégâts occasionnés par les radicaux libres. Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire [38]. Chaque antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre [39]. Une bonne santé résulte d'un bon équilibre entre la production inéluctable de radicaux libres et l'action des antioxydants. Si un déséquilibre intervient, il aura des conséquences plus au moins graves sur la santé [38].

I.6.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des composés instables surtout formés d'oxygène. Ils sont générés au cours du fonctionnement normal, mais leur production peut être augmentée par la pollution, la fumée de cigarettes ou une exposition prolongée au soleil, par exemple. Leur structure

chimique fait qu'ils endommagent les autres atomes en les « oxydant ». Ils sont toutefois plus ou moins tenus en échec par les antioxydants naturels de l'organisme. Certains facteurs peuvent toutefois rompre cet équilibre. Si les radicaux libres en viennent à excéder la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils peuvent contribuer à l'apparition de plusieurs maladies, dont les maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et d'autres maladies associées au vieillissement [40].

I.6.4. Le stress oxydatif

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants [41], que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes antioxydantes [42], ou une surproduction des radicaux libres [43].

I.7. Les polyphénols comme antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [44].

Les polyphénols constituent une famille de composés qui sont omniprésents dans le règne végétal. Les nombreuses propriétés de ces composés relatives à la santé, largement décrites dans des études épidémiologiques, sont principalement fondées sur leurs activités antioxydantes, ils peuvent piéger les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et sont même des chélateurs de certains ions métalliques [45].

Le potentiel rédox des composés phénoliques les rend utiles en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et extincteur d'oxygène singulet, responsables en dernier ressort de leurs propriétés anti-oxydantes. Structuellement, les phénols contiennent un cycle aromatique d'un ou plusieurs substituants hydroxyle et vont des phénols simples aux composés macromoléculaires hautement polymérisés [46,47].

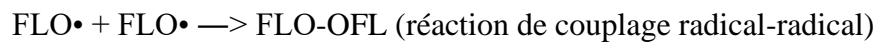
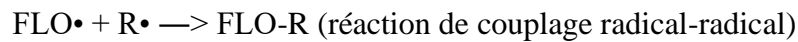
I.7.1. Activité des flavonoïdes vis-à-vis des radicaux libres

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO[•]) ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport

aux R[•] ; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs[48] .



I.8. Activité antibactérienne

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques

commencent à s'y intéresser. Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture [49].

Différents constituants présents dans les plantes présentent cette propriété antimicrobienne tels que : les Phénols, les terpenoïdes, les alcaloïdes ...

Le mécanisme d'action de ces composés passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN, ... [50].

I.9. Conclusion

Notre recherche bibliographique portée sur la famille Fabaceae et le genre *ononis* nous a pas laissé indifférents par rapport à la richesse de notre plante étudiée et nous a motivé à pousser plus loin notre recherche de métabolites contenus dans le genre *ononis*.

Référence Bibliographique :

- [1] Michel. B., “Botanique Systématique Et Appliquée Des Plantes A Fleurs”, Paris 2010, 598.
- [2] Doyle, J.J., Luckow, M.A., “The Rest Of The Iceberg. Legume Diversity And Evolution In A Phylogenetic Context”. V.131, 2003, 900.
- [3] Wojciechowski, M.F., Michael J.M.L., “Sanderson A Phylogeny Of Legumes (Leguminosae) Based On Analysis Of The Plastid *Matk* Gene Resolves Many Well-Supported Subclades Within The Family”. American Journal Of Botany.V.91, N°11, 2004, 1846–1862.
- [4] Dupont, F., Guignard, D.J.L., “Botanique Systématique Moléculaire”. 14e Edition. Paris. 1972, 2001, 2004, 2007, 155
- [5] The Angiosper Mphylogeny Group, 2009.
- [6] Bencherchar, I., “Recherche Et Détermination Structurale Des Métabolites Secondaires De Deux Espèces Appartenant A La Famille Fabaceae : *Lotus Roudairei* Et *Genistaferox*-Evaluation De L'activité Biologique”. These De Doctorat, Université Freres Mentouri Constantine 1, 2018
- [7] Azzouzi S., “Etude Phytochimique Et Biologique De *Bituminaria Bituminosa* (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) Et *Centaurea Dimorphaviv.*(Asteraceae) ”. These De Doctorat, Université Des Frères Mentouri Constantine. 2016.
- [8] Anne-Laure, C., “Contribution A La Connaissance Taxonomique Et Chimique De Fruitsafricains Du Genre "Detarium" (Fabaceae - Caesalpinioideae): "D. Microcarpum" Guill. Et Perr. Et Des Formes Comestibles Et Toxiques De "D. Senegalense" J.F. Gmel”. Thèse De Doctorat : Univ. Genève, 2007, No. Sc. 3838
- [9] El Alaoui-Faris, F.E., “Cours Floristique Ou Botanique Systematique ”.Université Mohammed Vfaculté Des Sciences Rabat, 41.
- [10] Demir S., Turan I., Misir S., Aliyazicioglu Y. “Selectivecytotoxicityeffect Of *Dorycniumpentaphyllum* Extract On Human Breast, Liver, And Lung Cancer Cells”. *Ksutarimvedogaderg*, V.22, N°3, (2019), 473-479
- [11] Al- Zubaidy,A.M.A., Samin,N., Abdalla ,Sh.R., Abdulla,N.O.“Ecology And Geographical Distribution Of *Ononis* L .Spp.(Fabaceae) In Iraq”, *Plant Archives*, V21, N°1, 2021, 1647-1653.
- [12] Fayed,A.A., El-Hadidy,A.H., Faried,A.M., Olway, A.O.,“ Taxonomic Revision Of The Genus *Ononis*(Trifolieae, Fabaceae) In Egypt, With The First Record Of *Ononis Viscosa* Sub Sp. *Breviflora*”, *Phytotaxa*, V408, N°1, 2019, 1-29

- [13] Öza, B.E., Lycanb, G.S., Akkoulb, H.K., Acykaraa, Ö.B., “ Cicatrisation Et Activité Anti-Inflammatoire De Certains Taxons D'*ononis*”, *Biomedicine Et Pharmacothérapie*, V91,(Mai 2017), 1095-1097.
- [14] Quezel,P., Santa, S., “ Nouvelle Flor De L’algérie Et Des Région Désertique Méridionales”, V1-2, Cnrs,(Mai 2017), 369-370. France.
- [15] Delamarck, M., Decandolle, M., “ Flore Francaise Ou Descriptions Succinetes De Toutes Les Plantes Qui Croissant Naturellement En France”, Troisieme Edition, Paris, (1805), 805-809
- [16] Ghdira, K., Goetz, P., “*Ononis spinosal*. Bugrane Epineuse Fabaceae”, *Phytothérapie*, 2015, 1-4
- [17] Mezrage, A., Malafronte, N., Bouhiroum, M., Travaglino, C., Rousso, D., Milella.L., Sevirino, L., Tommasi, N.D., Braca, A., Piaz, F.D., “Phytochemical And Antioxydant Activity Studies On *Ononis Angustissima* L. Arial Parts, Isolation Of Two New Flavonoids”, *Natural Product Reserch*, (Juin 2016), 1-8
- [18] Al-Metrin, M.A., Aboalhajja, N.H., Albaza, I.F., Kailani, M.H., Zihlif, M.A., Afifi, F.U., “Chromatographic Analysis (Lc-Ms And Gc-Ms), Antioxidant Activity, Total Phenol And Total Flavonoid Determination Of *Ononis Natrrix* L, Grown In Jurdan”, *Jurdanjournal Of Chemistry*, V.16, N°1, (May 2021), 31-39.
- [19] Zaak, H., Bendif, H., Rebbas, Kh., Aauati, L., Abdenneur, A., Hamza, A., Guileinewandjou, J.G.K., Maggi, F., “Essential Oil Compsitionand Biological Activities Of *Ononisalba* Poir (Fabaceae)”, *Natural Product Reserch*, (September 2020), 1.
- [20] Al-Sanafi, A.E., The Tradition Al Uses, Constituents And Pharmacological Effects Of *Ononis spinosa*”, *Iosrjournal Of Pharmacy*, V 10, N°2, (February 2020), 53-59.
- [21] Ben Meddour, T., “Etude De L’activités Biologique De Quelque Espécevégitales Dans La Région De Aurés Et Ou Nord Du Sahara Algériene”, Thése De Doctora, Facultés Des Sciences De La Nature Et De La Vie , Université Ferhat Abbas Setif 1, (Decembre 2016), 1-154.
- [22] Besbas, S., Mouffouk, S., Haba, H., Marcourt, L., Wolfender, J.L., Benkhaled. M., “Chemical Composition, Antioxidant, Antihemolytic And Anti- Inflammatory Activities Of *Ononis Mitissima* L”, *Phytochemistry Letters*, V.37, (April 2020), 63-69
- [23] Guettaf, S., Abidli, N., Karich, S., Bellebacir, L., Bouriche, H., “Evaluation Of Antioxidant Potential And Phytochemical Studies Of *Ononis Angustissimal*.(Fabaceae) ”, *World Journalof Pharmaceutical Research*, V.5, N°3, (February 2016), 1804-1808

- [24] Ghribi, L., Nejma, A.B., Besbas, M., Harzalla, S.F., Flamini, G., Jannet, H.B., “Chemical Composition Cytotoxic And Antibacterial Of The Essential Oil From The Tunisian *Ononis Angustissima* L. (Fabaceae)”, *Jurnal Of Oleo.Sience*, V. 1347-3352, (March 2016), 1-6
- [25] Graziani, V., Potenza, N., Dabrosca, B., Troiani, T., Napolitana, S., Fiorentino, A., Scognamiglio, M., “Le Profiling Of *Ononis Diffusa* Identifies Cytotoxic Compounds Against. Cetuximab-Resistant Colon Cancer Cell Lines”, *Molecules*, V.26, (May 2021), 1-11
- [26] Saveta, G., Mladenova, A., Savova, M.S., Marchev, A.S., Ferrate, C., Orlando, G., Wabitsch, M., Georgiev, M.I., “L’activité Anti-Adipogénique De La Mackiane Et De L’anonine Est Médinée Par L’inhibition De Pparγ Dans Les Adipocytes Humains”, *Biomédecine & Pharmacothérapie*, V.149, (2022), 1-11
- [27] Bruneton, J., “Pharmacologie Phytochimie Plantes Médicinales”, Troisième Edition, V 2-4, (1999), Paris, France.
- [28] Barrero, E.A., Sanchez, J.F., Barron, A., Corralis, F., Rodriguez, I., “Resorcinol Derivatives And Other Compounds Of *Ononis Speciosa*”, *Phytochemistry*, V28, N°1, (1989), 161-164
- [29] Barrero, A.F., Sanchez, J.F., Reyes, F., Rodriguez, I., “Resorcinol Derivatives From *Ononis Viscosa*”, *Phytochemistry*, V30, N°2, (1991), 641-643
- [30] Canedo, L.M., Corraly, J.M.M., Feliciano, A.S., “5-Alkyl Resorcinol From *Ononis Natix*”, *Phytochemistry*, V44, N°8, (1997), 1559-1563
- [31] Barrero, A.F., Mar Hevrador, M., Arteaga, P., Garcia, I.R., Moreno, M.G., “Resorcinol Derivatives And Flavonoids Of *Ononis Natix*. Su. Species *Romosissima*”, *Natural Products*, V 60, N°2, (February 1997), 65-68
- [32] Harborne, J.B., *Phytochemical Method. A Guide To Modern Technique Of Plants Analysis*, Troisième Edition, 1998
- [33] Bernhard, T.M., Shaker, K.H., El Gamal, M.H.A., Karlheinz, S., “The New Bishomoflavone Ononin And Its Glucoside From *Ononis Varginalis*”, *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, (July 2000), 515-519
- [34] Eckhard, W., Marion, D., Diego, R., James N. R., “Externally Accumulated Flavonoids In Three Mediterranean *Ononis* Species”, *Z. Naturforsch.*, (2003), 771-775
- [35] Benabdrahmane, W., Mezrag, A., Bouhroum, M., Benayache, F., Mosset, P., “The Chemical Investigation Of The Chloroformic Extract Of *Ononis Angustissima* Lam. Var. *Spicies*”, *Der Pharmacia Letteres*, V.6, N°3, (January 2014), 88-91
- [36] Ghribi, L., Téguo, P.W., Cluzet, S., Marchal, A., Marques, J., Mérillon, J-M., Ben Jannet, H., “Isolation And Structure Elucidation Of Bioactive Compounds From The Root Of

Chapitre I

Synthèse bibliographique

The Tunisie *nononis Angustissima.L*”, *Bio Organic & Medicinal Chemistry Letters*, V.25, (July 2015), 3825-3826.

[37] Cao, G., Prior, R.L., Comparison Of Different Analytical Methods For Assessing Total Antioxidant Capacity Of Human Serum. *Clinical Chemistry*, 44(6), (1998), 1309-1315.

[38] Edeas M. : Les Secrets De Santé Du Thé, C'est Naturel, C'est Ma Santé, Ed,Alpen Editions S.A.M. (2005), 88

[39] Camilleri. J.P .,Snoussi.A. : L'éternelle Jeunesse : L'art De Bien Vieillir, Ed, L'harmattan, , (2012), 137

[40] Baribeau. H : Pouvoir Antioxydant, Ed, Passeport Santé.Net, (2010).

[41] Meda N. T. R., Bangou M. J., Bakasso S., Millogo-Rasolodimby J. And. Nacoulmao.G. , Antioxidant Activity Of Phenolic And Flavonoid Fractions Of *Cleome Gynandra* And *Maerua angolensis* Of Burkina Faso. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science* V.3, N°2, (2013), 36-42.

[42] Albayrak S., Aksoy A., Albayrak S. And Sagdic O. In *Vitro* Antioxidant And Antimicrobial Activity Of Some Lamiaceae Species. *Iranian Journal Of Science &Technology*. (2013), 1-9.

[43] Duran-Bedolla J., Rodriguez M. H., Navor V. S., Arancibia S. R., Cerbonm.,Rodriguez M. C, Oxidative Stress: Production In Several Processes And Organelles During Plasmodium Sp Development. *Oxidants And Antioxidants In Medical Science* V.2, N°2, (2013), 93-100.

[44] Droge, W., Free Radicals In The Physiological Control Of Cell Function. *Physiologicalreviews*, (2002).V.82, N01, 47-95.

[45] El-Haci, I.,Atik-Bekkara F., Didi A., Gherib M. Didi M. A., Teneurs En Polyphénols Et Pouvoir Antioxydant D'une Plante Médicinale Endémique Du Sahara Algérien. *Phytothérapie*, V.10, N°5, 280-285.

[46] Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, And Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, (1998). V.56, N° 11, 317-333.

[47] Zhang, Y.-Y., Zhang F., Thakur K., Ci A.T., Wang H., Zhang J.G., Wei Z. J., Effect Of Natural Polyphenol On The Oxidative Stability Of Pecan Oil. *Food And Chemical Toxicology*, (2018), 489-495.

[48] Amić D., Amić D.D., Bešlo D., Trinajstić N., Structure-Radical Scavenging Activity Relationships Of Flavonoids. *Croatian Chemical Acta*, V.76, N°1, (2003), 55-61.

[49] Bahorun, T., Substances Naturelles Actives : La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. Amas. *Food And Agricultural Research Council. Reduit. Mauritius*,(1997).

Chapitre I

Synthèse bibliographique

[50] Cowan, M.M., Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, V.12,N°4,(1999),.564-582.

Chapitre II : Partie expérimentale

II.1 Introduction

L'espèce choisie est une plante du genre *Ononis* qui n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et de dépistage d'activités biologiques précédentes.

Cette partie se base sur l'étude de la composition chimique sur la partie aérienne d'une plante du genre *ononis* à savoir le screening phytochimique, le dosage des polyphénols totaux, le dosage des flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antiradicalaire et antibactérienne des différents extraits de cette plante.

II.2 Etude phytochimique

II.2.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs) a été récoltée en mois de juin 2021 dans la région de djebel el ouahch (Constantine). Après le nettoyage, laissé sécher à l'air libre pendant quelques jours, ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique, afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène. La poudre obtenue a été ensuite conservée dans des récipients et stockée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

II.2.2. Préparation des extraits

Après séchage, 185 g des parties aériennes de *Ononis* ont été broyées puis macérées dans l'ordre des solvants suivants le chloroforme pendant 48h, un mélange chlorométhanolique (chloroforme/méthanol : 50:50, v/v) de et enfin avec le méthanol pendant 48h. Après filtration plusieurs fois, les solvants sont éliminés du filtrat par évaporation sous pression réduite à 35-40°C dans un évaporateur rotatif permettant ainsi d'obtenir les extraits bruts : Extrait Chloroforme, Extrait Chlorométhanol, Extrait méthanol. [1]

Les étapes d'extraction sont représenté par des figure suivant :



Figure II.1: broyage de la plante



Figure II.2 : macération a froide d'extrait Chloroforme

Chapitre II : Partie expérimentale

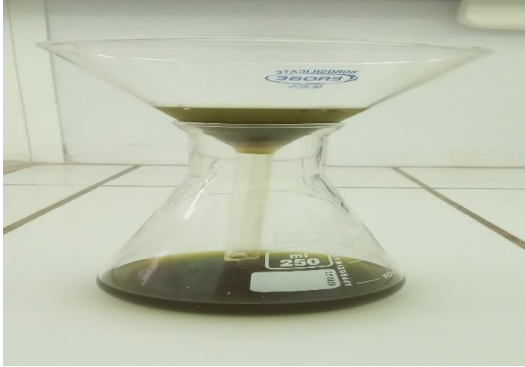


Figure II.3: filtration d'extrait Chloroforme



Figure II.4 : évaporation sous pression réduite à 35-40 C°



Figure II.5: Extrait methanol



Figure II.6: Extrait Chloroforme



Figure II.7 : Extait chloromethanol

Le diagramme suivant **Figure II.8** résume tout ceci :

Chapitre II : Partie expérimentale

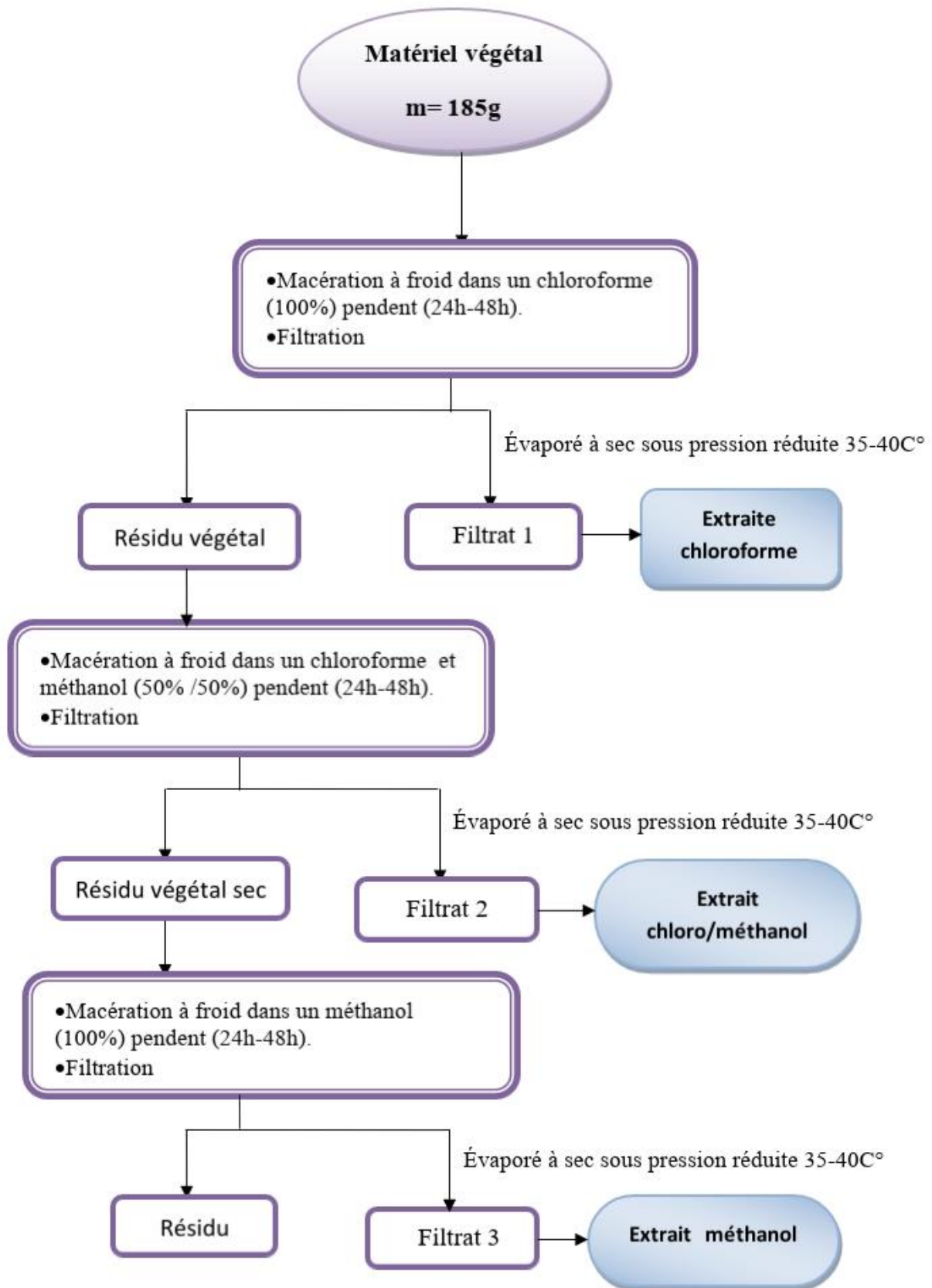


Figure II.8 : Protocole d'extraction

Chapitre II : Partie expérimentale

II.3. Screening phytochimique:

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Il se base sur des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. La présence de ces derniers est attestée, soit par la formation d'un précipité soit par le changement de coloration du milieu [2].

II.3.1. Préparation des extraits

→ L'extrait végétal hydro-alcoolique:

07 g de matière végétale dans 100ml de mélange méthanol-eau (70/30), après agitation laisser reposer pendant 24h. Filtre le mélange et récupéré le filtrat.

→ L'extrait éthérique :

On met dans un erlenmeyer 7g du matériel végétal avec 30 ml d'éther de pétrole. Après 24h on filtre et on obtient de l'extrait éthérique.

→ L'extrait chloroformique :

On met dans un erlenmeyer 4g du matériel végétal avec 50ml de mélange chloroforme- éther de pétrole (40/10). Après 24h on filtre et on obtient de l'extrait chloroformique.

→ L'extrait végétal de l'acide sulfurique :

On met dans un erlenmeyer 0.2 g de matière végétal (broyée) avec 10ml de l'acide sulfurique. Agitation pendant 2 minutes, Laisser reposer pendant 24h. Filtre le mélange et récupéré le filtrat.

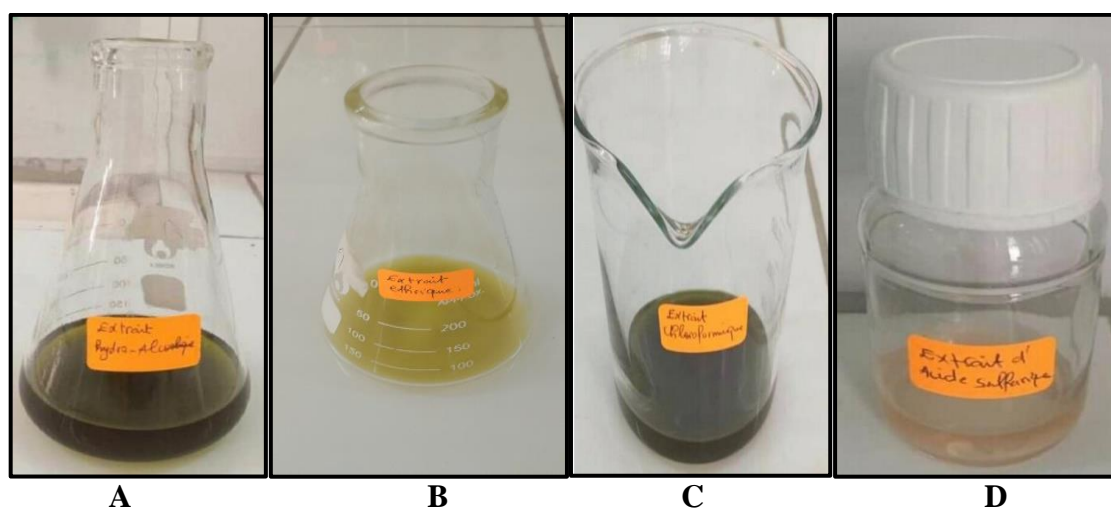


Figure II.9 : Préparation des extraits

Chapitre II : Partie expérimentale

A : Extrait hydroalcoolique

B : Extrait éthérique

C : Extrait chloroformique

D : Extrait d'acide sulfurique

II.3.2. Tests de caractérisations

II.3.2.1. Test de flavan 3, 4diols (test bate-smith)

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait A. On additionne dans l'un des tubes 0.5 ml de HCl concentré, et l'autre reste comme un témoin. On porte au bain marie pendant 30 minutes.

✚ L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de leucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols [3].

II.3.2.2. Test de flavonols et flavanones (test de Wilstater)

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait A. On additionne dans l'un des tubes l'HCl concentré (0.5 ml) et l'autre reste comme un témoin. On ajoute tout doucement quelque fragment de magnésium, on laisse agir sous la hotte.

✚ L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (flavonols) ou le rouge violacées (flavanones et flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes [3].

II.3.2.3. Test des tanins

On met dans 3 tubes 2 ml de l'extrait A. On additionne 4 à 5 gouttes de gélatine à 1 % dans le premier tube et on additionne 4 à 5 gouttes de (FeCl₃ en solution méthanolique) dans le deuxième tube et le troisième tube reste comme un témoin

✚ La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques avec précipitation dans les tests de gélatine [4].

II.3.2.4. Test des quinones

Les quinones constituent une série de diènes plutôt que des composés aromatiques comportant un noyau de benzène sur lequel deux atomes d'hydrogène sont remplacés par deux atomes d'oxygène formant deux liaisons carbonyles (dicétones éthyléniques conjuguées cycliques).

On met dans 2 tubes 2 ml de l'extrait B et on ajoute NaOH 10% dans l'un des tubes et l'autre reste comme un témoin.

✚ Après agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violette de la phase aqueuse confirme la présence des quinones [5].

Chapitre II : Partie expérimentale

II.3.2.5. Test des anthraquinones :

Les anthraquinones sont des dérivés de l'antracène. Du point de vue structural, les anthraquinones sont des composés naturels dont le squelette carboné de base en C₁₄ présente un enchainement de type C₆-C₂-C₆ [6].

Dans 2 tubes On met 2 ml de l'extrait C. On ajoute KOH 10% dans l'un de tube et l'autre reste comme un témoin.

- ✚ Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge [7].

II.3.2.6. Test des alcaloïdes :

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [8-9].

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer et de Dragendorff.

▪ Réactif de Mayer

Composition : Iodure de potassium (KI) 25g, Chlorure mercurique (HgCl₂) 6.8 g, l'eau distillée (100 ml).

▪ Réactif de dragendorff

Composition : Nitrate de bismuth (1.7 g), acide tartrique concentré (20 g), eau distillée (100 ml) , iodure de potassium (10 g) , eau distillée (100 ml).

On met dans 3 tubes 2 ml de l'extrait végétal de l'extrait D. Dans le premier tube on met 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le 2ème tube on met 5 gouttes de réactif de dragendorff et le troisième tube reste comme témoin.

- ✚ La présence des alcaloïdes est constatée par des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux :

- Blanc jaunâtre dans le premier tube.
- Orange dans le deuxième tube [10]

II.3.2.7. Test des terpènes et des stérols insaturés :

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols [11,12]. Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides [13].

Un stérol est un lipide possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Pratiquement tous les stéroïdes végétaux sont hydroxylés en C-3 et sont en fait des stérols [14].

Chapitre II : Partie expérimentale

La présence des stérols insaturés et terpènes est mise en évidence à l'aide de H_2SO_4 . Les étapes à suivre sont :

- ❖ Un mélange MeOH/ H_2O (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale.
- ❖ Après agitation, filtration et concentration non à sec on ajoute 50ml d'éther de pétrole à la solution obtenue et on laisse décanter.
- ❖ Après séparation des deux phases on procède à l'évaporation à sec de la phase étherée, l'extrait obtenu est additionné 15ml de chloroforme.
- ❖ La solution chloroformique est versée dans trois tubes à essai en quantités égales.

Tube (1) : utilisé comme témoin.

Tube (2) : ajouter 3 ml d'anhydride acétique, le changement rapide de couleur indique la présence de terpènes.

Tube (3) : ajouter 3 gouttes d'acide acétique, l'apparition de la couleur rouge cerise confirme la présence des stérols insaturés [15]

II.3.2.8. Test des triterpènes :

Les terpènes constituent une large famille d'alcènes d'origine naturelle très diversifiée comprenant des molécules linéaires, cycliques ou bien polycycliques et pouvant présenter des fonctions alcools, aldéhydes, cétones [15].

La mise en évidence des terpènes est fondée selon la réaction de Liebermann-Burchard.

Les étapes à réaliser sont [15].

- ❖ Un mélange MeOH/ H_2O (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale.
- ❖ Après agitation, filtration et évaporation à sec, le résidu obtenu est dissout dans 1ml d'anhydride acétique, puis dans 1ml de chloroforme.
- ❖ Diviser la solution entre deux tubes à essai dont l'un sert de témoin.
- ❖ Placer 1ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter.
- ✚ La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides révèle la présence des triterpènes (réaction de Liebermann-Bouchard).

II.3.2.9. Test des saponines (indice de mousse)

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal [17]. Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique [18].

Chapitre II : Partie expérimentale

Une quantité de 5 g de matière végétale des tiges broyées sont mis dans un Erlen Meyer dans lequel on ajoute 50 ml d'eau distillée, pour réaliser une décoction pendant 30min. après refroidissement suivi d'une filtration 5ml du décocté sont prélevés et introduits dans un tube à essai soumis à une agitation.

✚ L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines[16].

II.3.2.10 Test des coumarines:

Les coumarines sont des dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone [19] et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [20].

- ❖ Ajouter 20 ml d'éther de pétrole à 1g de la poudre végétale à analyser.
- ❖ Agiter l'ensemble et laisser macérer pendant 24h.
- ❖ Filtrer et compléter à 20 ml avec de l'eau distillée.
- ❖ Evaporer l'extrait éther à l'air libre jusqu'à obtention de 5 ml et reprendre avec de l'eau distillée chaude (2 ml).
- ❖ Partager la solution en deux tubes à essai dont l'un sert de témoin.
- ❖ Ajouter au contenu de l'autre tube de l'ammoniaque (NH_4OH) à 25%.
- ❖ Mélanger et observer la fluorescence sous lumières UV à 365 nm.

✚ L'apparition d'une fluorescence intense dans le tube contenant de l'ammoniaque indique la présence des coumarines [20].

II.4. Quantification des composés phénoliques

Cette méthode permet de déterminer la quantité des polyphénols et des flavonoïdes présents dans un extrait préparé à partir de notre plante.

II.4.1. Dosage des polyphénols totaux :

❖ Principe :

La teneur totale en polyphénols a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif Folin-Ciocalteu, est basé sur la réduction en milieu basique de la mixture d'acide phosphotungestique $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ et d'acide phosphomolybdique $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_4$ de couleurjaune par les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans l'échantillon .Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe de tungstène (W_8O_{23}) et demolybdène (Mo_8O_3) de couleur bleue, possèdent une absorption maximale à l'environ de(750 -760) nm dont l'intensité est proportionnelle au taux des composés phénoliques présentsdans l'échantillon[21].

Chapitre II : Partie expérimentale

❖ Procédure:

Une prise de 200 µl d'extrait (4mg de l'extrait est dissoute dans 4ml de l'éthanol) est ajoutée à 1000 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois (1 ml de la solution Folin-Ciocalteu concentré est complété à 10ml avec l'eau distillée (9 ml)). Après agitation vigoureuse et incubation 4 min à la température ambiante, 800µl d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5 %) (7,5 g de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 ml d'Eau distille) sont additionnées au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV visible contre un blanc contenant le solvant dans lequel est solubilisé l'extrait (éthanol). Deux lectures sont faites par échantillon. Les teneurs en composés phénoliques sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique de concentration croissante. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$) [21].

❖ Gamme d'étalonnage de l'acide gallique :

La gamme d'étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de (0-3) µg/ml.

200µl de chaque dilution mélange avec 1000µl Folin-Ciocalteu et 800µl de Na_2CO_3 (7,5%) est additionné. Après 2 h d'incubation l'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible [20].

La **figure II.10** résume le protocole de dosage des polyphénols totaux :

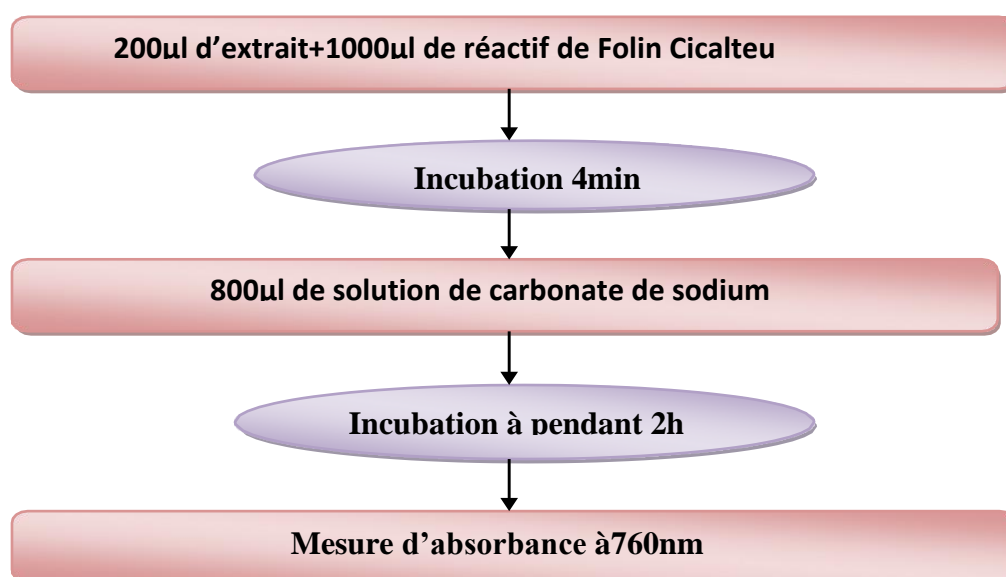


Figure II.10: protocole de dosage des polyphénols totaux[21]

Chapitre II : Partie expérimentale

II.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux:

❖ Principe :

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en utilisant la quercétine comme composé de référence, cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium stable de couleur jaunâtre qui a un maximum d'absorption à 420nm [22].

❖ Procédure:

Une prise de 2000 μl de chaque extrait (4mg de l'extrait est dissoute dans 4ml de l'éthanol) a été mélangée avec 100 μl de trichlorure d'aluminium (10%) et 100 μl d'acétate de sodium (1M) et 2500 μl de l'eau distillée. Après une heure (1h) d'incubation à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 420nm [22].

❖ Préparation de la gamme d'étalon de la quercétine:

La gamme d'étalon est préparée avec la quercétine à des concentrations variables de (0-30) $\mu\text{g}/\text{ml}$. 2000 μl de chaque dilution est mélangée avec 100 μl de trichlorure d'aluminium (10%) et 100 μl d'acétate de sodium (1 M) et 2500 μl de l'eau distillée. Après une heure (1h) d'incubation à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 420nm par un spectrophotomètre UV-Visible [22].

La **figure II.11** résume le protocole de dosage des flavonoïdes totaux :

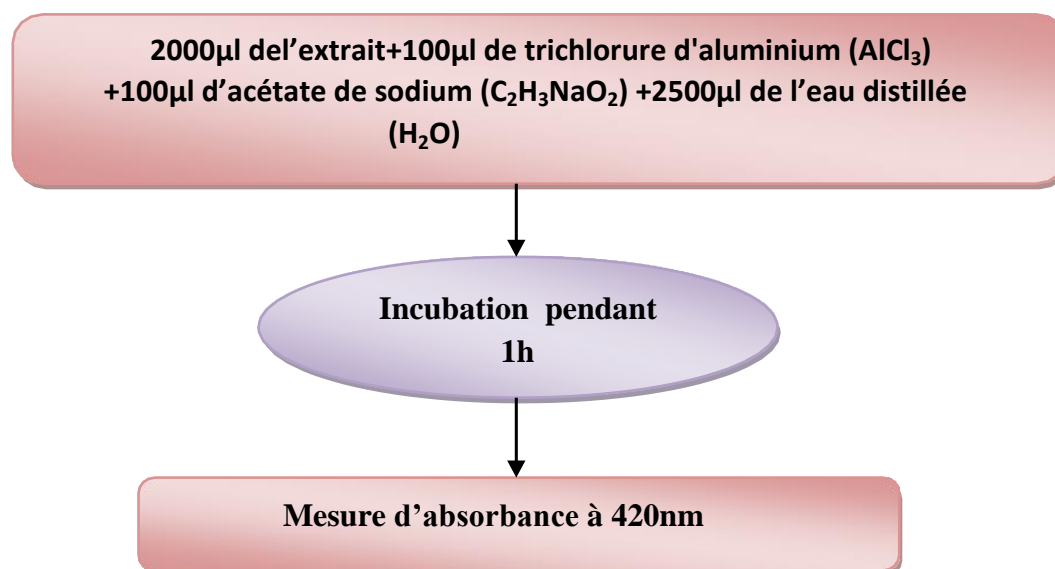


Figure II.11: protocole de dosage des polyphénols totaux [22].

Chapitre II : Partie expérimentale

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante

III.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

❖ Principe :

L'activité anti oxydante des trois extraits (méthanol, chlorométhanol, chloroforme) a été évaluée par spectrophotométrie à l'aide du radical libre DPPH. Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans l'éthanol. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine, de couleur jaunâtre. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu [23].

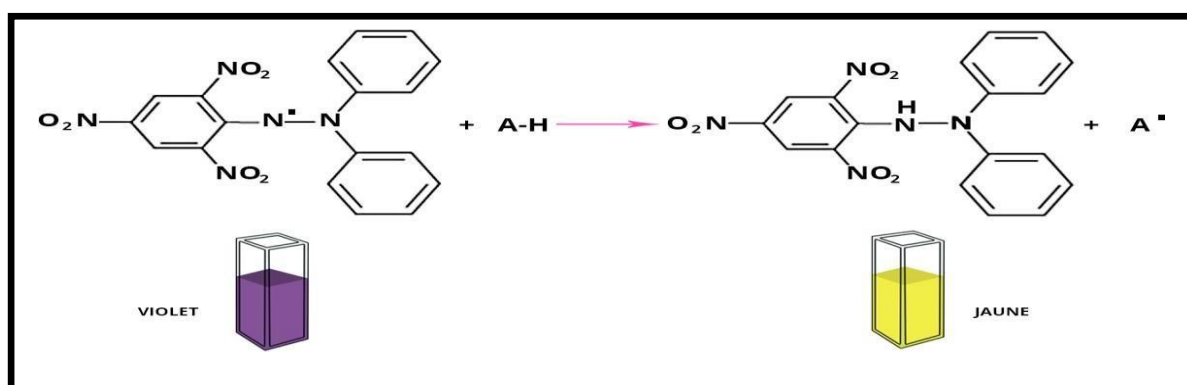


Figure II.12: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [24].

❖ Préparation du DPPH:

Une quantité de 3mg de DPPH est dissout dans 100ml d'éthanol avec agitation pendant 30min à l'abri de la lumière. L'absorbance est de (0.5-0.8) mesurée avec un spectrophotomètre à 517nm.

❖ Procédure:

L'activité antioxydante des trois extraits (méthanol, chloro méthanol, chloroforme) a été évaluée in vitro en utilisant la méthode du DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl). Tous les extraits ont été préparés dans l'éthanol avec une concentration de (8 mg/ml). Ensuite, 400µl de l'extrait à différentes concentrations sont été ajoutés à 1600µl de la solution de DPPH (0,03 mg/ml). Après 30 min d'incubation dans une chambre noire à température ambiante. L'absorbance maximale du DPPH est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en se référant à un témoin sans extrait (Acide ascorbique) [25]. L'activité antiradicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivant:

Chapitre II : Partie expérimentale

$$I\% = \frac{(\text{Abs Blanc} - \text{Abs Echantillon})}{\text{Abs Blanc}} \times 100$$

I% : Pourcentage d'inhibition de DPPH°

Abs Blanc : Absorbance du blanc

Abs Echantillon : Absorbance de l'extrait

L'expérience a été répétée deux fois et les résultats ont été exprimés en valeurs des IC₅₀ (Concentration inhibitrice de 50% des radicaux DPPH°). Elle a été calculée à partir du graphe de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon qui présente l'IC₅₀ la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante. Les résultats obtenus pour l'extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence.

Le protocole d'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la (Figure II. 13):

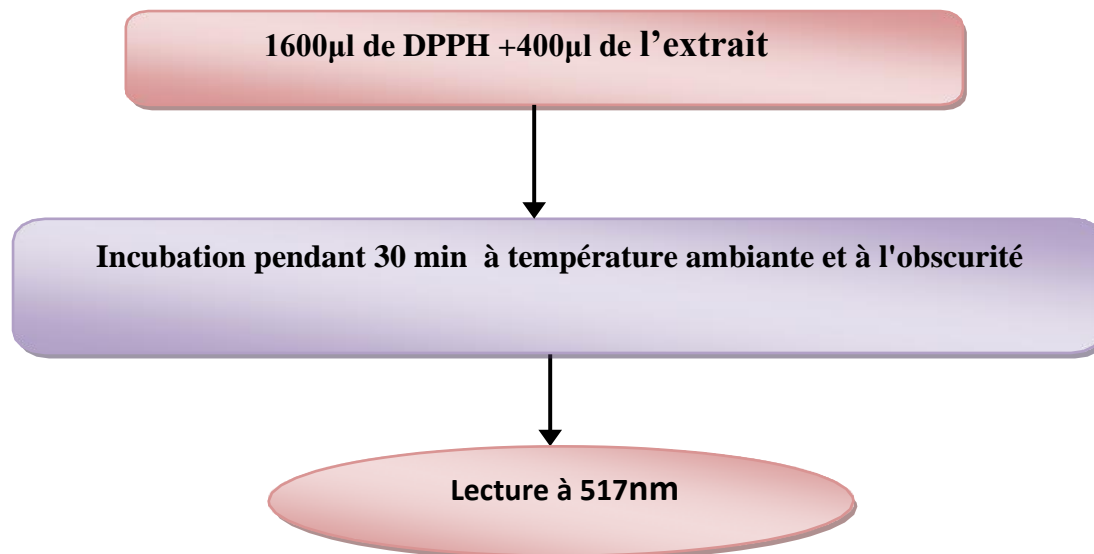


Figure II.13: Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH [25].

Chapitre II : Partie expérimentale

II.5.2. Test de détermination du pouvoir réducteur FRAP

❖ Principe :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) à 700nm. Le fer ferrique initialement jaune, se réduit et devient bleu ouvert en présence d'un atome d'électron. Le changement de la coloration de jaune à bleu ouvert est proportionnel à l'activité antioxydant [26].

Le pouvoir réducteur du fer des différents extraits a été évalué selon le protocole décrit par (Elmastats M. 2007) [27]

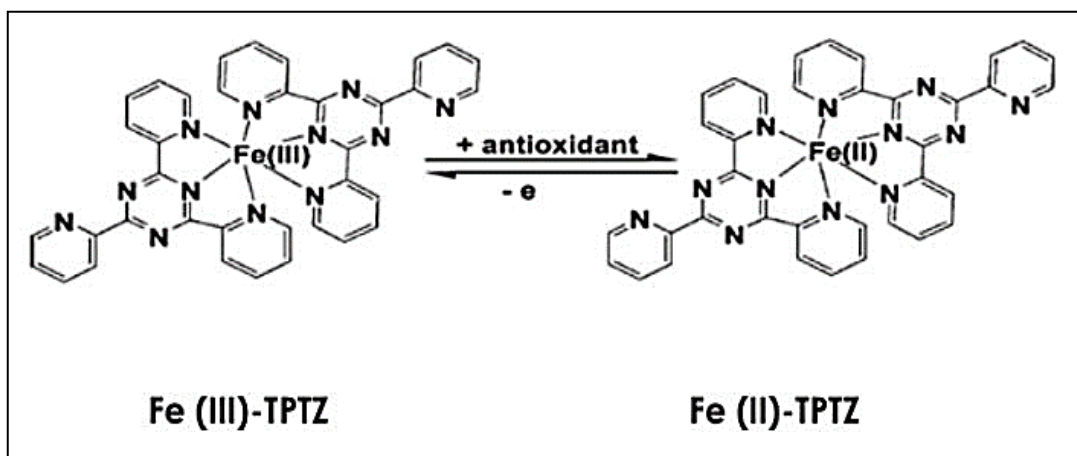


Figure II.14: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyl-s-triazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant [28].

❖ Procédure:

➔ Préparation de la solution tampon :

Elle est préparée à partir des deux solutions ci-dessous :

- 4,54g Na_2HPO_4 dans 500ml d'eau distilléeS1
- 4,24g de Na_2HPO_4 dans 500ml d'eau distilléeS2

Prend 125,5ml de la solution (1) avec 74,5ml de la solution (2) puis ajuster le pH jusque à 6,6.

➔ Préparation des solutions mères :

- Solution $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%): 1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 ml d'eau distillée sous agitation.
 - Solution de FeCl_3 (0,1%): 0,1 g de FeCl_3 dans 100ml d'eau distillée sous agitation.
 - Solution de trichloracétique (10%) : 10g de TCA dans 100 ml d'eau distillé sous agitation.
- Une solution mère de chaque extrait a été préparé avec une concentration de (8mg/ml) à partir de laquelle on a préparé une série de la solution fille de concentration (8, 4, 2, 1,

Chapitre II : Partie expérimentale

0,5,0,25 mg/ml préparé dans l'éthanol), à l'aide d'une micropipette on prend un volume de 200 µl de l'extrait de chaque solution et on met dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 500 µl d'une solution tampon phosphate (0,2 M ,ph 6,6) et 500 µl d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min et ensuite laissé refroidir, 500 µl d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Un aliquote (250 µl) de surnageant est combinée avec 500 µl d'eau distillée et 100 µl d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par l'éthanol qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV) et contre un curve étalon de contrôle positif de hydroxy toluène butyle BHT (1 mg/l dans l'éthanol). La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée par CE50 ont été obtenus par interpolation dans les courbes d'absorption dans le domaine linéaire de la valeur absorbance = 0.5, la capacité de réduction augmente avec la diminution de cette valeur. Les résultats sont présentés en mg/ml.

Le protocole d'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la **Figure II.15**.

Chapitre II : Partie expérimentale

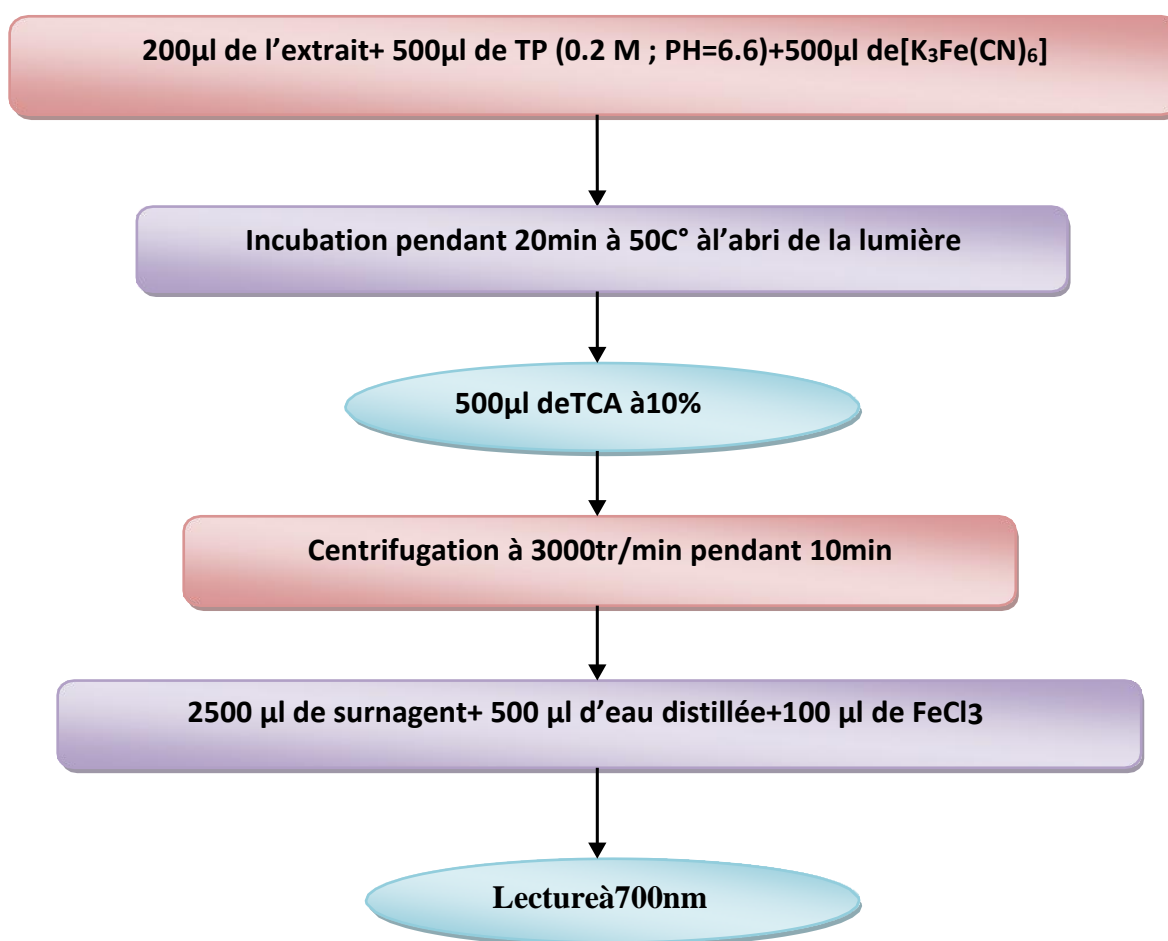


Figure II.15: Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur fer [27].

II.5.3. Test de blanchissement du β -carotène:

❖ Principe :

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco [28], puis légèrement modifiée par Miller [30]. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extrait végétal induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible [31]. La capacité antioxydante de nos échantillons a été évaluée selon la méthode décrite par (Koleva, I. et al) [32].

Chapitre II : Partie expérimentale



Figure II.16: Mécanismes de l'action antioxydante retardeur briseur de chaîne. [31].

❖ Procédure:

Une quantité de 2 mg de β -carotène a été solubilisée dans 10 ml de chloroforme (CHCl_3), la solution a été transférée dans un ballon contenant préalablement 200 μl d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation totale du chloroforme, 100 ml d'eau distillée ont été additionnées au résidu et l'ensemble a été mélangé vigoureusement jusqu'à obtention d'une émulsion.

Un volume de 4800 μl de cette émulsion a été ajouté dans des tubes contenant chacun 200 μl de chaque extrait (à une concentration finale de 8mg/ml préparé dans l'Éthanol). Après agitation les tubes sont placés dans un bain marie à 50 C° pendant 2h ,l'absorbance a été mesurée immédiatement contre un blanc (émulsion sans extrait) à 470 nm, correspondant au t=0. Les tubes ont été par la suite placés dans un bain marie à 50°C pendant 2h. Après incubation ces derniers sont été de nouveau mesurés à la même longueur d'onde (t=120 min).

La même procédure a été répétée avec le hydroxy anisole butyle (BHA) (1 mg/ml) comme un contrôle positif et avec l'éthanol comme des contrôles négatifs. Les absorbances sont été lues à 470 nm, après [30,60,90,120] min d'incubation à température ambiante [32].

L'activité antioxydante des extraits et du BHA a été calculée par rapport au contrôle négatif en utilisant l'équation suivante [33].

$$AA\% = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{\text{échantillon } t=0} - \text{Abs}_{\text{échantillon } t=120}}{\text{Abs}_{\text{contrôle } t=0} - \text{Abs}_{\text{contrôle } t=120}} \right] \times 100$$

Abs échantillon t=0 : Représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 0min.

Abs échantillon t=120 : Représente l'absorbance de l'extrait à 120min.

Abs contrôle t=0 : Représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

Abs contrôle t=120 : Représente l'absorbance du contrôle à 120 min.

Le protocole d'évaluation du blanchiment du β -carotène est illustré par la (Figure II.17)

Chapitre II : Partie expérimentale

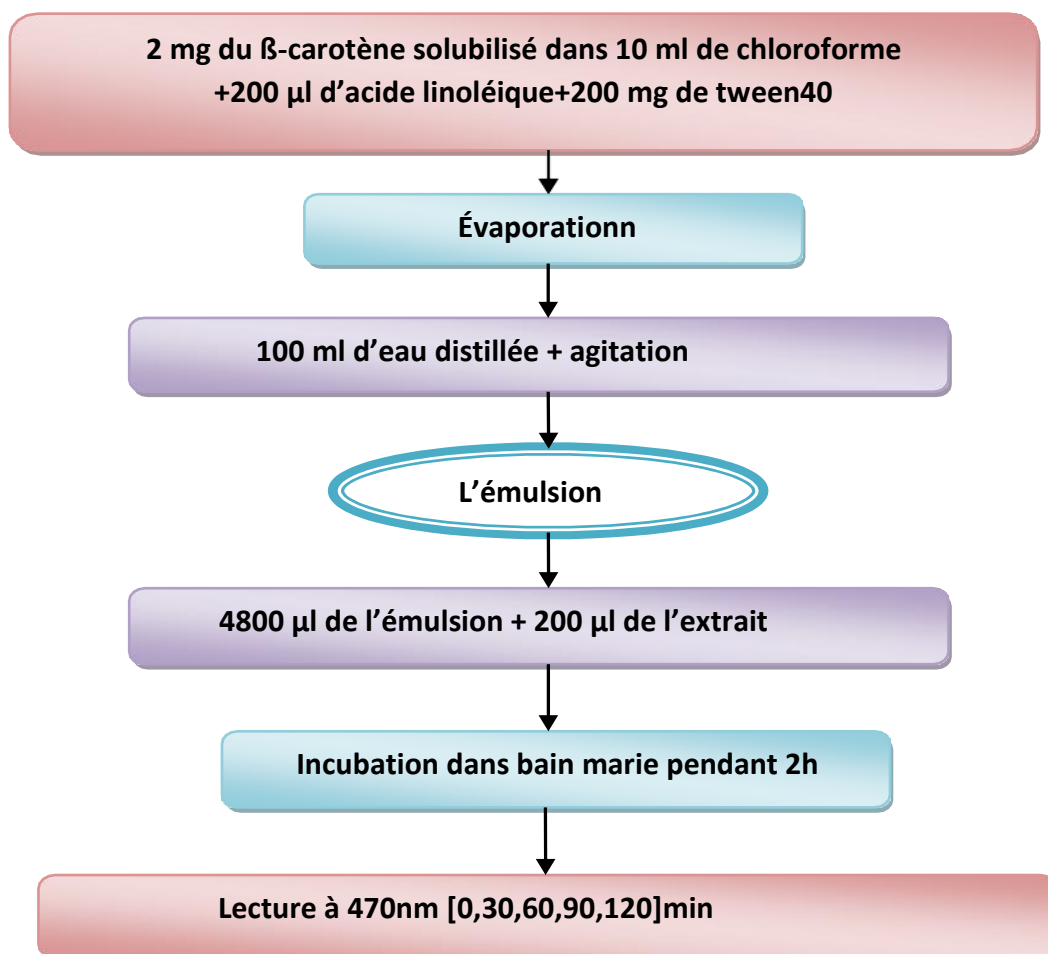


Figure II.17 : Protocole du blanchissement du β -carotène[32].

II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des trois (03) extraits : Chloroforme, Chlorométhanol et Méthanol des parties aériennes de l'espèce *Ononis* a été testé, *in vitro*, par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Dans cette étude, nous avons utilisés quatre bactéries: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC8039) et *Basileuscereus* (ATCC10876). Cette étude de l'activité antibactérienne est réalisée au laboratoire d'hygiène au niveau de l'Établissement Hospitalier Public, Ferroudja à Blida.

II.7.1. Stérilisation du matériel :

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes [34].

Chapitre II : Partie expérimentale

II.7.2. Préparation des dilutions d'extraits

Les solutions ont été préparées par solubilisation de 50 mg de l'extrait méthanol et 25 mg des extraits chloroforme et chlorométhanol de la plante dans 1 ml de DMSO. la solution obtenue et appelée « solution mère [35].

II.7.3. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive Mueller Hinton et incubées à 37°C pendant 24 heures, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10ml d'eau distillée stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort [36].

II.7.4. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière [37].

II.8. Conclusion

Nos travaux de screening, de dosages et de l'évaluation des propriétés antioxydantes et antibactériennes, nous ont permis une identification qualitative et quantitative des différents extraits de notre plante. Les résultats relatifs à cette partie de nos investigations seront détaillés dans le chapitre III, rassemblant résultats et discussion

Référence bibliographiques:

- [1] Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou D. And Exarchou V. Antifungal Properties Of *Origanum Glandulosum Desf.* Extracts. Food, Agricul. & Envir. V. 2,2004 63-69.
- [2] F. Haddouchi T.M. Chaouche · N. Halla. Screening Phytochimique, Activités Antioxydantes Et Pouvoir Hémostatique De Quatre Plantes Sahariennes D'algérie. December 2018, V.5, N°2, P.2.
- [3] Bruneton .J., Pharmacognosie, Phytochimie Des Plantes Médicinales .2ème Edition Tec Et Doc (Ed), (1993) Paris.
- [4] Dohou. N, Yamnik, Gmiran, Idrissi Hassani. Lm, Etude De Polyphénols Des Feuilles D'une Endémique Ibéro Marocaine, Thyme Laeai Ychroides. Acta Botanica Malacitana. , (2003).
- [5] Ribérrreau.Gp., Les Composés Phénoliques Des Végétaux. Edition Dunod, (1968). Paris.
- [6] Boussaha, S. Thèse Doctorat, 2015, 9
- [7] Rizk.Am, Constituents Of Plants Growing In Qatar. Fitoterapia. (1986).
- [8] Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Editions Tec& Doc, 3ème Edition, 1999, 783- 785.
- [9] Zenk, M.H., Juenger, M. Phytochemistry Review, 2007, 68, 2757 – 2772
- [10] Chenni.M., Contribution A L'étude Chimique Et Biologique De La Racine D'une Plante Médicinale :Bryonia Dioica Jasq. Mémoire De Magister Université Essen-Oran. (2010).
- [11] Marc, Fr, Davin, A, Deglène, B, L, Ferrand C. Médecine Sciences, 2004, 20, 458-463.
- [12] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 2005, 53, 1841-1856.
- [13] Feher, J., C, Somos, G., Vereckei, Berlin Heidelberg, 1987.
- [14] Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. Bioactive Compounds In Foods: Their Role In The Prevention Of Cardiovascular Disease And Cancer. Am. J. Med, 2002, 113, 71–88.
- [15] Sheel, R., K. Nisha, And J. Kumar, Preliminary Phytochemical Screening Of Methanolic Extract Of Clerodendron In For Tunatum. Iosr Journal Of Applied Chemistry, V.7, N°1, 2014, P.10-3.
- [16] Breitmaier E., Terpenes, Wiley-Vch, Verlag Gm Bh & Co, Weiheim, 2006.
- [17] Vincken, J.-P., Heng, L. De Groot, A., Gruppen, H. Phytochemistry, V 68, 2007, 275-297.

- [18] Hostettmann, K. Et Marston, A. Cambridge University Press, 1995.
- [19] Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Bunyaphatsara N., Soejarto D D., Fong H H S., 2005. Bioactive Constituents From Roots Of *Bursera Tonkinensis*. *Phytochemistry* V.66 , 2745 - 2751.
- [20] Koudougou K, Etude De La Chimie Et De L'activité Antimycosique Des Extraits De *Biophytum Petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae), Université De Ouagadougou-Dea , 2000 P.16.
- [21] Oyaizu, M., Studies On Products Of Browning Reaction. *The Japanese Journal Of Nutrition And Dietetics*, 1986, V.44, N°6, 307-315.
- [22] Topçu G, Ay A, Billici A, Sarihurkucu C, Ozturk M, And Ulubelen A. *Food Chemistry*, 2007, V 103, 816-822.
- [23] A. Merouane, A. Noui, H. Medjahed, K. Nedjari Benhadj Ali Et A.Saadi. Activité Antioxydante Des Composés Phénoliques D'huile D'olive Extraite Par Méthode Traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* V 8, N°4, August 2014, 1865-1870,
- [24] Antonius H.C ,Widajanti .W, Aditya. P, Bayu.A, Synthesis, Characterization And Anti-Oxidative Properties Of Propolis-Like Compound Prepared From Prenylation Of Indonesia's Cinnamon (*Cinnamomum Burmannii*) Essential Oil Using Γ - $Al_2O_3/NaOH/Na$. *Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research*, 2015, V.7, N°1, 715-719.
- [25] Molynaux P, The Use Of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (Dpph) For Estimating Antioxidant Activity *Songklanakarinn J.Sci.Technol.*, V.26, N°2, 2004, 211-219.
- [26] Habibou, H.H., Idrissa, M., Khalide I., "Activité Antioxydante Des Extraits Méthanoliques De Différentes Organes De *Detariummicrocarpum* Guill & Perr", *European Scientific Journal*, V15, N°12, (April 2019), 159-171.
- [27] Elmastats. M, Isildako.,T, Temur N., Determination Of Antioxydant Activity And Antioxidant Compound In Wild Edible Mushrooms *.Journal Of Food Composition And Analyze* ,V.20,(2007), 337-345.
- [28] Ben Moussa, M.T., Khelil, K., Lakehal, S., Hadeif, Y., Chemical Composition, Antimicrobial And Antioxidant Activity Of The Essential Oil Of *Brocchia Cinerea* Vis, *Batna J Med Sci*, (September 2020), V.7, N°2, 122-128
- [29] Marco, Gl. A., "Rapid Method For Evaluation Of Antioxidants". *J Am Oil Chem Soc*, (1968), V. 45, 594-8.
- [30] Mille, He. A., "Simplified Method For The Evaluation Of Antioxidants". *J Am Oilchem Soc* (1971), 48 - 91.

- [31] Laguerre, M., Giraldo, L.L.J., Lecomte, G., Pina, M., Villeneuve, P, "Outils D'évaluation In Vitro De La Capacité Antioxydant", *Fondamentale Ocl*, V.14, N°5, (September 2007), 273-289.
- [32] Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. Screening Of Plant Extracts For Antioxidant Activity: A Comparative Study On Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 2002, V.13, N°1, 8-17.
- [33] Amin Ismail; Tan Siew Hong. Antioxidant Activity Of Selected Commercial Seaweeds. *Mal J Nutr*, September 2002, V. 8, N°2, 167-177.
- [34] Le Minor L., Veron M., *Bactériologie Médicale*. 2ème Edition. Ed. Flammarion, (1989). Paris.
- [35] Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargas R., *Bactériologies Médicales : Techniques Usuelles*. Edition Simep (2ème Tirage), (1987). France
- [36] Ericsson H.M., Sherris J.C., Antimicrobial Susceptibility Testing-Report Of An International Collaborative Study. *Acta Pathol .Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl 217*, (1971), 1-90.
- [37] Billing J, Sherman P. W., Antimicrobial Functions Of Spices: Why Some Like It Hot. *Q. Rev. Biol*, V. 73, 1998, 3-49.

III.1. Introduction

Ce chapitre comporte deux parties, une première renferme le screening phytochimique et le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux présents dans les extraits des parties aériennes de *Ononis*, deuxième renferme l'évaluation des activités antiradicalaire et antibactérienne de ces extraits.

III.2. Etude phytochimique

III.2.1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction des trais extrait (methanol, chloromethanol, chloroforme), l'aspect et le solvant de solubilité des différentes modes d'extraction ont été présentés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Rendement de l'extraction des extraits de l'espèce du genre *Ononis*

Matière végétale	Extrait	Aspect	Couleur	Masse	Rendement (%)
185 g	Méthanolique	Solide	Marron	2,26 g	1,22 %
	Chlorométhanolique	Visqueuse	Vert foncé	8 g	4,32 %
	Chloroformique	Visqueuse	Vert foncé	3,56 g	1,92%

Les extractions successives par des solvants de polarité croissante permettent de séparer les composés de la matière végétale selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les rendements des extractions varient de 1.22 % à 4.32 %.

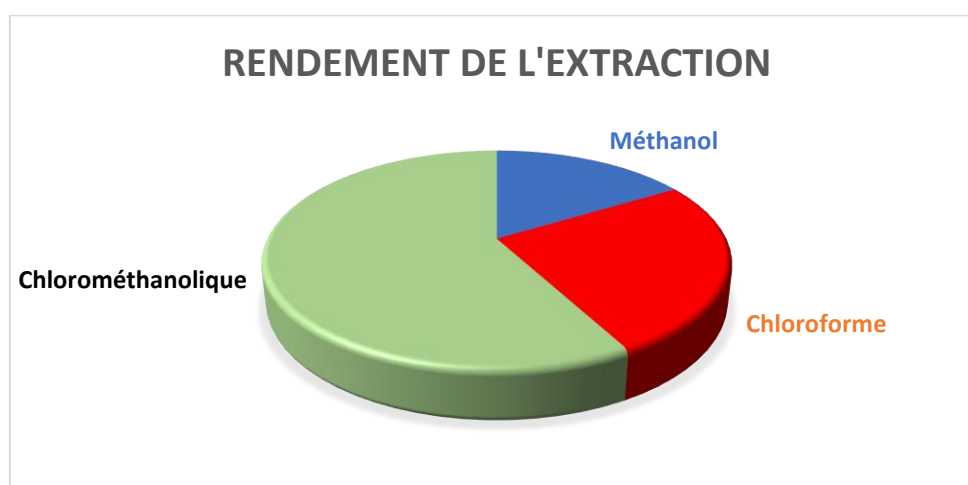


Figure III.1: Histogrammes schématiques des résultats obtenus pour l'extraction des 185 g sèche de la plante étudiée.

Les rendements sont présentés par ordre d'extraction :

L'extrait chloromethanolique présente le rendement le plus élevé, suivi successivement des extraits chloroformique et ensuite des extraits méthanolique.

D'une manière générale, les rendements des extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant [1].



Ces extraits servent par la suite à évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes.




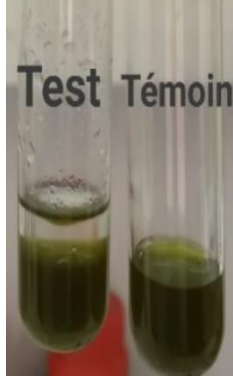
III.2.2 Screening phytochimique





Le screening phytochimique est basé essentiellement sur des réactions de précipitation et des réactions de coloration spécifiques aux différents métabolites secondaires.



Le tableau III.2 rassemble les résultats globaux du screening chimique de l'espèce du genre *Ononis*.

Tableau III.2.: Résultats de screening phytochimique

Composes recherché	Presence/absence	Coloration	Résultats
Flavon 3,4 diols	(+++)	Rouge Pourpre	
Flavonols et Flavonones	(+++)	Rouge Pourpre	

Tannins	FeCl ₃	(+++)	Bleu noir	
	Gélatine	(-)	Pas de changement de couleur	
Quinones		(++)	Jaune	
Anthraquinones		(-)	Pas de changement de couleur	

Coumarines		(-)	Pas de changement de couleur	
Alcaloïdes	Mayer	(+++)	Blanc jaunâtre	
	Dragendroff	(+++)	Orange	
Saponines		(+++)	Pas de changement de couleur	

		Triterpènes	(+++)	Rouge	
		Stérols et Terpènes	Terpène	(-)	Pas de changement de couleur
Stérols	(-)		Pas de changement de couleur		

(-) Résultats négatif, (+) Résultat faiblement positif, (++) Résultat positif, (++++) Résultat fortement positif.

Les résultats de screening phytochimique enregistré dans le tableau III.2 indique la présence des flavonoïdes, des tanins galliques, des quinones, des alcaloïdes, des triterpènes, des saponines et l'absence totale des anthraquinones, des tannins catéchique des coumarines, des terpènes et des stérols.

Les résultats obtenus montrent une richesse diversifiée en groupes chimiques actifs notamment les flavonoïdes, mais ceci reste un résultat très préliminaire et nécessite d'autres travaux afin d'isoler et d'identifier des molécules bioactives.

III.2.3 Résultats de l'étude quantitative :

III.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols des trois extraits (MeOH , CHCl₃/ MeOH, CHCl₃) est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (ayant L'équation : $Y = 0.011x - 0,001 / R^2 = 0,999$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg d'extrait sec}$) .

Les absorbances de courbe d'étalonnage en fonction de leur concentration sont rapportés sur la figure ci-dessous **Figure III.2**

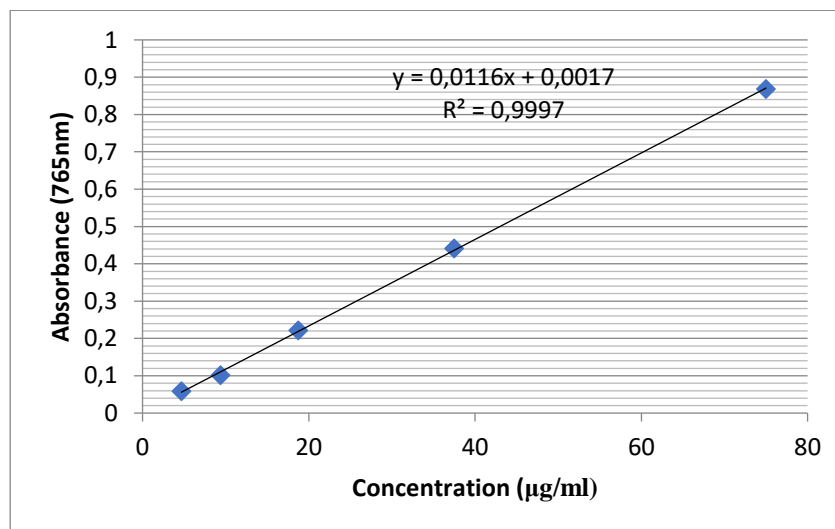


Figure III.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Figure III.3: Dosage des polyphénols totaux

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la teneur en polyphénols des extraits ont été exprimées en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait sec)

Tableau III.3 : Taux des polyphénols dans les extraits de notre plante

Extrait	CHCl_3	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	MeOH
Teneur polyphénols en μg EAG /mg PS	64.95 ± 1.73	51.86 ± 3.92	67 ± 1.15

AG : acide gallique, **EAG** : équivalent d'acide gallique, **PS** : poids sec de l'extrait.

Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions plus ou moins l'écart-type.

D'après les résultats présentés dans le tableau (**Tableau III.3**) le test a indiqué la présence des polyphénols dans tous les extraits. Nous remarquons que l'extrait Méthanol présente la teneur la plus élevée dont la valeur est de $67 \pm 1,15 \mu\text{g}$ EAG/mg PS, suivi par l'extrait chloroforme de l'ordre de $64.95 \pm 1.73 \mu\text{g}$ EAG/mg PS, puis l'extrait chloromethanol avec une teneur de $51.86 \pm 3.92 \mu\text{g}$ EAG/mg PS.

Ce résultat, est en accord avec beaucoup d'autres études, qui montrent que la plus grande proportion des composés phénoliques se trouve dans les extraits polaires.

Les résultats sont résumés dans la figure suivante (**Figure III.4**) :

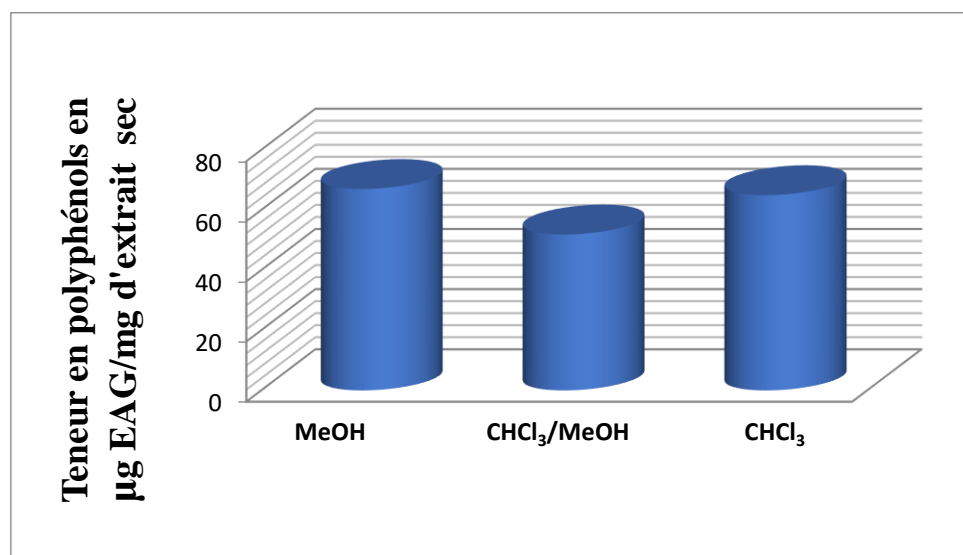


Figure III.4 : Les histogrammes de la quantité en (μg EAG/mg) des polyphénols dans les trois extraits.

III.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui révèle les flavonoïdes en jaune [2], La quercétine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (**Figure III.5**), ayant L'équation : $Y = 0,027x + 0,009$ / $R^2 = 0,999$

Les analyses quantitatives des flavonoïdes, est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en μg équivalent quercétine.

Les valeurs moyennes de la concentration en flavonoïdes de la partie aérienne sèche de la plante sont représentées dans le **tableau III.4** calculées à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 430 nm.

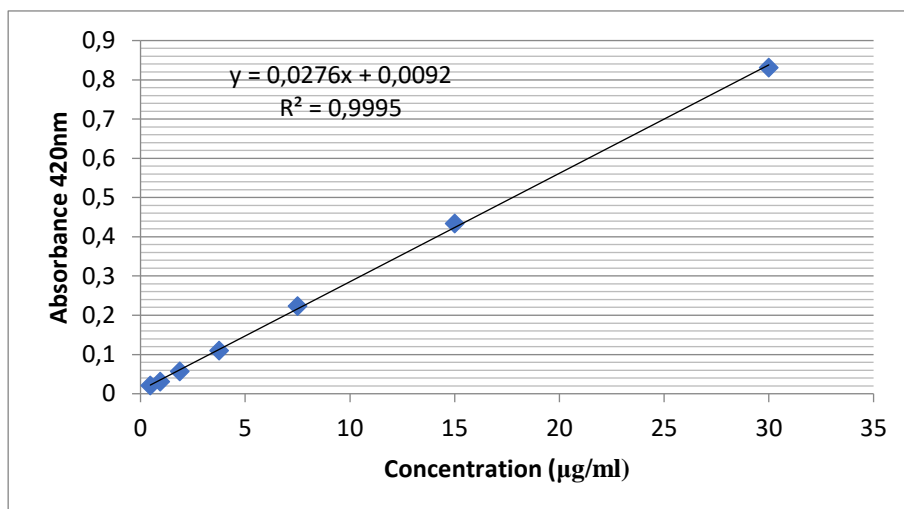


Figure III.5: Courbe d'étalonnage de la quercétine



Figure III.6 : Dosage des flavonoïdes totaux

Le tableau III.4 ci-dessous montre les résultats de la Teneur en flavonoïdes des extraits :

Tableau III.4: Taux des flavonoïdes dans les différents extraits.

Extrait	CHCl ₃	CHCl ₃ /MeOH	MeOH
Teneur flavonoïdes µg EQ/mg PS	26.55 ± 2.35	13.27 ± 0.13	15.01 ± 0.07

Q : quercétine, EQ : équivalent de quercétine, PS : Poids Sec de l'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD

Les résultats de la quantification des flavonoïdes indiquent que (**Tableau III.4**), tous les extraits montrent la présence de flavonoïdes avec des teneurs varient entre 26.55 ±2.35 et 13.27 ± 0.13 (µg EQ/mg PS) le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait chloroformique (CHCl₃) ce qui indique la richesse des flavonoïdes avec une teneur de 26.55 ±2.3513 µg EQ/mg PS, puis l'extrait méthanol avec une teneur de l'ordre de 15,01 ± 0,0713 µg EQ/mg PS. Tandis que l'extrait Chlorométhanolique a enregistré une teneur de 13.27 ± 0.13 µg EQ/mg PS.

D'après ces résultats, le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction qui a permis d'obtenir la teneur la plus élevée en flavonoïdes par rapport aux extraits méthanolique et chlorométhanolique.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés sous forme d'histogramme comme le montre la figure ont résumés dans la figure suivante **III.7** :

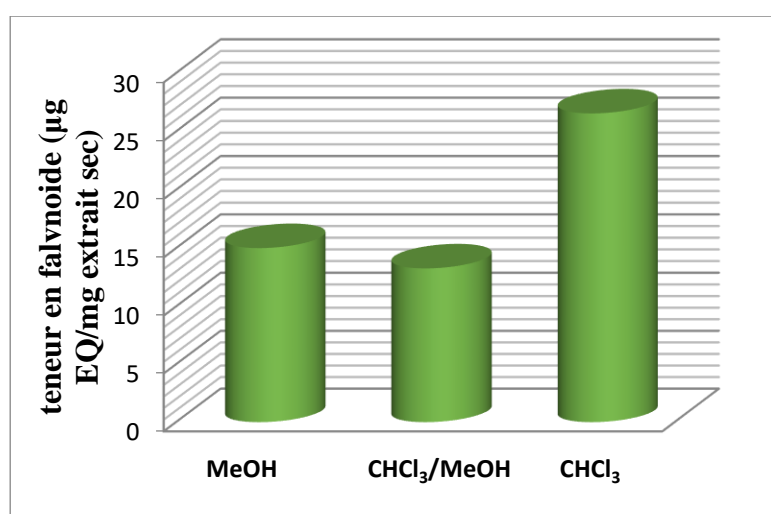


Figure III.7 : Les histogrammes de la quantité en (µg EQ/mg PS) des Flavonoïdes dans les trois extraits

Les variations observées dans les taux de composés phénoliques et flavonoïdes, dans les différents extraits, pourraient être associées à la quantité de composés présents dans les extraits bruts. De nombreux facteurs pourraient affecter la quantité de contenus phénoliques et flavonoïdes, y compris la période et la zone de récolte du matériel végétal, la procédure d'extraction et l'efficacité des solvants d'extraction. Selon Adaramola., *et al* [3] l'utilisation de solvants moyennement polaires pour extraire les composés phénoliques et les antioxydants est préférable à celle des solvants polaires et apolaires, en accord avec les résultats de notre étude [3].

Plusieurs études menées sur les teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes des espèces du genre *Ononis* ont montré des variations à leur niveau. En fait, les plantes *Ononis natrix* et *O. spinosa* ont montré de faibles teneurs en polyphénols et flavonoïdes par rapport à nos résultats [4]. En revanche, les espèces *O. angustissima*, [5] *O. sessilifolia*, *O. basiadnata* et *O. macrosperma* [6] ont présenté une teneur en polyphénols élevée par rapport aux nôtres. De plus, certaines recherches ont mis en évidence des teneurs en polyphénols différentes dans plusieurs espèces du genre *Ononis*, telles que *O. spinosa* [7] *O. pubescens*, *O. ornithopodioides* [8] et *O. natrix* [9].

Les composés phénoliques sont des antioxydants naturels qui possèdent des propriétés redox. Ils sont très réactifs et ont la capacité de neutraliser les radicaux libres par des réactions de piégeage et/ou de chélation [10]. La quantification des composés phénoliques dans les extraits bruts pourrait prédire le pouvoir de l'activité antioxydante.

III.3. Activités biologiques *in vitro*

III.3.1. Activité antioxydante

Trois méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits chloroformique (CHCl₃), chlorométhanolique et méthanolique (MeOH) de *Ononis*.

III.3.1.1. Évaluation de pouvoir antiradicalaire par le DPPH :

Les activités antiradicalaires des extraits de *Ononis* et du témoin positif l'acide ascorbique ont été déterminées par la méthode au DPPH. On remarque un changement de couleur du violet au jaune pour les trois extraits en augmentant leur concentration, cela veut dire que le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est réduit en présence d'une substance réductrice qui existe dans les extraits.



Figure III.8: Activité anti radicalaire (DPPH).

Les résultats obtenus, à une longueur d'onde de 517 nm par spectrophotomètre, ont permis de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les différents extraits de l'espèce *Ononis* (Figure III.9) Ces courbes montrent que tous les extraits ainsi que le standard (acide ascorbique) (Figure III.10) réduisent de manière dose dépendante le radical DPPH, C'est-à-dire, le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à un seuil ou le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration.

Ces résultats ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.

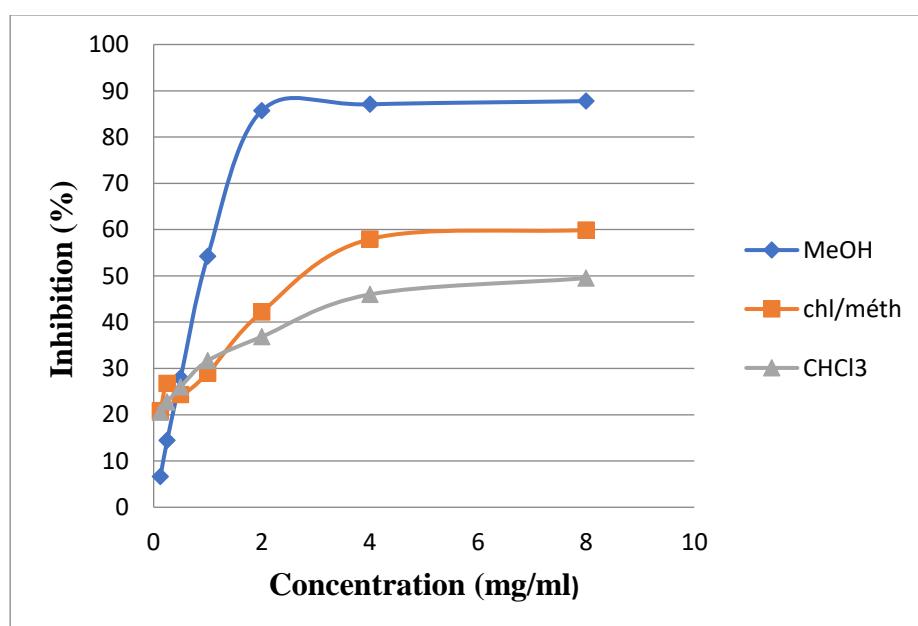


Figure III.9: Courbes représentant le % d'inhibition du DPPH par différents extraits

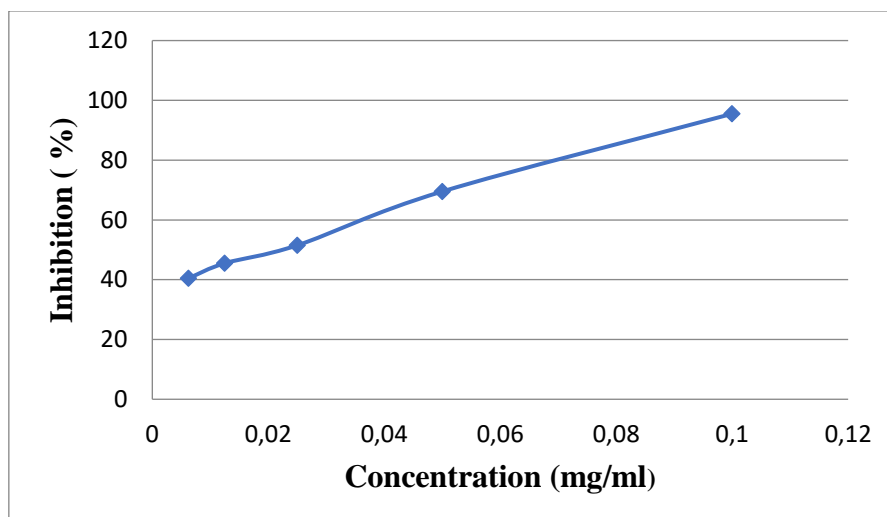


Figure III.10: Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par standard testé (Acide ascorbique) En fonction de la concentration

Les valeurs d'IC₅₀ de chaque extrait sont représentées dans le tableau Suivant

Tableau III.5: valeur des IC₅₀ des extraits

Extrait	CHCl ₃	CHCl ₃ /MeOH	MeOH	Vit (c)
IC ₅₀ (mg/ml)	6.90 ± 0.47	4.54 ± 0.05	2.04 ± 0.082	0.020 ± 0.01

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD .

D'après les résultats des valeurs de IC₅₀ mentionnées dans le (**Tableau III.5**), l'extrait Méthanolique a montré un pouvoir antioxydant puissant leur IC₅₀ est 2.04 ± 0.082 mg/ml comparativement à la IC₅₀ de la solution standard de l'acide ascorbique qui est de 0.020 ± 0.01mg/ml. Puis l'extrait chlromethanolique qui présenté une activité antioxydant moyenne avec une IC₅₀ 4.54 ± 0.05 mg/ml mais relativement faible que celle de l'acide ascorbique. L'extrait chloroformique a montré un pourcentage d'inhibition le plus faible avec IC₅₀=6.90 ± 0.47 mg/ml.

Ce résultat est en bon accord avec les données du dosage des polyphénols totaux qui montrent Une richesse remarquable de l'extrait méthanolique. Comparativement aux autres extraits.

Les résultats d'IC₅₀ de tous les extraits et de l'acide ascorbique sont résumés dans la figure suivante :

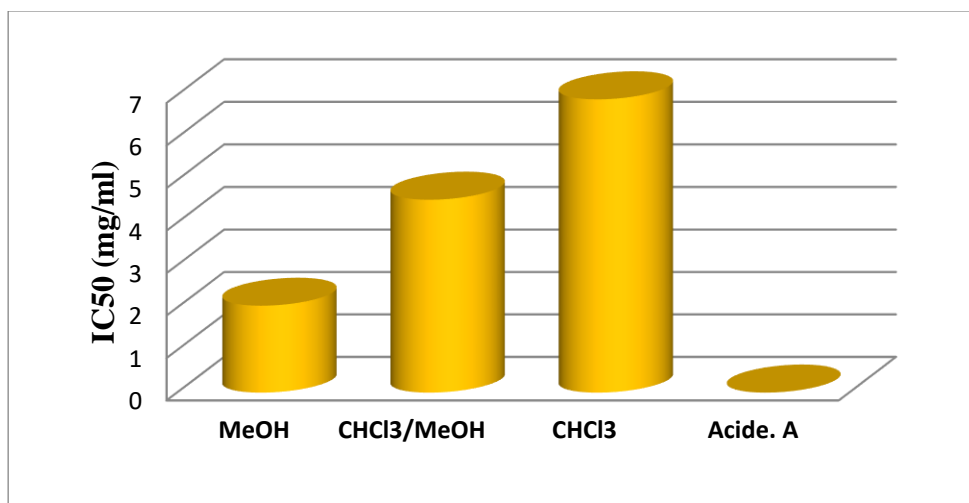


Figure III.11 : Les valeurs d'inhibition (IC₅₀) des extraits et des standards

III.3.1.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)

Le test de puissance réducteur est souvent utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant à donner un électron ou d'hydrogène, qui se traduit par une coloration verte tel que montre la figure III.12:

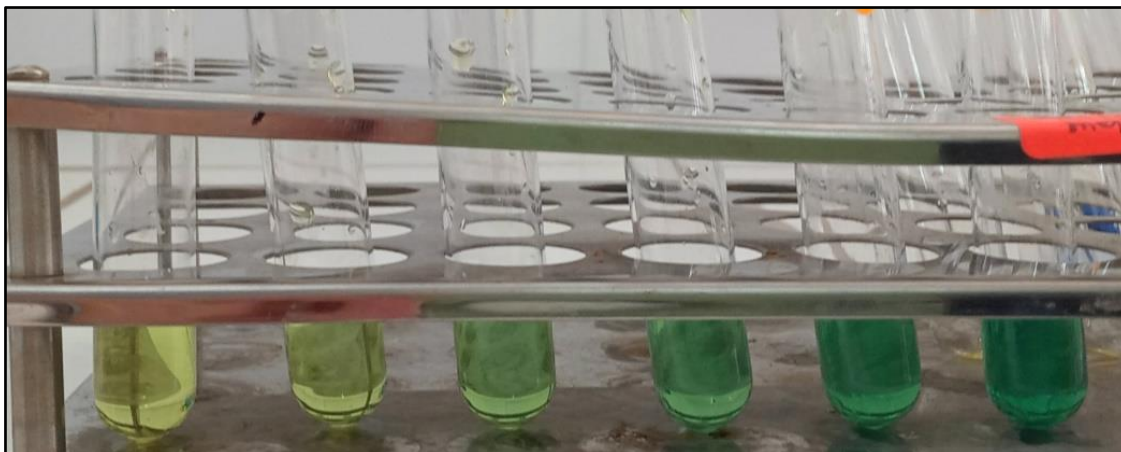


Figure III.12: Pouvoir réducteur frappe des extraits de *Ononis*

La figure (III.13) montre les activités de puissance réductrices (comme indiqué par l'absorbance à 700 nm) des différents extraits par rapport à la BHT.

Plus l'absorbance de l'échantillon est élevée, plus la puissance réductrice est supérieure

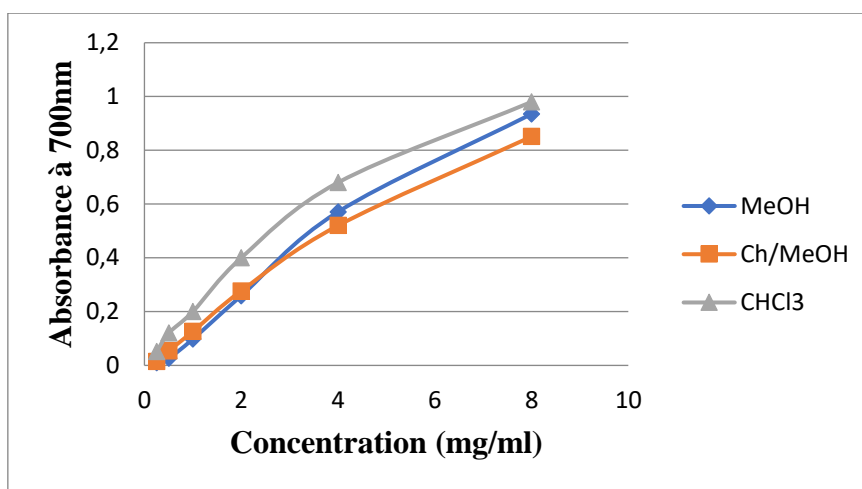


Figure III.13: Courbe d'absorbance de test FRAP en fonction de la concentration

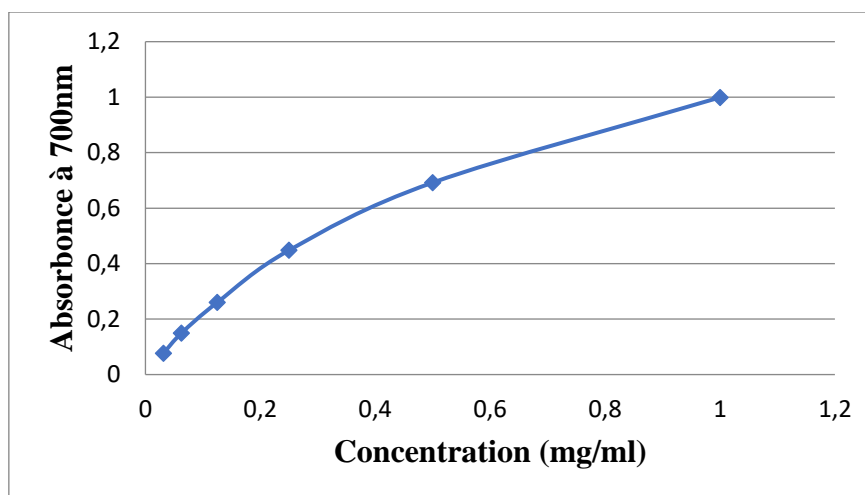


Figure III.14: Courbe d'absorbance de BHT en fonction de la concentration

Le pouvoir réducteur des extraits a été également exprimé par la détermination de leur concentration efficace (CE_{50}) qui correspond à une absorbance égale à 0,5 (**Tableau III.6**). Il est à noter que l'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur CE_{50} .

Tableau III.6: Les valeurs de EC_{50} des extraits

Extrait	CHCl ₃	CHCl ₃ /MeOH	MeOH	BHT
CE₅₀ (mg/ml)	3.51	4.40	3.53	0.19

Les résultats obtenus avec ce test ne vont pas dans le même sens que ceux enregistrés par la méthode de piégeage du radical DPPH.

L'extrait chloroformique possède un pouvoir antioxydant plus important que celui des autres extraits de l'espèce *Ononis*;

Au niveau des extraits de notre plante, la plus faible CE_{50} est obtenue par l'extrait chloroforme (3.51 mg/ml) suivie par le méthanol (3.53 mg/ml) et le chlorométhanol (4.40 mg/ml). Malgré le pouvoir réducteur important qu'affichait les différents extraits, leurs CE_{50} restent inférieure à celles enregistrées par l'antioxydant de référence BHT (0.19 mg/ml). La forte activité de l'extrait chloroformique est interprété que cet extrait présente un pouvoir réducteur important renfermant aussi des molécules ayant un potentiel réducteur fort. D'après (Newman, L. A 1998) [11]. Le chloroforme peut extraire des composés flavonoïdes aglycones méthoxyles et peu hydroxylées, probablement que notre extrait contient de ces composés des flavonoïdes et comme l'indique le dosage des flavonoïdes que la quantité la plus élevée des flavonoïdes enregistrés dans l'extrait chloroformique. On peut déduire alors de ce test que les polyphénols notamment les flavonoïdes jouent un rôle très important dans l'activité antioxydant.

Les résultats du pouvoir réducteur de tous les extraits et du standard sont résumés dans la figure suivante (**Figure III.15**) :

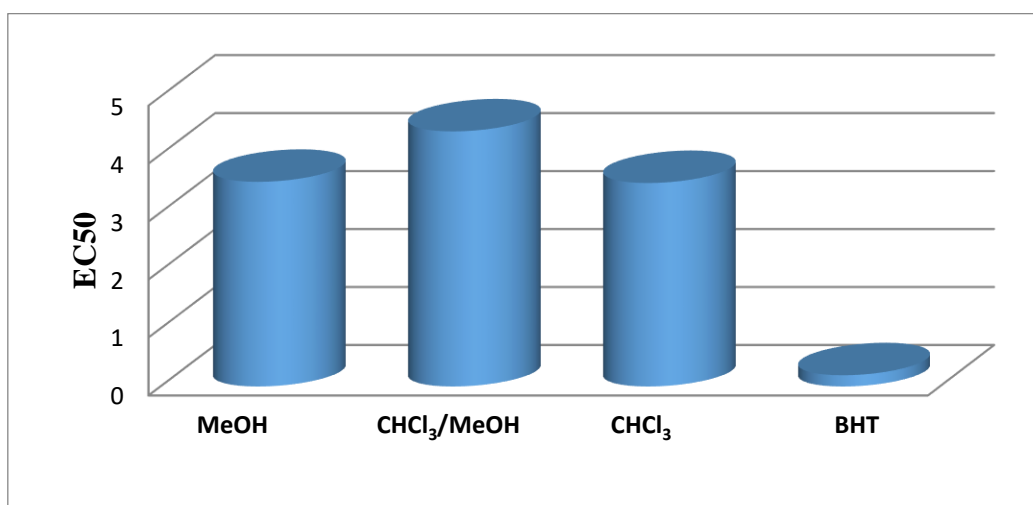


Figure III.15 : Les histogrammes des concentration efficace (EC_{50}) des extraits et de standard BHT

III.3.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

Dans cette analyse, la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des extrait la formation des hydro peroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaquent simultanément le β -carotène et ayant comme résultat le blanchiment du β -carotène et la disparition de sa couleur jaune [12].

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence et en absence des extraits de notre

plante, de l'antioxydant standard BHA et les pourcentages de l'activité antioxydante (AA %) sont représentés dans la **Figure (III.16)**

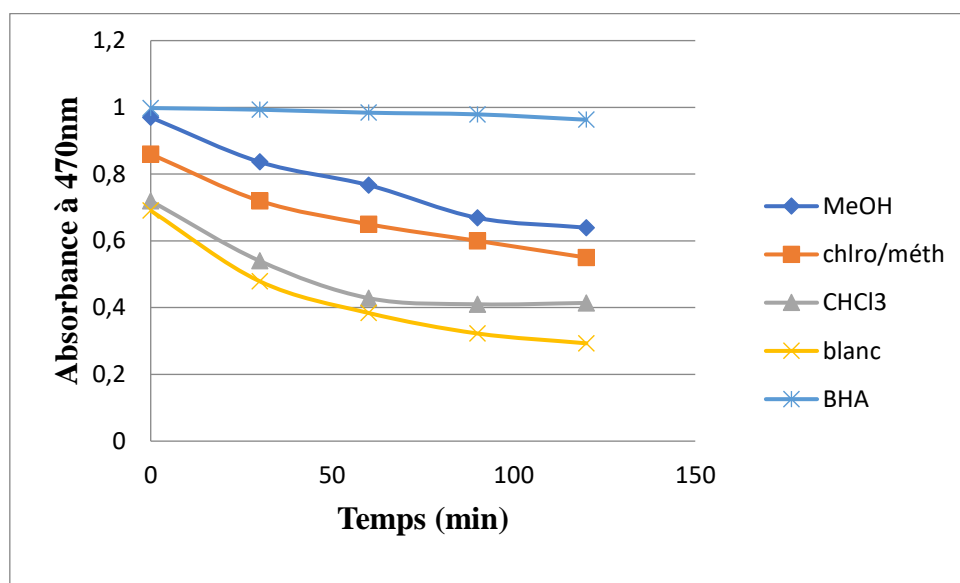


Figure III.16: Courbe d'absorbance de β -carotène en fonction du temps en présence des extraits et de référence

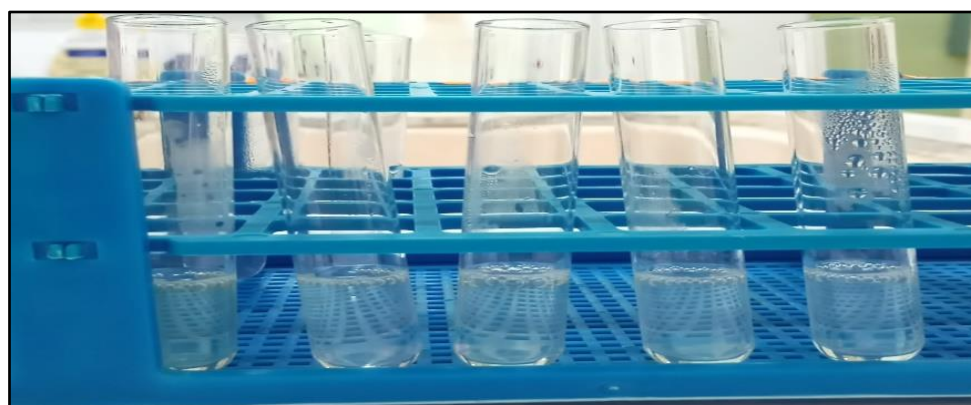


Figure III.17: Activités de blanchiment de β -carotène

Les résultats de blanchiment de β -carotène par différents extraits présentés dans le tableau ci-dessus :

Tableau III.7 : Activité de blanchissement du β -carotène des extraits et de standard

Extrait	CHCl ₃	CHCl ₃ /MeOH	MeOH	BHA
AA%	(23.01 ± 0.08)	(23.52 ± 0.08)	(24.52 ± 0.09)	(91,19 ± 0.00)

Les résultats de blanchiment du β -carotène (**Tableau III.7**) ont indiqué que l'activité la plus élevée de nos extraits à une concentration de 8 mg/ml a été enregistrée par l'extrait méthanol avec AA% (24.52 ± 0.09 %), AA% (91,19 ± 0.00 %) suivi par l'extrait chlorométhanol avec

AA% (23.52 ± 0.08 %). L'activité la plus faible a été enregistré par l'extrait chloroformique avec AA% (23.01 ± 0.08 %).

D'après les résultats obtenus, il est clair que le BHA et les différents extraits testés de notre plante inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

Donc l'activité antioxydante des extraits polaires pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques [12].

Les résultats d'activités de blanchiment de tous les extraits et du standard sont résumés dans la figure suivante (**Figure III.18**) :

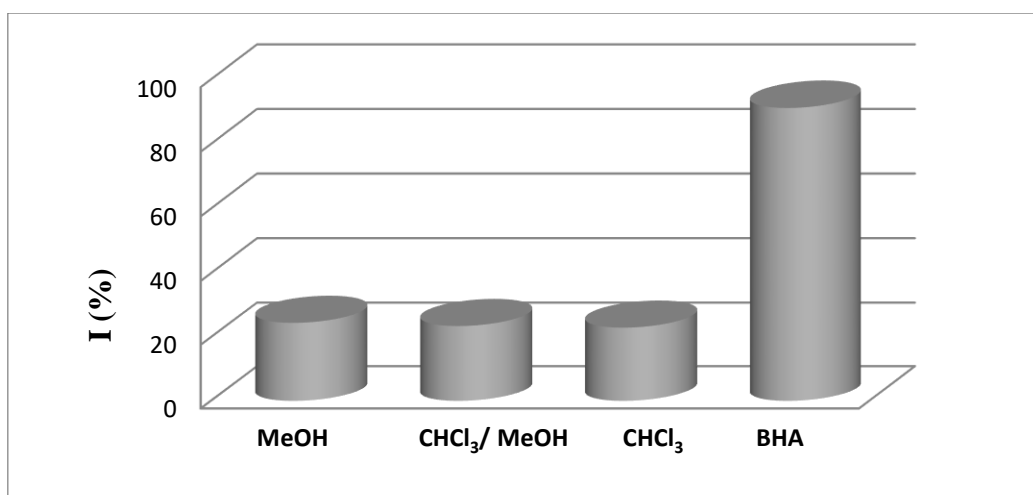


Figure III.18 : Histogramme représentatif d'activité antioxydante % des extraits et de BHA pour le test de blanchissement de β -carotène

Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres [13-15]. De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leurs structures ; les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3',4'- dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C [16-17]

III.4. L'Activité antimicrobienne

Après incubation de 24 heures à 37°C, les boîtes pétries ont été récupérées afin de mesurer les diamètres des zones d'inhibition des extraits (Chloroforme, Chlorométhanol et le Méthanol) sur les quatre souches bactériennes testées. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau **III.8**.

Tableau III.8: Résultats de l'antibiogramme des extraits de *Ononis*

Extrait	Diamètre des zones d'inhibition (mm), concentrations des extraits et de référence et sensibilité des souches bactériennes								
	C	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cerous</i>		<i>S. Aureus</i>	
mg/ml	D	S	D	S	D	S	D	S	
Methanolique	50	9	+	9	+	11.5	+	16	+
Chloro methanolique	25	14	+	6	-	16	+	0	-
Chloroformique	25	25	+	10	+	29.5	+	0	-
Gentamycine	40	47	++	30	++	38.5	++	30	++
DMSO		0		0		0		0	

DMSO : Contrôle négatif ; **C** : concentration ; **D** : diamètre de la zone d'inhibition ; **S** : Sensibilité ; - : Résistante ; + : Sensible ; ; ++ : Très Sensible.

Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en millimètre [18], est mesuré à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse pour les différentes concentrations des trois extraits autour des disques. On définit la sensibilité d'un germe comme étant nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm, la sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 le germe est très sensible [18].

Les résultats de l'activités antibactérienne (**tableau III.8**) montrent que les réponses sont très variables en fonction de la souche testée, du type d'extrait et de la concentration utilisée. L'extrait Chloroforme montre une bonne activité antibactérienne contre *Bacillus cerous* et *Escherichia coli* avec des diamètres d'inhibition de 29.5 mm et 25,10 mm respectivement, et une activité antibactérienne modérée contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 10 mm, Concernant la souche *Staphylococcus aureus* aucune zone d'inhibition n'at été constaté autour de disque.

L'extrait chlorométhanolique ayant une bonne activité antibactérienne conte *Bacillus cerous* et *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 16 et 14 mm respectivement, et une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 6 mm.

Concernant la souche *Staphylococcus aureus* aucune zone d'inhibition n'a été constaté autour de disque.

L'extrait méthanolique a montré une meilleure activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cerous* avec des diamètres d'inhibition de 16 mm et 11.5 mm, respectivement. Le même extrait montre une réponse moyenne contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des mêmes diamètres d'inhibition de 9 mm.

En ce qui concerne l'antibiotique qui a fait l'objet de notre étude (La gentamycine), il a donné des résultats satisfaisants sur la majorité des souches étudiées et particulièrement sur la souche *Escherichia coli*, et *Bacillus cerous* avec des zones d'inhibition de 48 et 38.5 mm respectivement.

Gram (-)



Figure III.19 : activité de E.Co

Gram (-)

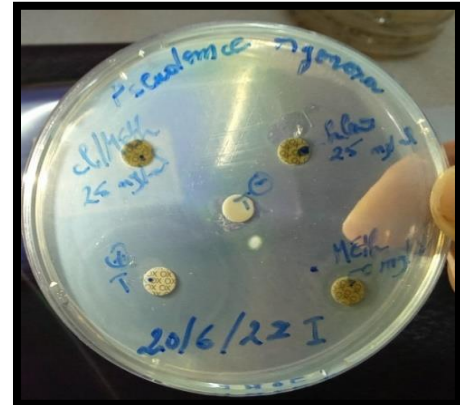


Figure III.20 : activité de P. aeruginosa

Gram (+)

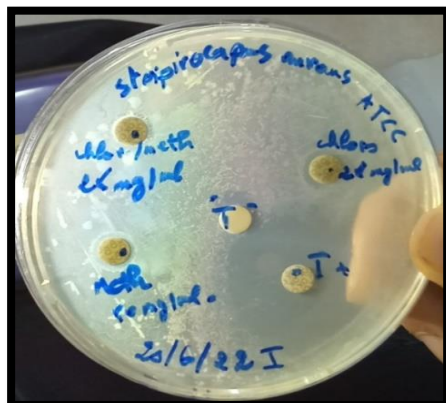


Figure III.21 : activité de Staphylococcus Aureus

Gram (+)

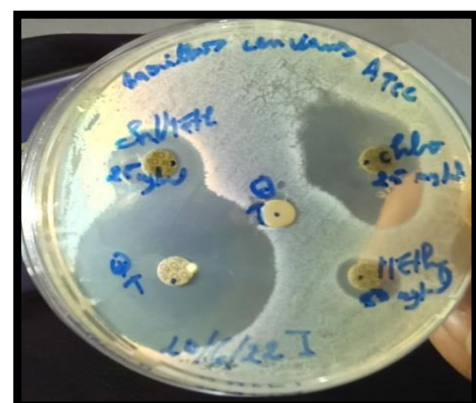


Figure III.22 : activité de Bacillus cerous

Des résultats mentionnés dans les tableaux précédents, on peut tirer les points suivants :

- ✓ Les résultats de l'activité antibactérienne qui a été réalisée sur les différents extraits ont montrés que les souches, *Bacillus cerous*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, sont sensibles à une concentration de 25 mg/ml par contre la souche *Staphylococcus Aureus* semble très résistante (absence des zones d'inhibition autour des disques) aux extrait chloroformique et chlorométhanolique.

- ✓ Les souches *Bacillus cerous*, *E. Coli*, sont sensibles tandis que les souche *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont résistant à l'extrait chlorométhanolique à une concentration de 25 mg/ml.
- ✓ Les souches *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus cerous*, sont sensibles par contre les souche *P. aeruginosa*, *E. Coli*, sont résistantes au extrait méthanolique. à une concentration de 50 mg/ml.

La résistance importante de la souches *P. aeruginosa* à Gram (-) à l'extrait chloromethanolique pourrait probablement interpréter d'après (Ben Abdallah 2019) [19] que leur membrane extérieure qui entourent la paroi de la cellule qui limitent la diffusion des composés par les lipopolysaccharides de couverture. Par contre, pour les bactéries Gram (+), l'absence de cette barrière permet le contact direct des constituants des composés phénoliques avec les phospholipides bicouches de la membrane cellulaire, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité aux ions et le passage des composés et les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles comme les diterpènes phénoliques de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

III.5. Conclusion

Les résultats de dosage des composés phénoliques totaux ne peuvent pas indiquer exactement les teneurs des extraits en ces composés, parce que malgré la sensibilité de la méthode de Folin- Ciocalteu, ce réactif peut réagir encore avec les acides aminés aromatiques des protéines (surtout avec le tryptophane), les glucides réducteurs comme le glucose et le fructose et la vitamine C (problèmes d'interférences).

La teneur des molécules bioactives varie selon certains paramètres pendant la croissance de la plante telles que : la salinité, sécheresse et exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires [20]. Selon Wojdylo et al. [21] la teneur en composés phénoliques variées également en fonction de la méthode d'extraction. Les résultats obtenus montrent une assez bonne corrélation entre l'activité antiradicalaire et le taux des polyphénols. Des études antérieures ont montrés que les espèces du genre *Ononis* sont des sources importantes de composés phénoliques avec une activité antioxydante pertinente [22].

Références bibliographiques

- [1] Mouri.N.F., Latreche.A, Mehdadi.Z., Bengherraz.Z., Activités Antibactérienne De Quatre Extrait De Teucrium Polium L, De Mont De Tessala (Algérie Occidentale, Bulletin De La Société Royal De Sciences De Liégé, V.85, (Décembre 2016), 253-262.
- [2] Ribéreau-Gayon, P., Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, ed. 1968, Paris.
- [3] Adaramola, B., Onigbinde, A., 2016. Effect of extraction solvent on the phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity of clove bud. *J. Pharm. Biol. Sci. IOSR.* 11, 33-8.
- [4] Alali, F. Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Oberlies, N. H., Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Nat. Prod. Res.* V. 21,2007, 1121-1131.
- [5] El rhaffari, L., Zaid, A., Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Actes du 4ème congrès Européen d’Ethnopharmacologie : origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes,2002, 295-304.
- [6] Baldemir, A., Koroğlu, A., Altanlar, N., Coşkun, M., A Comparative Study on the in vitro antioxidant and antimicrobial potentials of three endemic *Ononis L.* Species from Turkey. *Turk. J. Pharm. Sci,* V. 15,2018, 125-129.
- [7] Orhan, D. D., Özçelik, B., Hoşbaş, S., Vural, M., Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish. J. Biol.* V.36,2012, 672-686.
- [8] Kocak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M. C., Tepe, B, *Salvia cadmica*: phenolic composition and biological activity. *Ind. Crops. Prod,*V.85,2016, 204-212.
- [9] Saeed, A., 2003. Stereoselective synthesis of (3R)-3,4-dihydro-6,8-dimethoxy-3- undecyl-1H-[2] benzopyran-1-one and derivatives, metabolites from *Ononis natrix*. *Helv. Chim. Acta.* 86, 377-383.
- [10] Petti, S., Scully, C., 2009. Polyphenols, oral health and disease: a review. *J. Dent.* 37, 413-423.
- [11] Newman, L. A., Doty, S. L., Gery, K. L., Heilman, P. E., Muiznieks, I., Shang, T. Q., Gordon, M. P. , Phytoremediation Of Organic Contaminants: A Review of Phytoremediation Research at the University of Washington. *J. Soil Contam .V. 7 N°4,* (1998), 531-542.
- [12] Chedad.N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkan, M.C., Bousselsela, H., Mokhtar, S.M, Polyphénols Toutaux, Activités Antioxydant Et Antimicrobienne Des Extraits Des Feuille De *Marrabium Deserti De Néo*, *Phytothérapie,* (2015), V.13,118-129.

- [13] Sengul, M., et al., Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009.22(1).
- [14] Verzelloni, E., D. Tagliazucchi, and A. Conte, Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 2007. 105(2): p.564-571.
- [15] Zhang, L., et al., Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011. V.59 , N°23, 12361-12367.
- [16] Marfak, A., Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. 2003, Thèse de Doctorat. Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.
- [17] Sokół-Łętowska, A., J. Oszmiański, and A. Wojdyło, Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 2007. 103(3): p.853-859.
- [18] Durafford C., D'Hervicourt L., Lapraz J .C., 1990 Cahiers de phytothérapie Clinique, Examen de laboratoire galénique, Elément thérapeutiques Synergiques, 2ème Ed Masson V.78, 1990, Paris.
- [19] Ben Abdallah, D. Frikha, S. Maalej, S. Sassi, , Evaluation In Vitro De L'activités Anti Bactérienne Et Anti Fongique De Quatre Espèces Algales Marines, *J. I Sfax*. N° 31, 2019 ,38-44.
- [20] Falleh, H., et al., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 2008. V.331, N°5, 372-379.
- [21] Wojdyło, A., J. Oszmiański, and R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007. V.105, N°3, 940-949.
- [22] Mezrage, A., Malafronte, N., Bouhiroum, M., Travaglino, C., Rousso, D., Milella, L., Sevirino, L., Tommasi, N.D., Braca, A., Piaz, F.D., "Phytochemical And Antioxydant Activity Studies On *Ononis Angustissima* L. Aerial Parts, Isolation Of Two New Flavonoids", *Natural Product Reserch*, (Juin 2016), 1-8.

Conclusion générale et Prescriptives :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique d'une espèce du genre *Ononis* appartient à la famille des Fabacées. Endémiques à l'Algérie et n'ayant jamais fait objet d'étude auparavant.

Le screening phytochimique réalisé sur les différents extraits a montré la présence des flavonoïdes, des tanins galliques, des quinones, des alcaloïdes, des triterpènes, des saponines et l'absence totale des anthraquinones, des tannins catéchiques, des coumarines, des terpènes et des stérols.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les trois extraits, indique que l'extrait méthanol et chloroforme de la plante étudiée sont les plus riches en composés phénoliques, alors que les teneurs en flavonoïdes, l'extrait chloroformique révèle la teneur plus élevée par rapport à l'extrait méthanolique et chloroformique.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par trois méthodes : le test de réduction du radical libre DPPH, blanchissement du β -carotène et la méthode de frappe. Pour le premier test les résultats ont montré que pour le test de réduction du radical libre DPPH, l'activité antiradicalaire est élevée dans l'extrait le plus polaire, par contre elle est faible pour les deux autres extraits, l'oxydation du β -carotène est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, par contre l'activité des extraits chloroforme et chlorométhanolique sont très proches. Concernant la technique de réduction du fer (FRAP), les résultats montrent que tous les extraits ont une capacité à réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration dont on remarque que l'extrait chloroformique a une activité plus élevée par rapport à l'extrait méthanolique et chlorométhanolique.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion disque, les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées sauf la souche *P. aeruginosa* qui manifeste une résistance pour l'extrait chlorométhanolique, la souche *Staphylococcus Aureus* aucune activité enregistrée pour l'extrait chloroformique et chlorométhanolique.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est

souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de cette plante.

Prescriptives :

Plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés.

- Des études plus approfondies sur la plante pour voir sa toxicité, effets indésirables, etc....
- Des tests biologiques supplémentaires seront nécessaires pour vérifier les activités nouvelles et bénéfique de cette plante.
- Faire des études précliniques in vivo afin de prouver les résultats obtenus in vitro.
- Purification, caractérisation structurelle et détermination de l'effet bioactif des composés isolés, car nous traitons un extrait et pas un composé pur.