



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences**

**Département de chimie**

**MEMOIRE DE MASTER**

Spécialité : Chimie Organique

Intitulé

**Etude phytochimique et évaluation des activités  
biologiques d'une espèce Algérienne de la famille  
Fabaceae**

Présenté Par :

**KEDDAH Marwa**

**BOUDJELELLE Samia**

Devant le jury composé de :

**Mr. A. MEZRAG**

Maître de conférences B

**Président**

**Mme. C. ESSEID**

Maître de conférences B

**Examinatrice**

**Mme. M.AISSAOUI**

Maître de conférences B

**Promotrice**

Soutenu le : 13/07/2022

## Résumé

Le genre *Lathyrus* est une plante médicinale appartenant à la famille des fabacées cette espèce connue sous le nom de « *lathyros* » Cultivée dans la région de la wilaya de Médéa

La première partie de cette étude concerne le screening phytochimique des parties aériennes a mis en évidence la présence des phénols, flavonoïdes, tannins, tri terpène, alcaloïde et saponines.

Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: chloroforme, méthanol et mélange (chloro+méth) Les rendements respectifs sont : 1.26%, 13.08% et 5.96% Ainsi que la quantification de La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 27.69- 18.04 et 17.87 mg EAC/g Ps dans les extraits de chloroforme, Méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode  $AlCl_3$ , leur teneur est de 7.16- 19.43 et 14.93mg EQ/g Ps dans les extraits de chloroforme, Méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement. Les tanins sont estimés par une autre méthode utilisant vanilline. Leur teneur est de 4.32- 5.89et 6.80mg EC/g Ps dans les extraits de chloroforme, Méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement.

La deuxième partie fait l'objet de l'étude de La deuxième partie fait l'objet de l'étude de l'activité biologique des extraits préparés de genre *lathyrus*. L'activité antioxydant a été évaluée en utilisant trois méthodes différentes: la technique de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH et méthode de réduction du fer (FRAP) Pour le premier test elle a été estimée à 90.25% - 91.02% -67.2% pour les extraits de chloroforme Méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement, celle du BHA 96.04%. Pour le second test L'IC<sub>50</sub>a été estimée à 5.96–4.54– 6.18 mg/ml pour les extraits de chloroforme, Méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement. Alors que celle du témoin positif acide ascorbiques est de 0.60 mg/ml.et pour l'EC<sub>50</sub> de méthode de frappe été estimé à 3.27-5.27-4.46 mg/ml pour les extrait de chloroforme, méthanol et mélange (chloro+méth) respectivement. Alors que le BHT et de4.97mg/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*, *Staphylococcus aureus* selon la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton, L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que les extraits méthanolique et chloroformique sont les plus actifs pour l'ensemble des souches testées et ont révélé une activité antibactérienne significative contre *S. aureus* résistant à et *E. coli* .

**Mots clés:** Activité antioxydante, Polyphénols ,Tanins,Lathyrus, FRAP, Antibactérienne.



## *Remerciement*

Nous remercions notre bon Dieu qui nous a donné le courage et la volonte de poursuivre nos études, ainsi que nos parents, qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite.

Nos remerciements vont aussi à l'ensemble de nos professeurs du département de Chimie tout le long de ces années d'études.

Nous remercions sincèrement notre encadreur : madame «**Aissaoui Meriem**», qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance tout pour nous avoir accordé sa confiance que pour nous avoir guidé dans notre travail tout au long de ce semestre, pour ses conseils et ses commentaires ainsi que pour sa bienveillance.

Nous voudrions exprimer notre gratitude au doctorat : «**Mezrag abd errahmen**» «**C.E SSEID**» pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous remercions tous les membres du laboratoire et particulièrement : Madame «**ABADA Lila** » ingénieur du laboratoire et Mdame «**TIMIZAR Zineb**» qui nous a accompagné tout le long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de gentillesse et de patience.

# Dédicaces



*Je dédie ce travail:  
A mes chers parents,  
mon père qui m'ont toujours encouragé  
tout au long de ma vie.*

*A ma mère aucun hommage ne pourrait être à la  
hauteur de l'amour dont elle ne cesse de me combler.  
Que dieu la procure bonne santé et long vie.*

*A mes chères sœurs **Lwiza ,kanza, kawther,Hoda** et mon  
frère **Youcef** et mon marie **mouhamed**  
ET toute ma famille*

*A mon binôme « **Marwa** » qui a partagé avec moi les  
moments difficiles de ce travail.  
A mes chère amis et collègues*

*Samia*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents depuis mes premiers pas à L'école, vous ne vous êtes jamais lassé de me relater*

*L'importance des études.*

*Mon père **Sidali** qui m'ont toujours encouragé tout aulong de ma vie.*



*Ma mère **Ghaniya** tu représentes pour moi le symbole de bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mon frère **Madjide**, ma sœur **Loubna**, vous avoir à mes côtés représente un bonheur pour moi.*

*A mon binôme « **Samia** » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*A mes chère Amis ET collègues*

**MARWA**

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance

**BHA** : butylhydroxyanisol

**BHT** : Hydroxytoluène Butylé

**DPPH** : diphenylpicrylhydrazy

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxydant Power

**RNS** : Espèce réactives de l'azote.

**ROS** : Espèce réactives del'oxygène

**Fe<sup>+2</sup>**: Fer ferreux

**Fe<sup>+3</sup>** : Fer ferrique

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%.

**RL**: Radicaux Libres

**UV** : ultraviolet

**DMSO**: Diméthyl sulfoxyde

**MH**: Mueller Hinton agar

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'Aluminium

**nm**: nanometer

**Mg EQ/g Ps**: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante

**PS** : poids sec de l'extrait.

**Q** : quercétine

**EQ** : équivalent de quercétine,

**C** : Catéchine

**EC**: équivalent de Catéchine

**ATTC** : American Type Culture Collection

## *Liste des figures*

| <b>Figure</b>       | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|---------------------|---|-------------|
| <b>Figure I.1</b>   | Carte de répartition géographique des Fabacées  | 4           |
| <b>Figure I.2</b>   | formation des radicaux libre  | 23          |
| <b>Figure II.1</b>  | Etapes d'extraction   | 26          |
| <b>Figure II. 2</b> | Protocole d'extraction  | 27          |
| <b>Figure II .3</b> | Préparation des extraits  | 28          |
| <b>Figure II.4</b>  | Réaction du Chlorure d'aluminium et lesFlavonoïdes  | 32          |
| <b>Figure II .5</b> | Protocole de dosage des flavonoïdes totaux  | 34          |
| <b>Figure II.6</b>  | Protocole de dosage des Tanins  | 35          |
| <b>Figure II. 7</b> | Réaction de radical DPPH• avec un antioxydantAH.  | 36          |
| <b>Figure II.8</b>  | Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des trois extraits de plant lathyrus par la méthode de DPPH                    | 38          |
| <b>Figure II.9</b>  | Protocole de l'évaluation de l'activité anti radicalaire par la méthode de DPPH   | 39          |
| <b>Figure II.10</b> | Mécanisme réactionnel intervenant lors du testFRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique Fe(III)-TPTZ et unantioxydant (AH). | 39          |
| <b>Figure II.11</b> | Protocole d'd'évaluation du pouvoir réducteurfer  | 42          |
| <b>Figure II.12</b> | Protocole du blanchissement du $\beta$ -carotène  | 45          |
| <b>Figure II.13</b> | les souches microbiennes choisies   | 46          |

|                      |  |    |
|----------------------|--|----|
| <b>Figure II.14</b>  | Disposition des disques des trois d'extrait Et letémoin (-) et positif (+) Dans la boite                         | 48 |
| <b>Figure III.1</b>  | Histogrammes schématiques des résultatsobtenus pour l'extraction des 100 g                                       | 49 |
| <b>Figure III.2</b>  | Courbe d'étalonnage de la quercétine   | 52 |
| <b>Figure III.3</b>  | Evaluation des flavonoïdes totaux des troisextraits de plants lathyrus   | 53 |
| <b>Figure III.4</b>  | Courbe d'étalonnage de la catéchine  | 54 |
| <b>Figure III.5</b>  | Evaluation des tanins totaux des trois extraits deplants lathyrus  | 55 |
| <b>Figure III.6</b>  | Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par standard testé (Acide ascorbique) En fonction de la concentration | 56 |
| <b>Figure III.7</b>  | Activité antioxydants des trois extraits de lathyrus.  | 57 |
| <b>Figure III.8</b>  | Valeur IC50 de trois extraits des lathyrus et decomposé standard Acide Ascorbique                                | 58 |
| <b>Figure III.9</b>  | Cinétique de l'inhibition de blanchissement du $\beta$ -carotène par extraits Lathyrus et du témoinpositif BHA   | 59 |
| <b>Figure III.10</b> | Valeur de AA% des trois extraits des lathyrus et de composé standard BHA.  | 60 |
| <b>Figure III.11</b> | Pouvoir réducteur du fer de standards BHT  | 61 |
| <b>Figure III.12</b> | Pouvoir réducteur du fer des extraits de la plantelathyrus   | 62 |
| <b>Figure III.13</b> | Pouvoirs réducteurs des extraits bruts des plantslathyrus.   | 63 |



|                      |  |    |
|----------------------|--|----|
| <b>Figure III.14</b> | Activité d'E. coli                       | 65 |
| <b>Figure III.15</b> | Activité de <i>P.aeruginosese</i>        | 65 |
| <b>Figure III.16</b> | Activité de <i>Staphylococcus Aureus</i> | 65 |
| <b>Figure III.17</b> | Activité de <i>Bacillus cerous</i>       | 65 |

## *Liste des tableaux*

| <b>Tableaux</b>             | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|-----------------------------|---|-------------|
| <b>Tableau I.1</b>          | Quelque classe principale et molécules du métabolisme secondaire du genre de l'espèce <i>Lathyrus</i>   | 9           |
| <b>Tableau II.1</b>         | Absorbance en UV à 420 nm des trois extraits <i>lathyrus</i> de dosage flavonoïdes  | 33          |
| <b>Tableau II.2</b>         | Absorbance en UV à 500 nm des trois extraits <i>Lathyrus</i> de dosage tanins   | 35          |
| <b>Tableaux II.3 , II.4</b> | Absorbance en UV à 517 nm des trois extraits <i>lathyrus</i> et des antioxydants de référence lors du test de piégeage de radicale libre DPPH | 37          |
| <b>Tableau II.5</b>         | Absorbance en UV à 700 nm des solutions des trois extraits <i>lathyrus</i> et des antioxydants de référence lors du test FRAP.                | 41          |
| <b>Tableau II.6</b>         | Absorbance en UV à 490 nm des trois extraits de <i>lathyrus</i> et des antioxydants   | 44          |
| <b>Tableau III.1</b>        | Aspect couleur et rendement de différents extraits <i>lathyrus</i> .  | 49          |
| <b>Tableau III.2</b>        | Résultats de screening phytochimique  | 50          |
| <b>Tableau III.3</b>        | Teneurs en flavonoïde totaux dans les trois extraits <i>lathyrus</i>  | 52          |
| <b>Tableau III.4</b>        | Teneurs en tanins totaux dans les trois extraits des plants <i>lathyrus</i> .   | 54          |
| <b>Tableau III.5</b>        | valeur des IC <sub>50</sub> des extraits  | 57          |
| <b>Tableau III.6</b>        | Activité de blanchissement du β-carotène des extraits et de standard  | 59          |
| <b>Tableau III.7</b>        | Les valeurs d'EC <sub>50</sub> des extraits   | 63          |
| <b>Tableau III.8</b>        | Résultats de l'antibiogramme des extraits de la plante <i>lathyrus</i> et le témoin positif (gentamicine                                      | 64          |

# Table de matière

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Introduction générale ..... | 1 |
|-----------------------------|---|

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

|   |    |
|---|----|
| I. Introduction.....  | 3  |
| II. La famille fabacées.....  | 3  |
| II.2. Caractères botaniques de la famille.....                          | 3  |
| II.3. Distribution géographiques .....                                  | 4  |
| II.4. Classification des Fabacées .....                                 | 4  |
| II.5. L'intérêt thérapeutique de la famille Fabacées.....               | 5  |
| II.6. L'intérêt économique de la famille Fabacées.....                  | 5  |
| II.7. Toxicité des fabacées .....                                       | 5  |
| II.8. Les métabolites secondaires des Fabacées .....                    | 6  |
| III.1. Généralités.....   | 6  |
| III.2. Origine et histoire .....  | 7  |
| III.3. Description botanique .....                                      | 7  |
| III.4. Usage traditionnel .....   | 7  |
| III.5. Métabolites secondaires dominants du genre <i>Lathyrus</i> ..... | 8  |
| III.6. Activité biologique.....   | 21 |
| IV. Activité biologique.....  | 22 |
| IV.1.1. Les antioxydants.....   | 22 |
| IV.1.2. Classifications des antioxydants.....                           | 22 |
| IV.1.2.1. Antioxydants naturels.....                                    | 22 |
| IV.1.2.2. Antioxydants synthétiques .....                               | 22 |
| IV.1.3. Le rôle des antioxydants .....                                  | 23 |
| IV.1.4. Les radicaux libres.....  | 23 |
| IV.1.4.2. Types des radicaux libres .....                               | 24 |
| IV.1.4.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ROS) .....                     | 24 |
| IV.1.4.2.2. Espèces réactives d'azote (RNS).....                        | 24 |
| IV.1.4.3. Sources de production des radicaux libres .....               | 24 |
| IV.1.5. Le stress oxydant.....  | 24 |
| IV.2. Activité antibactérienne .....                                    | 25 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| IV.2.2. Culture des bactéries..... | 25 |
| V. Conclusion .....                | 25 |
| Référence bibliographiques         |    |

## **Chapitre II : Partie expérimentale**

|  |    |
|--|----|
| I. Introduction.....   | 26 |
| II. Etude phytochimique.....                                       | 26 |
| II.2. Préparation des extraits.....                                | 26 |
| II.3.1. Préparation des extraits .....                             | 28 |
| II.3.2. Tests de caractérisations.....                             | 29 |
| II.3.2.2. Test de flavonols et flavanones (test de Wilstater)..... | 29 |
| II.3.2.3. Test des tanins .....                                    | 29 |
| II.3.2.4. Test des alcaloïdes.....                                 | 29 |
| II.3.2.5. Test des terpènes et des stérols insaturés .....         | 30 |
| II.3.2.6. Test des saponines (indice de mousse) .....              | 31 |
| III.1. Dosage des flavonoïdes totaux .....                         | 32 |
| III.3. Dosage de tanins .....                                      | 34 |
| IV. Evaluation de l'activité antioxydante .....                    | 36 |
| IV.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH .....           | 36 |
| IV. La méthode de détermination du pouvoir réducteur FRAP .....    | 39 |
| IV.3. Méthode de blanchissement du $\beta$ -carotène.....          | 43 |
| V. Evaluation de l'activité antibactérienne.....                   | 45 |
| V.1. Stérilisation du matériel.....                                | 45 |
| V.2. Préparation des dilutions d'extraits.....                     | 46 |
| V.3. Préparation de l'inoculum .....                               | 46 |
| V.4. Ensemencement et dépôt des disques.....                       | 46 |
| VI. Conclusion.....  | 48 |
| Référence bibliographiques   |    |

## **Chapitre III : Résultats et Discussions**

|   |    |
|---|----|
| I. Etude phytochimique I.1.Rendement de l'extraction..... | 49 |
| I.2. Screening phytochimique.....                         | 50 |
| II. Résultats de l'étude quantitative.....                | 52 |
| II.2. Dosage des flavonoïdes .....                        | 52 |
| II.3. Dosage des tanins.....                              | 54 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| III.     | Résultats des tests biologiques.....                         | 56 |
| III.1.1. | Méthode de réduction du radical libre DPPH .....             | 56 |
| III.1.2. | Méthode de blanchissement du $\beta$ -carotène (BCB) .....   | 59 |
| III.1.3. | Méthode Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....                 | 61 |
| III.2.   | Résultat de l'évaluation de l'activité antibactérienne ..... | 64 |
| IV.      | Conclusion.....  | 65 |
|          | Référence bibliographique                                    |    |
|          | conclusion général.....                                      | 67 |

## 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 *Lathyrus* 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 *Lathyrus* et ses métabolites secondaires
- Le second chapitre sera consacré aux travaux expérimentaux qui comportent :

Screening phytochimique, extraction, le dosage de tanins et flavonoïdes ainsi la mise en évidence de l'activité antiradicalaire des extraits le par trois méthode (Test de DPPH, Test de la réduction du fer FRAP, Test de blanchissement du  $\beta$ -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.

## **Références bibliographiques**

[1] Sofowora A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition KARTHALA. (2010) P.22.

[2] khadhri ayda1, el mokni ridha et smiti samira composees 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*, ·( December 2018) V ,5 ,n°2.

## I. 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.

## II. La famille fabacées

### II.1. Généralités

La famille des Fabacées est l'une des plus grandes familles, avec 720-750 genres et 18 000 espèces [1]. Cette famille a été traditionnellement divisée en trois sous-familles, les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae, et comprend des herbes, des arbustes, des arbres et des plantes grimpantes distribués dans le monde entier, notamment dans les forêts tropicales humides.

Les Fabacées sont la famille la plus répandue dans les forêts tropicales humides et les forêts sèches d'Amérique et d'Afrique [2].

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leur fibre, comme combustible, pour leur bois, et leur utilisation en médecine comme source de composés thérapeutiques (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) [3].

### II.2. Caractères botaniques de la famille

La caractéristique principale et unique de cette famille est ses légumineuses qui sont le fruit de la plante. Les espèces de cette famille vont des herbes naines de la végétation arctique et alpine alpines à l'arbre massif de la forêt tropicale [4].

Les légumineuses de cette famille sont également utilisées pour économiquement pour la fixation de l'azote. Car les légumineuses sont capables de convertir l'azote atmosphérique en composés azotés utiles, qui sont utilisés pour croissance des plantes. Ceci est réalisé par des bactéries du genre *Rhizobium* présentes dans les nodules des racines. On assiste au développement de la relation symbiotique relation symbiotique entre les bactéries et les légumineuses. Cette relation permet aux plantes d'obtenir de l'azote libre et en retour les légumineuses sont capables de fournir du carbone fixe produit par les bactéries. De fournir du carbone fixe produit par la photosynthèse. La tendance des légumineuses à vivre dans un habitat



## Chapitre I : Synthèse bibliographique

semi-aéré est liée à un métabolisme exigeant en azote. On pense qu'il s'agit d'une adaptation à un habitat imprévisible [5].

### II.3. Distribution géographiques

Le principal centre de diversité des Fabacées est situé en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de diversité sont localisés également en Afrique et en Asie [6].

En général, les Fabacées sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille. Les Faboideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre. Les Caesalpinioideae occupent surtout les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, de l'Afrique et de l'Asie. Les Mimosoideae dominent les régions tropicales et subtropicales, colonisent aussi les zones arides et semi-arides de l'Afrique, de l'Amérique et de l'Australie [7].

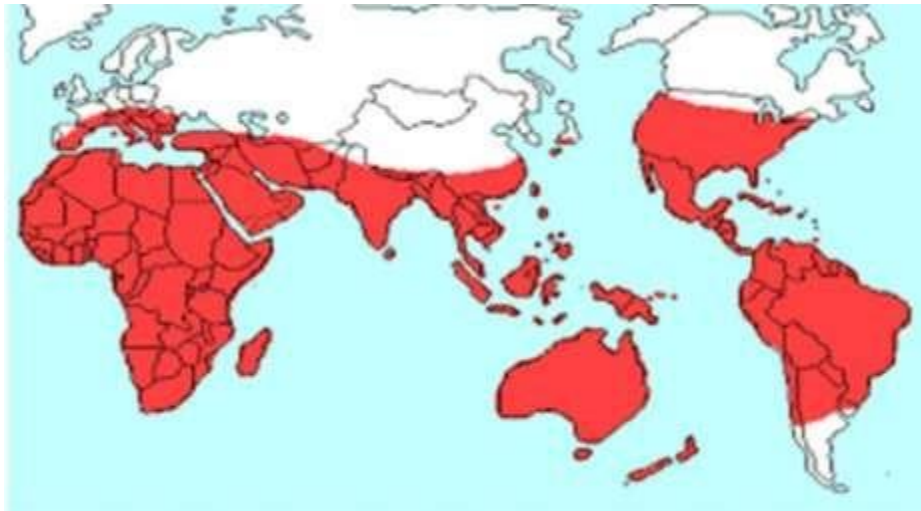


Figure I.1 : Carte de répartition géographique des Fabacées.

### II.4. Classification des Fabacées

Selon la classification précédente APGIII des angiospermes, les Fabacées ont été placés dans l'ordre des Fables. Ils comportent trois sous-familles:

- ✓ La sous- familles des Mimosoideae avec une fleur régulière.
- ✓ La sous- famille des Caesalpinioideae avec une fleur pseudo-papilionacée.
- ✓ La sous- famille des Papilionoideae ou Faboideae avec une fleur typique en papillon.

La nouvelle classification selon APGL de la famille Fabacées montre leur division en six sous-familles [8] .

- ✓ La sous familles des Cercidoideae avec 12 genres et 335 espèces .

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

---

- ✓ La sous familles des Detarioideae avec 84 genres et 760 espèces.
- ✓ La sous familles des Duparquetioideae avec 1 genre et 1 espèce.
- ✓ La sous familles des Dialioideae avec 17 genres et 85 espèces.
- ✓ La sous familles des Caesalpinioideae avec 148 genres et 4400 espèces et Papilionoidea avec 503 genres et 14000 espèces.

### **II.5. L'intérêt thérapeutique de la famille Fabacées**

Plusieurs espèces de la famille Fabacées ont été utilisées pendant de nombreuses années dans la 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 [9].

### **II.6. L'intérêt économique de la famille Fabacées**

L'importance économique de ces espèces est notable. En effet, outre des plantes alimentaires et fourragères d'importance, l'on trouve des bois précieux, des sources de pigments et de tanins, et des drogues utilisées en thérapeutique. La production et la consommation des « légumes » sont très développées dans le monde entier. Par exemple, le pois *Pisum*, le haricot *Phaseolus*, la lentille *Lens*, la fève *Vicia* [9].

Les industries agro-alimentaires sont, elles aussi, de grosses consommatrices. Comme pour le soja, *Glycine max*, qui est employé sous forme d'huile, lécithine en tant qu'émulsifiant, concentrés protéiques et tourteaux. Ou encore l'arachide, *Arrachis hypogaea*, sous forme d'huile et produits dérivés [9].

L'intérêt alimentaire découle du fait que les fabacées constituent une source très importante de protéines et lipides et rentrent dans l'alimentation humaine et animale [10,11] : tels que le pois (*Pisum*), la fève (*Faba*), le haricot.

(*Phoscolus*), le pois chiche (*Cicer*) et les Lentilles (*Ervum*), ou encore le soja et les arachides.

### **II.7. Toxicité des fabacées**

D'après Ati (2018) [12], Un nombre non négligeable de fabacées est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses. Après avoir cité quelques intérêts thérapeutiques et économiques, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

- ❖ Des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans des espaces de genre *Crotalaria retusa*, suite à la consommation de céréales contaminées par les graines, ou suite à l'utilisation de ces plantes pour soigner des troubles grippaux ou asthmatiques.
- ❖ Certains acides aminés non constitutifs, nombreux dans les fabacées, et qui sont fournis par les bactéries fixatrices d'azote, perturbent gravement les chaînes métaboliques, provoquant les troubles de lathyrisme, qui se produisent à la suite de la consommation d'espèces du genre *Lathyrus*. Cela se traduit chez l'homme par une paralysie progressive des muscles. De véritables « épidémies » ont eu lieu lors de périodes de famines en France en 1700-1701 puis en 1856, lorsque la farine de « jarousse » (*Lathyrus sativus*) a remplacé la farine de blé .
- ❖ Maladie de favisme, maladie génétique. Affectant les populations après absorption de fèves. Graines de vicia faba. Se traduisant par des troubles neurologiques et hématologiques. Cela est dû au manque d'une enzyme. La glucose-6-phosphate-déshydrogénase qui joue un rôle de détoxification.

### II.8. Les métabolites secondaires des Fabacées

En raison des nombreuses utilisations pratiques, la famille a été largement étudiée pour ses métabolites secondaires. La recherche bibliographique réalisée sur cet axe montre que la majorité d'études Photochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des fabacées confirme la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites Secondaires tels que : les alcaloïdes [13,14] les coumarines [15] les composés phénoliques de type flavonique et isoflavonique [16,17] et en petites quantités les Stéroïdes [17] et les saponosides [18].

Parmi les 700 genres de la famille de Fabacées en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espaces [19], pour notre part nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Lathyrus* d'après la bibliographie, ce genre montre une richesse en composés phénolique.

### III. Le genre *Lathyrus*

#### III.1. Généralités

Le nom scientifique *Lathyrus* désignait en latin (lathyros) et en grec (lathyros et lathyron) une plante de la famille des Légumineuses. *Lathyrus* est un genre de plantes herbacées de, C'est le

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

genre des gesses (nom vernaculaire d'origine incertaine), même si certaines espèces sont nommées « pois » dans le langage courant (dont les pois-fleur et pois de senteur).

Ce genre est proche des genres *Vicia* (les vesces et fèves) et *Pisum* (les petits pois). Il comprend une centaine d'espèces. Ce sont des plantes annuelles ou vivaces grimpantes à fleurs papilionacées.

### III.2. Origine et histoire

Le genre *Lathyrus* (Légumineuse, Fabaceae), occupe une aire importante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord ainsi que dans les montagnes d'Afrique Tropicale [20]. Sur les 80 espèces dénombrées dans le monde, 61 sont présentes dans les pays méditerranéens et 22 sont exclusivement méditerranéennes [21]. Cette large aire de distribution est due à la tolérance des plantes de ce genre aux conditions environnementales défavorables telles la sécheresse et l'excès d'eau [22]. Les *Lathyrus* présentent également une tolérance aux facteurs abiotiques (les pH extrêmes, les sols pauvres) et aux facteurs biotiques comme la rouille et les virus [23].

### III.3. Description botanique

L'habitude de ces plantes peut être montée ou herbacé ; cycle de vie annuel ou pérenne. Ce genre, étant très vaste, il n'a pas de forme biologique répandue : nous pouvons le trouver géophytes (G), les deux hémicryptophytes (H) que thérophytes (T).

- Les racines peuvent être tubercule ou secondaire par rhizome.
- Les tige sont normalement cohérentes et herbacées gracieuses ; mais dans certains cas, peut être ailée ou une section plate ; souvent il y a un rhizome sous-sol.
- Les feuilles sont presque toujours pinnates composées avec peu de nombreux segments et grand ; tandis que le rachis facilement se termine dans une feuille cirrus apicale (simple ou parfois ramifiée). Les lobes de feuilles sont ovales en lancéolé linéaire, parfois avec l'apex aristé. Facilement la base du pétiole il y a des copies de stipules (Également de taille importante) qui sont souvent semisagittées.
- La floraison est un racème pédonculé plus ou moins long. Parfois, les fleurs sont retombantes. La couleur varie du vin rouge, rose, pourpre, violet, bleu, blanc et jaune.
- Les fleurs sont hermaphrodites, pentamères (calice et corolle à 5 parties) et zygomorphes.

### III.4. Usage traditionnel

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

Les *Lathyrus* sont des légumineuses à grosses graines utilisées à plusieurs fins, pour l'alimentation humaine et animale et comme plantes d'ornement. Notre étude est une contribution à la connaissance et à la valorisation de 34 espèces provenant de différentes régions du globe, par l'étude du comportement et de la richesse en protéines. Elle permettra également une meilleure connaissance de nos ressources phylogénétiques en vue d'une meilleure valorisation de ces dernières. Les résultats obtenus permettent de conclure, que pour la majorité des espèces, il existe un polymorphisme inter et intra spécifique pour l'ensemble des caractères étudiés. Par contre les espèces : *L. hierosolymitanus*, *L. marmoratus*, *L. nissolia*, *L. pseudocicera*, et *L. sphaericus*, ne montrent cependant aucune différence significative entre leur population pour l'ensemble des caractères et ce en raison du nombre réduit de populations étudiées. Le comportement des populations locales de *L. sativus*, est d'une façon générale très proche de la moyenne de l'espèce. Elles présentent une teneur moyenne en protéines très intéressante de plus de 28% et une importante variabilité intra et inter population est enregistrée et confirmée par les profils protéiques.

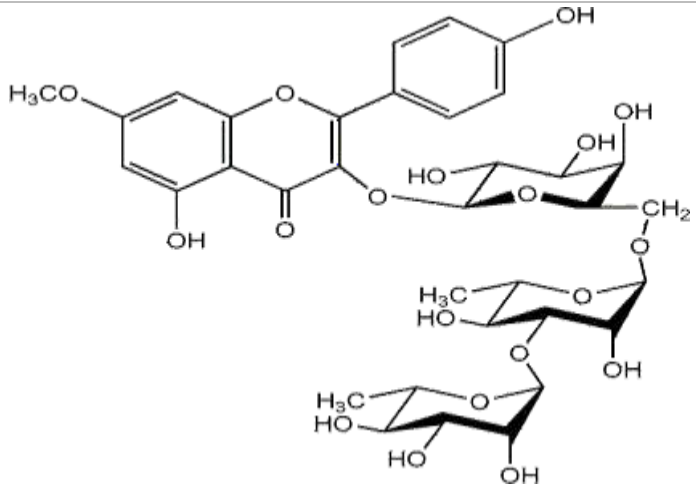
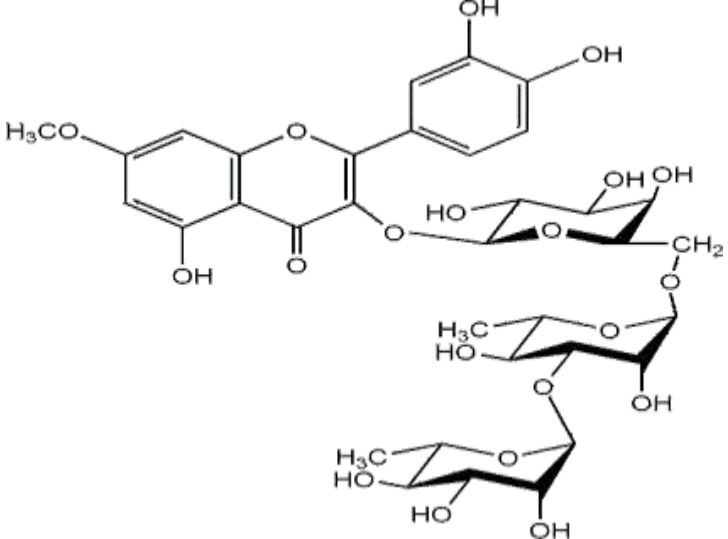
De nombreuses gesses ont été utilisées comme plante de survie grâce à leurs feuilles (cruées, elles ont un goût de petit pois prononcé, d'où leur mélange possible avec d'autres salades sauvages ; cuites pour faire des soupes), leurs graines (consommées crues lorsqu'elles sont très jeunes, ou cuites, bouillies, elles ont le goût de lentilles), et, pour la gesse tubéreuse, le tubercule dont le goût rappelle les châtaignes. Les jeunes pousses et les jeunes gousses de certaines espèces (*L. latifolius*, *L. japonicus*) sont également comestibles [24].

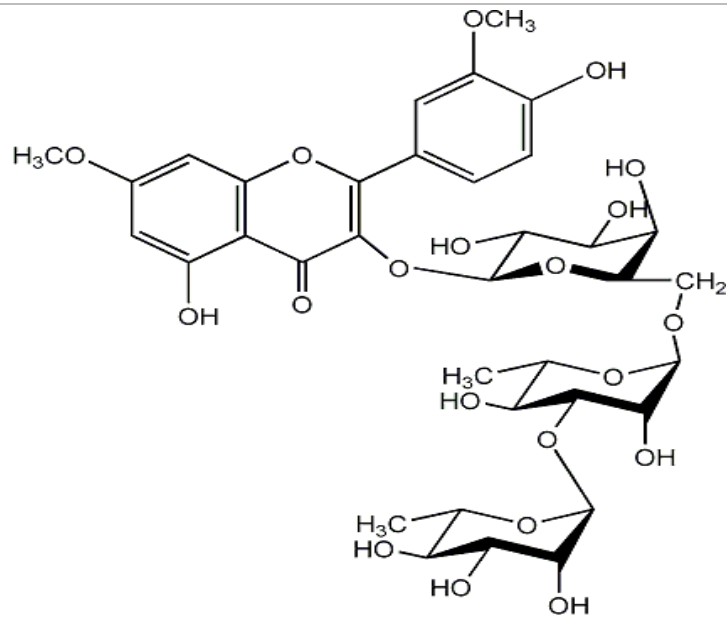
### **III.5. Métabolites secondaires dominants du genre *Lathyrus***

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Lathyrus*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes les flavonoïdes, les isoflavonoïdes qui sont biologiquement actifs [25], ainsi que les saponosides [26].

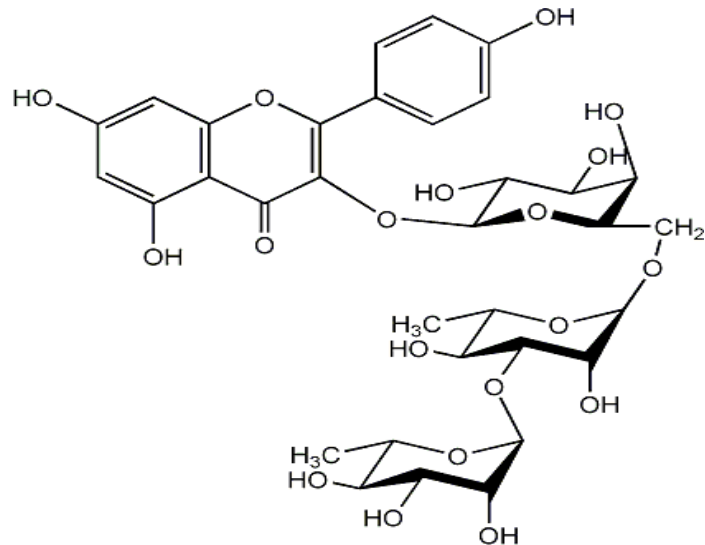
## Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.1: Quelques classes principales et molécules du métabolisme secondaire du genre de l'espèce *Lathyrus*

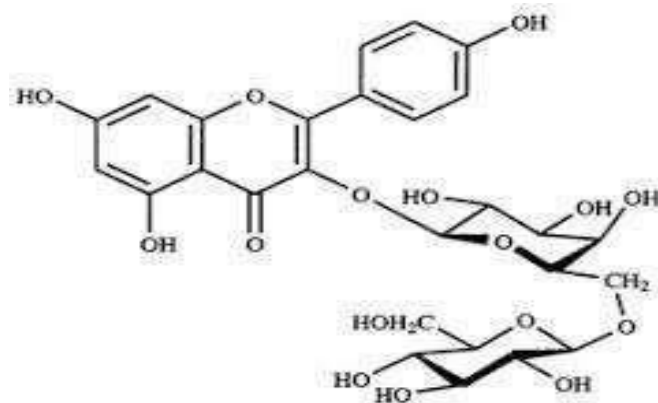
| Espèces           | Composés isolés   | Référence |
|-------------------|---|-----------|
| <i>L. armenus</i> |  <p><b>Rhamnocitrin-3-O-rhamnoside</b></p>  <p><b>Rhamnetin-3-O-rhamnoside</b></p> | [27]      |



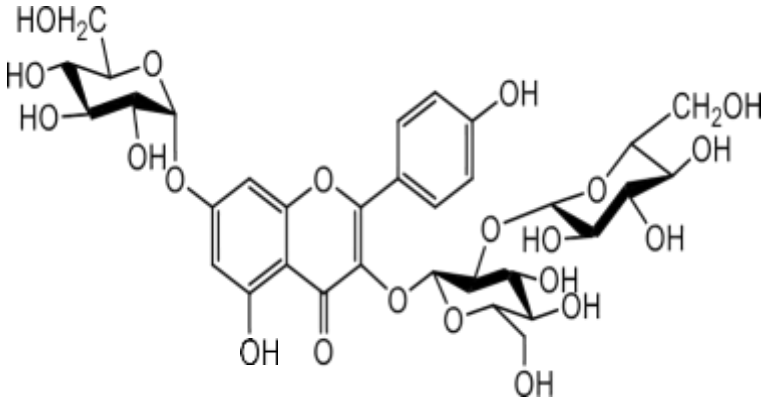
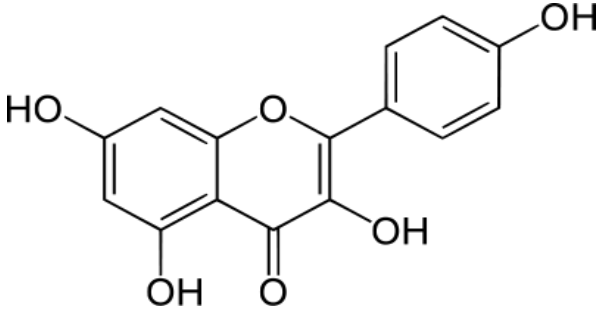
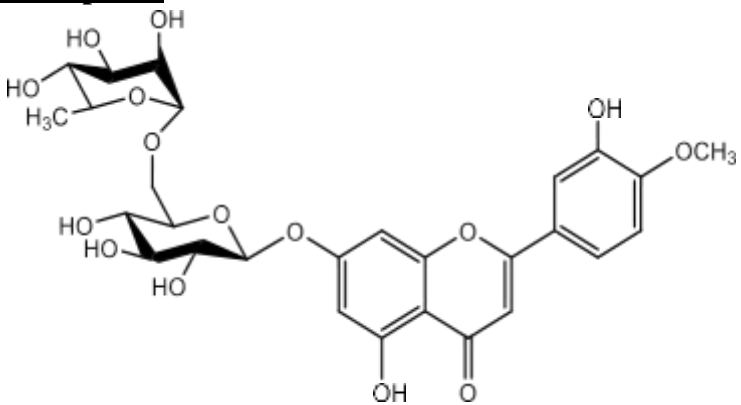
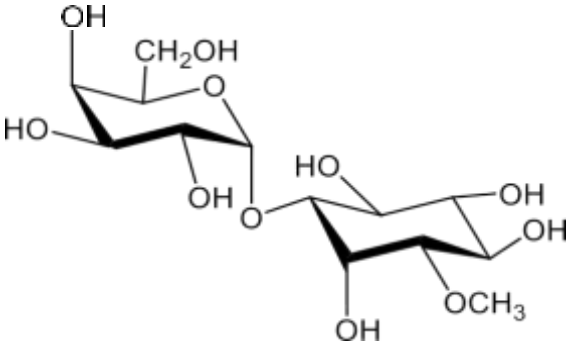
**Rhamnazin-3-O-rhamnoside**



**Kaempferol-3-O-rhamnoside**

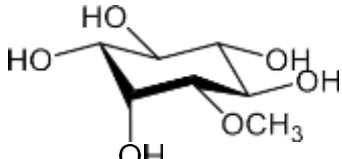
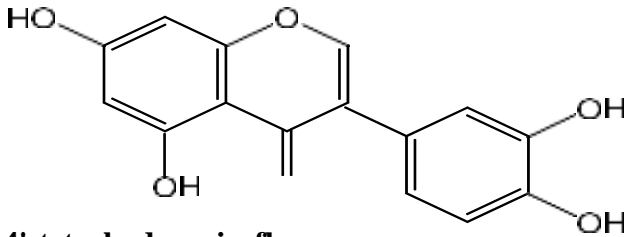
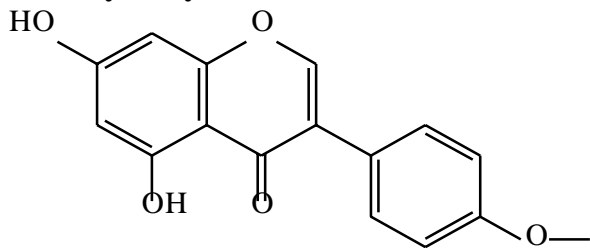
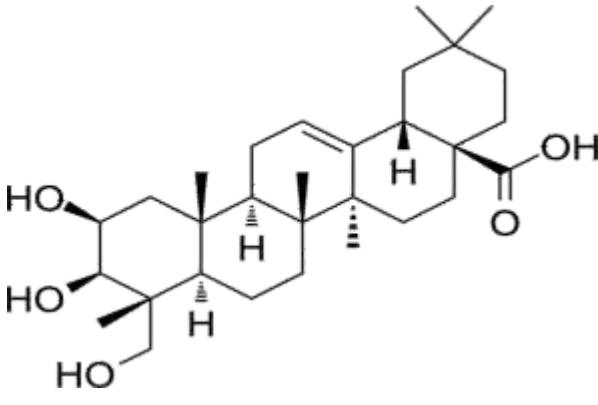
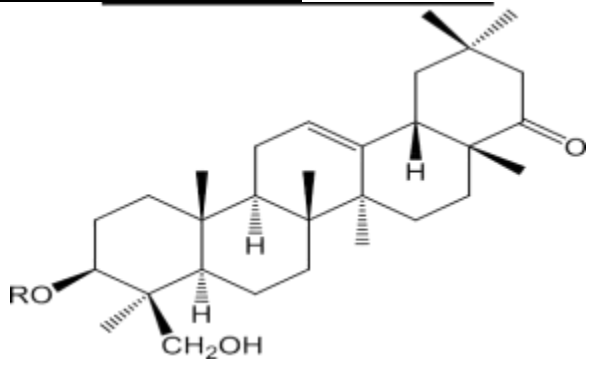


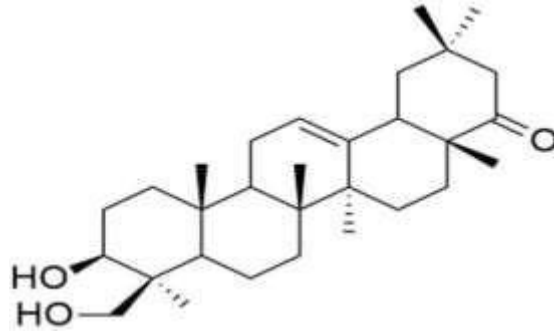
**Kaempferol-3-O-glucosyl (1→2) rhamnoside**

|                           |  |                         |
|---------------------------|--|-------------------------|
|                           |  <p><b><u>Kaempferol 3-sophoroside-7-glucoside</u></b></p>   |                         |
| <p><i>L. odoratus</i></p> |  <p><b><u>Kaempferol</u></b></p>  <p><b>Diosmine</b></p>  <p><b><u><math>\alpha</math>-D-galactopyranosyl-(1<math>\rightarrow</math>3)-1-O-methyl-1d-myo-inositol</u></b></p> | <p>[28]</p> <p>[29]</p> |

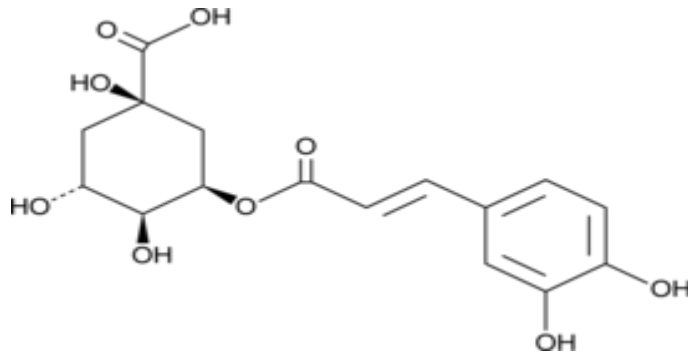


## Chapitre I : Synthèse bibliographique

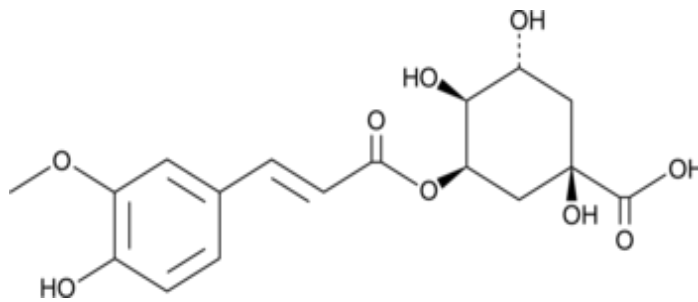
|                      |   |      |
|----------------------|---|------|
|                      |  <p><b><u>1D-1-O-methyl-myo-inositol</u></b></p>   |      |
| <i>L. incurvus.</i>  |  <p><b><u>5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone</u></b></p>  <p><b><u>5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone</u></b></p>     | [30] |
| <i>L. pratensis.</i> |  <p><b><u>dHex-Hex-HexA-Bayogenine</u></b></p>  <p><b><u>R= 3-Rha(1→2)-Gal(1→2)-GlcA SovasapogenolE</u></b></p> | [31] |



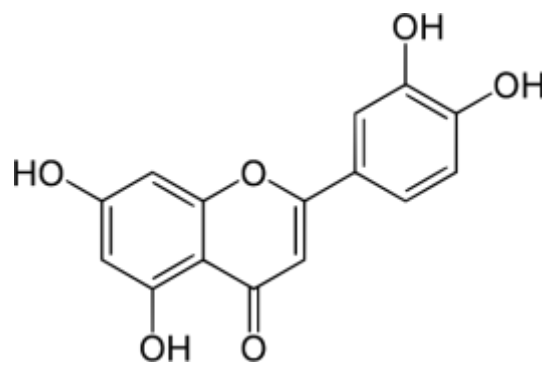
**dHex-Hex-HexA-Soyasapogenol E**



**Acide Caffeoylquinique**

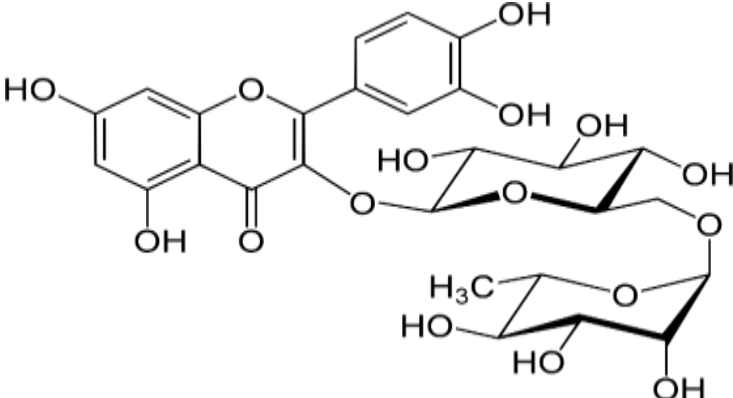
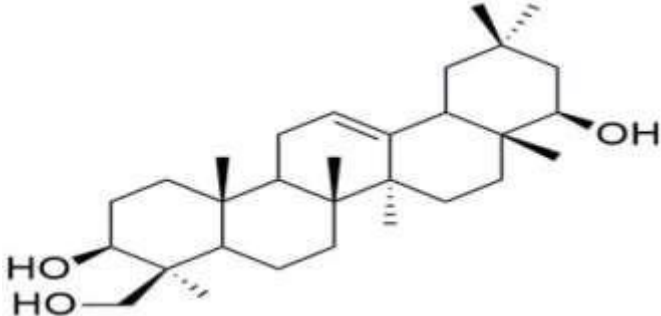
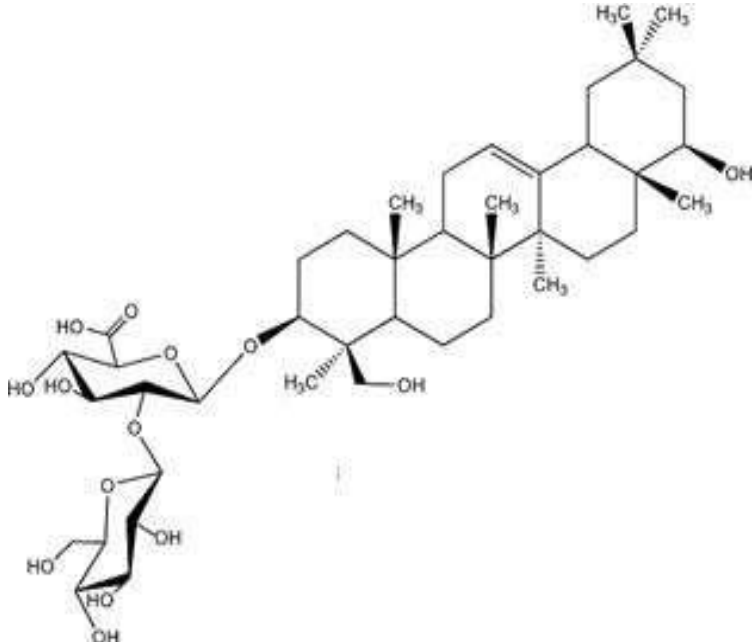


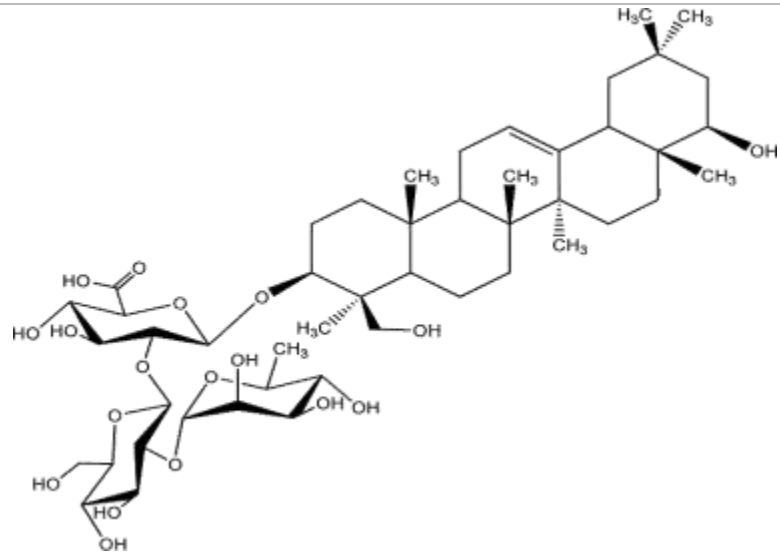
**Acide 5-Feruloylquinique**



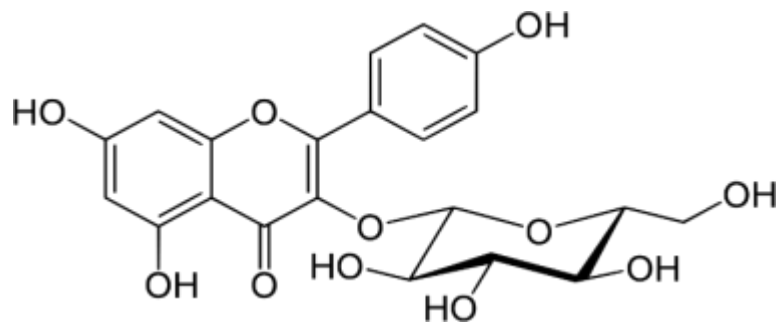
**Luteoline**

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

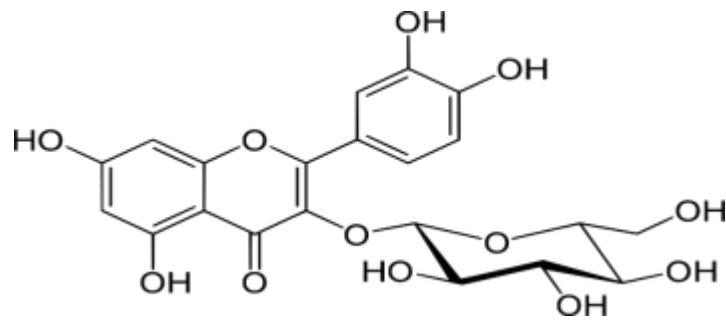
|                     |   |      |
|---------------------|---|------|
|                     |  <p>The structure of Rutine is a flavonoid glycoside. It consists of a flavanone core (quercetin) where the 3-OH group is glycosylated with a disaccharide of rhamnose and galactose. The rhamnose is attached to the galactose at the 6-position, and the galactose is attached to the flavanone at the 3-position.</p>  |      |
| <i>L. japonicus</i> | <p><b><u>Rutine</u></b></p>  <p>The structure of Soyasapogenol B is a steroidal saponin aglycone. It features a steroid nucleus with a double bond at the C5-C6 position and several methyl groups at C10, C13, C14, and C15. It has hydroxyl groups at C3 and C14.</p> <p><b><u>Soyasapogenol B</u></b></p>  <p>The structure of Azukisaponine II is a steroidal saponin. It consists of a steroid nucleus with a double bond at the C5-C6 position and several methyl groups at C10, C13, C14, and C15. It has hydroxyl groups at C3 and C14. The C3-OH is glycosylated with a disaccharide of galactose and rhamnose. The galactose is attached to the steroid at the 3-position, and the rhamnose is attached to the galactose at the 6-position.</p> <p><b><u>Azukisaponine II</u></b></p> | [32] |



**Azukisaponine V**

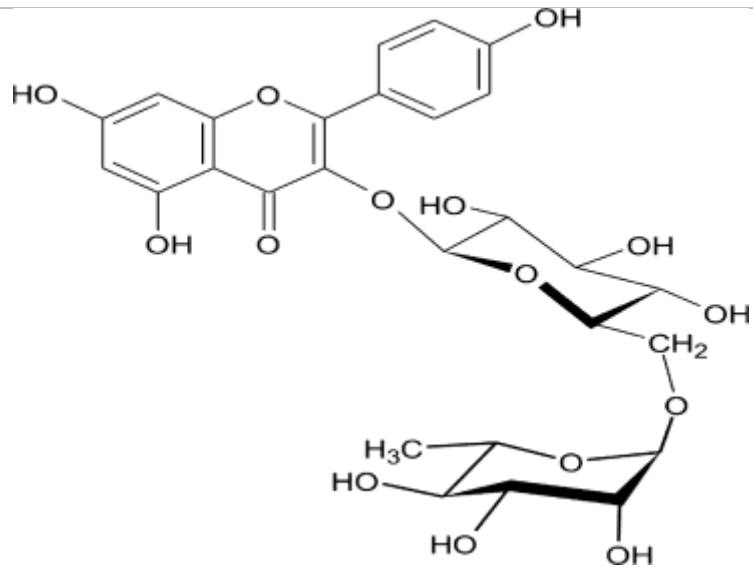


**Astragaline**

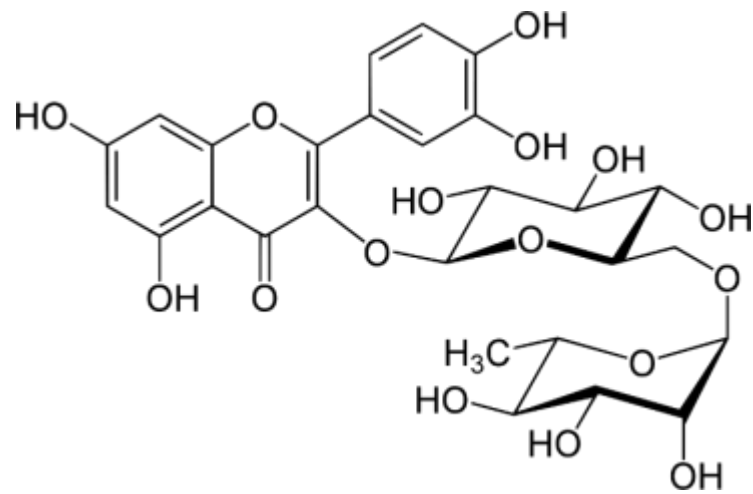


**Isoquercitrine**

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

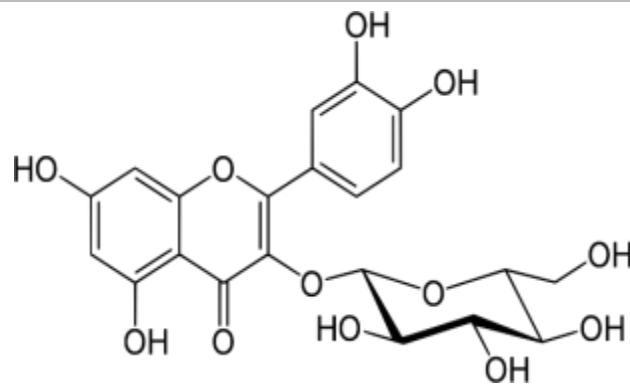


**Kaempferol 3-O-rutinoside**



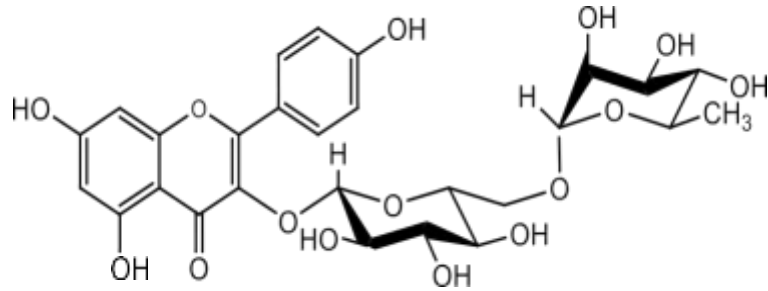
**Rutine**

*L. davidii*

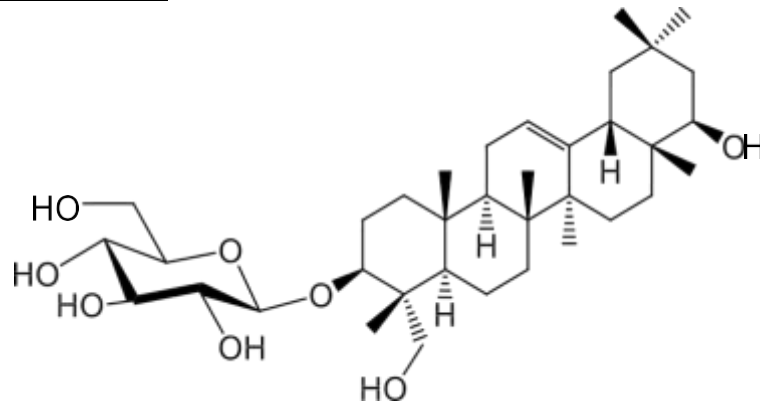


**Isoquercitrine**

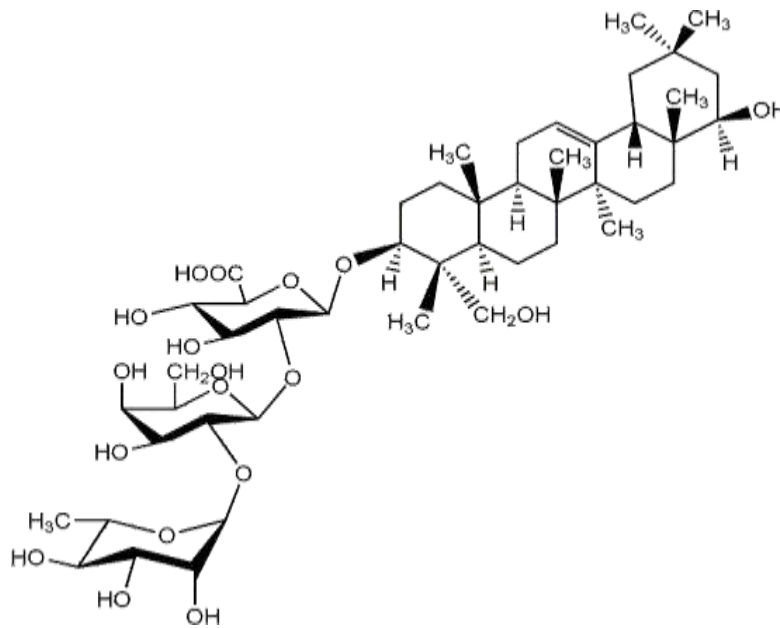
[33]



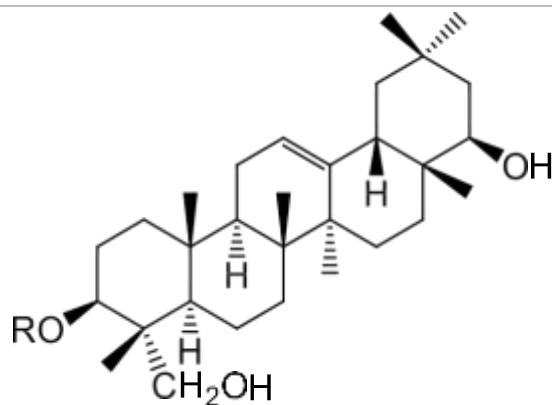
**Nicotiflorine**



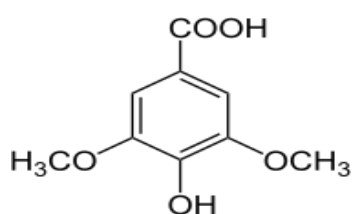
**Soyasapogenol B 3-O-β-D-glucuronopyranoside.**



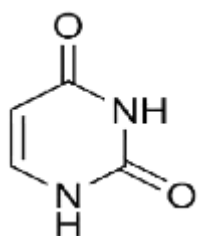
**Soyasaponin II**



**Soyasaponin V, R= 3-Glu(1→2)-Gal(1→2)-glca**



**Acide syringique**

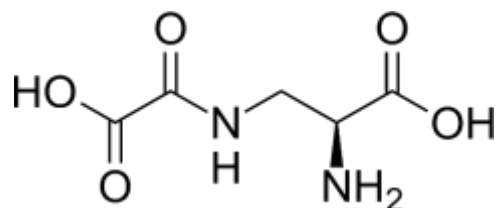


**Uracil**



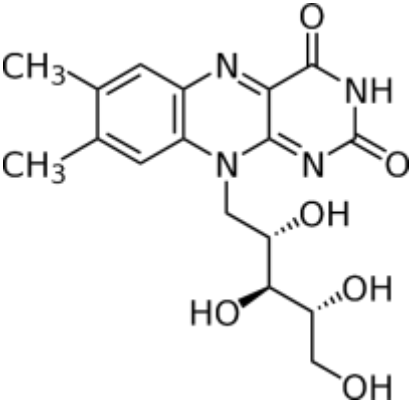
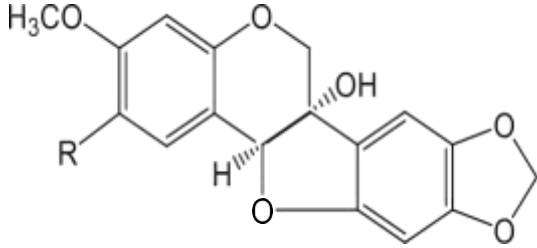
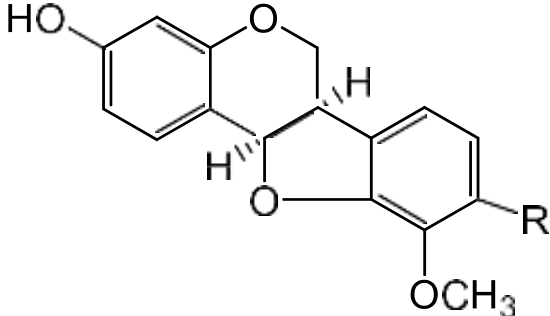
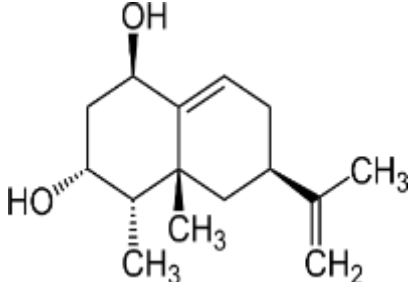
**n-hexacosanol**

*L. sativus*

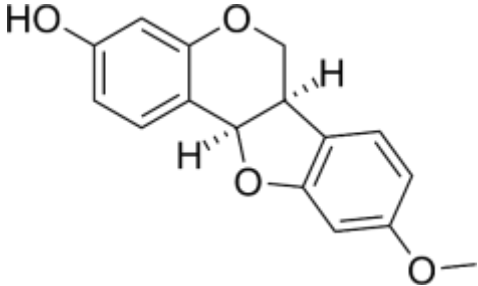
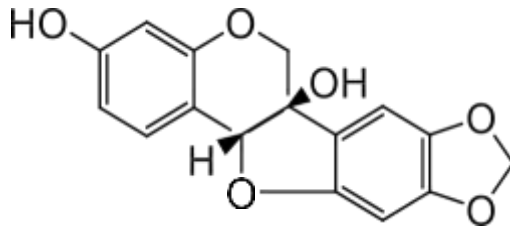
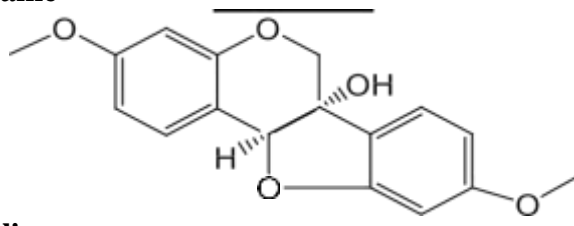
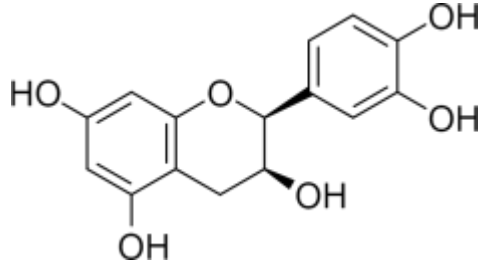
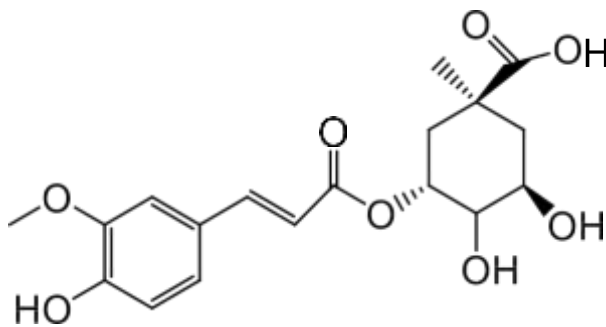


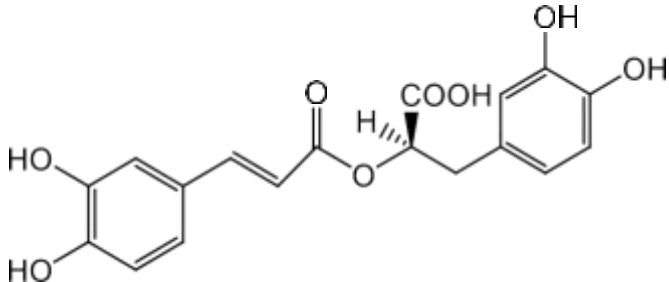
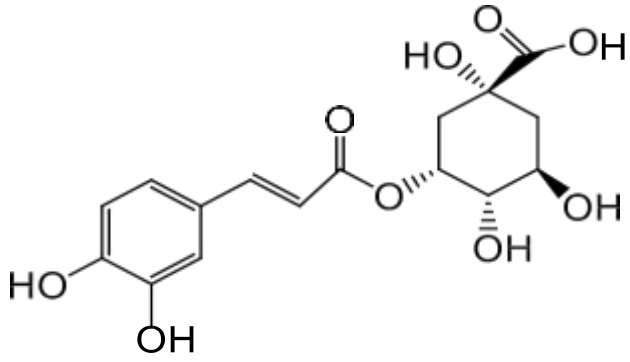
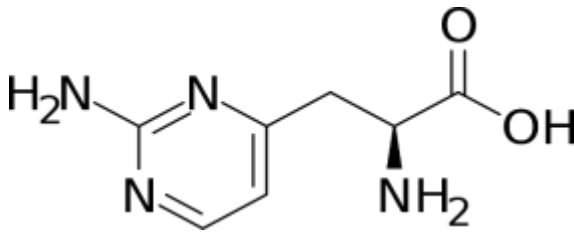
**Acide oxalyl diamine propionique**

[34]

|  |  |             |
|--|--|-------------|
|  |  <p><b>Riboflavine</b></p>   |             |
|  |  <p><b>3-methoxy-6a-hydroxy-8,9 Methylenedioxypterocarpane R=H</b><br/> <b>2,3-dimethoxy-6a-hydroxy-8,9 Methylenedioxypterocarpane R=OCH<sub>3</sub></b></p>  <p><b><u>Nissolin</u>, R=OH</b><br/> <b><u>9-O-methyl ether (methylnissolin)</u>, R=OCH<sub>3</sub></b></p>  <p><b><u>Phytoalexine</u></b></p> | <p>[35]</p> |



|                                    |  |             |
|------------------------------------|--|-------------|
|                                    |  <p><b><u>Medicarpine</u></b></p>  <p><b>Maackiaine</b></p>  <p><b><u>Variabiline</u></b></p> |             |
| <p><i>L.<br/>Czeczottianus</i></p> |  <p><b><u>Epicatechine</u></b></p>  <p><b>Acide Feruloylquinique</b></p>   | <p>[36]</p> |

|                             |  |             |
|-----------------------------|--|-------------|
|                             |  <p style="text-align: center;"><b><u>Acide rosmarinique</u></b></p>         |             |
| <p><i>L. tingitanus</i></p> |  <p style="text-align: center;"><b><u>Acide 5-O-caffeoylquinique</u></b></p> | <p>[37]</p> |
|                             |  <p style="text-align: center;"><b><u>Lathyrine</u></b></p>                |             |

### III.6. Activité biologique

En plus de l'utilisation des Fabaceae et le genre *Lathyrus* en pharmacopées traditionnelles, plusieurs études ont été effectuées pour valider leurs usages traditionnels et rechercher des nouvelles potentialités biologiques. On cite comme exemple l'espèce *Lathyrus sativus* L. Activité Analgésique et antipyrétique [38] effet cardioprotective,[39] activité hypoglycémique et Antidiabetique [40,41], Effet nerveux [42] , activité antioxydante [43,44,45].

### **IV. Activité biologique**

#### **IV.1. Activité antiradicalaire**

##### **IV.1.1. Les antioxydants**

Les antioxydants sont définis par HALLIWELL comme « toute substance qui en faible Concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire [46].

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, Chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont considérés comme éliminateurs des radicaux libres [47].

##### **IV.1.2. Classifications des antioxydants**

Il existe de nombreuses sources d'antioxydants tant fabriqué par l'organisme que ceux qui sont fournis par les aliments ou ceux de synthèse. Ils sont classés:

###### **IV.1.2.1. Antioxydants naturels**

Les antioxydants naturels sont présents dans presque toute les plantes, tous les microorganismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturels comprend l'acide ascorbique, la vitamine E, les composés phénoliques, les flavonoïdes... etc. [48].

Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont Également une capacité de lier les acides gras libres [49].

###### **IV.1.2.2. Antioxydants synthétiques**

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir des composants chimiques. Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité. Les antioxydants synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants naturels des aliments n'ont pas encore été testés [50].

### IV.1.3. Le rôle des antioxydants

Les antioxydants permettent de diminuer le risque de survenue de nombreuses pathologies. Les antioxydants permettent de protéger notre organisme contre les radicaux libres et ainsi, Ils permettent la prévention de nombreuses maladies.

Les antioxydants sont les remèdes naturels qui permettent de rompre la chaîne de formation des radicaux libres dans l'organisme et de limiter ainsi les effets de vieillissement et dégénération des cellules, engendrés par ces substances. Le corps est capable de produire lui-même ses propres antioxydants, mais quand le taux de radicaux libres est élevé, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'antioxydants dans l'organisme. Pour cela, il faut intégrer des aliments aux vertus antioxydants dans le régime alimentaire. Les antioxydants peuvent être apportés par des fruits comme les agrumes, les raisins, les pommes et des légumes comme les carottes, la tomate...etc. [51].

### IV.1.4. Les radicaux libres

#### IV.1.4.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non Appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte.

Ces molécules se lient rapidement aux molécules non radicalaires à proximité résultant généralement en la formation de nouveaux radicaux [52].

Il peut se former soit par la réaction redox (gain ou perte d'un ou de plusieurs Électrons), soit par la fission homolytique (rupture de la liaison covalente par laquelle chaque Atome possède un électron) [53].

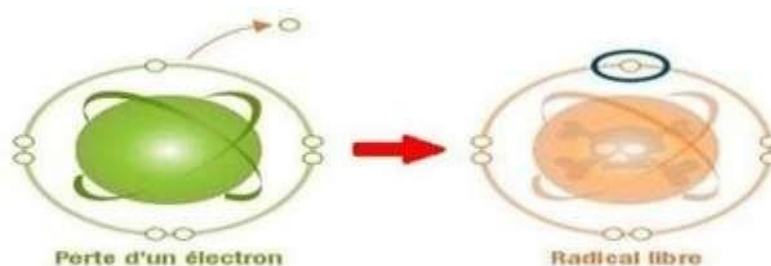


Figure I.2 : formation des radicaux libre.

### IV.1.4.2. Types des radicaux libres

Les espèces réactives (pouvant être de nature radicalaire ou non) se divisent en deux Catégories principales : d'une part les ROS Espèces réactives d'oxygène et d'autre part les espèces réactives de l'azote RNS [54].

#### IV.1.4.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ROS)

Parmi les espèces radicalaires les plus actives se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron tels l'anion super oxyde ( $\bullet\text{O}=\text{O}^-$ ) et le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) ou non radicalaires tel le super oxyde d'hydrogène ( $\text{HO}=\text{OH}$ ) et L'oxygène singlet ( $\bullet\text{O}=\text{O}$ ), le Hypochloreux HOCL [55].

#### IV.1.4.2.2. Espèces réactives d'azote (RNS)

L'espèce réactive de l'azote est un agent vasodilatateur. Il est synthétisé par les NO synthèses (NOS). Le monoxyde d'azote  $\text{NO}\bullet$  est un radical peu réactif mais peut se lier aux radicaux libres oxygénés ROS pour former des molécules plus toxiques comme les peroxydinitrite ( $\text{O}=\text{N}=\text{O}=\text{O}-$ ) [56].

### IV.1.4.3. Sources de production des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose limitée.

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents [57].

### IV.1.5. Le stress oxydant

Le stress oxydant appelé aussi le stress oxydatif, se définit comme étant un déséquilibre Profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydants de L'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles [58].

Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne Dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydants (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour éliminer [59].

### IV.2. Activité antibactérienne

#### IV.2.1. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires, classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, et protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bactérie) et bactéries (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bactérie.

Ces dernières ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au Microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (*Cocci*), en bâtonnet (*bacilles*), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [60].

#### IV.2.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement, pour cultiver les bactéries, des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viande. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et de se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [60,61].

### V. Conclusion

La synthèse de toutes les données bibliographiques concernant la famille Fabacée et le genre *Lathyrus* nous encourage à réaliser une étude phytochimique et biologique d'une plante endémique appartenant à cette grande famille.

## Référence bibliographique

- [1] Wink M, Mohamed GIA. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. *Bioch. System. Ecol.* 2003;31(8):897-917.
- [2] Burham, R. J., Johnson, K.R. South American Pleobotany and the Origins of neotropical rain forests. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B.* 359: 1595-1610. 2004.
- [3] Wojciechowski M.F., Lavin M., Sanderson M.J. A. (2004). Phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany.* (11). 1846-2004.
- [4] Harborne, J., *Phytochemistry of the Leguminosae. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, eds Bisby, FA et al. London: Chapman & Hall, 1994.
- [5] Patel, S. and D.B. Shah, Phylogeny in Few Species of Leguminosae Family Based on *matK* Sequence. *Computational Molecular Biology*, 2014. 4(4.)
- [6] Ndayishimiye J., 2011. Diversité, endémisme, géographie et conservation des Fabaceae de l'Afrique centrale. Thèse de doctorat, université libre de Bruxelles (université d'Europe), pp. 12-15.
- [7] Ndayishimiye J., Stoffelen P., Bigendako M. J., Lejoly J., De Canniere C., Bogaert J., 2013 Détermination des zones potentielles de conservation de la biodiversité : un aperçu sur l'approche méthodologique basée sur la diversité spécifique et les espèces endémiques. *Bulletin scientifique de l'Institut national pour l'environnement et la conservation de la nature (INECN)*, 11 : 20-30.
- [8] Moyse.H.R.R. (1967) *Précis de Matière Médicale.* 239-243, 335-336, 346.
- [9] Demir S., Turan I., Misir S., Aliyazicioglu Y. (2019). Selective cytotoxic Effect of *Dorycnium pentaphyllum* extract on Human Breast, liver, and lung cancer cells. *Ksutarimve Doga Derg*, 22(3), pp. 473-479.
- [10] Petit A.-C. (2011). Toxicité et utilisation de quelques Fabaceae alimentaires et médicinales. Thèse de doctorat, université Henri Poincaré-NANCY-I, pp. 222.
- [11] J.L Guignard, (1994). *Abrege de botanique*, 9eme edition, editeur Masson, 276.
- [12] Ati S., 2018. Etude biologique et phytochimique de trois genres endémiques en Algérie : « *Genista numidica* spach, *Genista ferox* poiret et *Genista tricuspidata* Desf ». thèse de doctorat, université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 9-108.
- [13] E.P. Journet, (2001). *Ecole thématique Biologie végétale.*

- [14] S.W. Pelletier, (1983). Alkaloids. Chemical and biological perspectives. Edition JohnWiley,New York
- [15] L. Rufini, and G. Sampaolo, (1977). Plants Off. Aromi.Saponi., Cosmetol. Aerosol., 59, pp. 9-32 et 64-75.
- [16] F. C. Ficher, H. Van Doorne, M. I. Lim, et A. B. Svendsen, (1976). Phytochemistry, 30, pp. 1078-1079.
- [17] P. Matis, etW. Mayer, (1979). Zur Geschichte der «klassischen" Antikoagulantien Heparinund Dicumarol, Medizinische Welt. 30 pp. 845-848.
- [18] I. Chihiro, I. Masataka, K. Tetsufumi, R. Nijisiri, M. Terue, T. Harukumi, N. Hoyoku andF.Hirochi, (2003). Phytochemistry, 64, pp.1265-1268.
- [19] A.R. Billa, F. Flammini, G. Fammini, L Morelli, and A. Masili, (1993). Phytochemistry, 34, (1), pp. 847-852.
- [20] Chtourou-Ghorbel, N., B. Lauga, N. Ben Brahim, D. Combes and M. Marrakchi. 2002a. Genetic variation analysis in the genus Lathyrus using RAPD markers. Genetic Research and Crop Evolution 49: 365–372.
- [21] Hamilton R.S., Hughes S.J., Maxted N. 2001. Ex Situ conservation of forage legumes. In The Genetic Diversity of Legumes species in the Mediterranean, Maxted and Bennett. Kluwer Academic Press. 263-291.
- [22] Tyagi A., Santha I.M., Mehta S.L. 1995. Molecular response to water stress in Lathyrussativus. J Plant Bioche. Biotech., 4: 47-49.
- [23] Chtourou-Ghorbel, N., B. Lauga, N. Ben Brahim, D. Combes, and M. Marrakchi. 2002b. Genetic variation analysis in the genus Lathyrus using (RFLP) markers. Journal of Genetic.
- [24] François Couplan, Le régal végétal. Plantes sauvages comestibles, éditions Ellebore, 2009, p. 212-214.
- [25] Ikramov M. T., Mavasheva F. A., Batirov É. Kh., Malikov .1990. Chemistry of Natural Compounds volume 26, pages225–226.
- [26] Noor Afshan Khan .2011. Two antifungal active triterpenoid saponins from the seeds of Lathyrus plants . Natural Product Research Vol. 25, No. 18, October 2011, 1687–1694.
- [27] A Heydari ,H, Bahadir Acikara ,O, Tekin M ; Saltan Iscan G .(2020).Isolation and Identification of flavonol Glycosides from Lathyrus armenus (Boiss. & Huet) Iranian Journal of Pharmaceutical Research 19 (2): 291-297.
- [28] D. Harborne, J. B. (1965) Characterisation of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolysis. Phytochemistry4, 107-120.



- [29] C. Obendorf R L, McInnis C. E., Horbowicz M, Keresztes I, Lahuta L. B.2005 .Molecularstructure of lathyritol, a galactosylbornesitol from *Lathyrus odoratus* seeds, by NMR. *Carbohydrate Research* 340 . 1441–1446
- [30] E Ranabahu P , Harborne JB. 1993 The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparisonof flavonoid patterns within the tribe Viciae. *Biochem. Syst. Ecol.* 21: 715-722.
- [31] B. Llorent-Martinez E. J., Ortega-Barrales. P, Zengin .G, Uysal .S, Ceylan .R, Guler .G.O, Mocan .A, Aktumsek .A .(2016). *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities Mocan and A. Aktumsek, RSC Adv ,.
- [32] F Kang, S.S., Ahn, B.T., Kim, J.S., Bae, K., 1998. *Lathyrus saponin*, a new trisaccharide glycoside from *Lathyrus japonicus*. *Journal of Natural Products* 61, 299–300.
- [33] GPark S. Y, Kim J.S, Lee S. Y, Bae K.H, Kang S.S .2008., Chemical Constituents of *Lathyrus davidii* .*Natural Product Sciences* 14(4) : 281-288.
- [34] H RAO S. L. N., ADIGA P. R., SARM P. S., 1964. The Isolation and Characterization of p-N-Oxalyl-L-a,p-Diaminopropionic Acid: A Neurotoxin from the Seeds of *Lathyrus sativus*”Vol. 3, No. 3, March, *Biochemistry*.
- [35] Ingham J L., Markham K.R. 1982 .Isolation and Identification of Lathycarpin, a New Pterocarpan Phytoalexin from *Lathyrus sativus* *Zeitschrift für Naturforschung* 724 726.
- [36] J]Llorent-Martínez E. J., Zengin G., Fernández-de Córdova ML, ,Bender O, Atalay A, Ceylan R, Mollica A, Mocan A Uysal S, Guler G O. Aktumsek A.2017. Traditionally Used *Lathyrus* Species: Phytochemical Composition ,Antioxidant Activity, Enzyme Inhibitory Properties, Cytotoxic Effects, and in silico Studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia* *Frontiers in Pharmacology* 8(83).1–20.
- [37] K Bell, E. A. ; Foster, R. G. 1962, *Structure of Lathyrine Nature*, Volume 194, Issue 4823,pp. 91-92.
- [38] Bhattacharjee S, Waqar A, Barua K, Das A, Bhowmik S and Debi SR. Phytochemical and pharmacological evaluation of methanolic extract of *Lathyrus sativus*L seeds. *Clinical Phytoscience* 2018; 4(20):1-9.
- [39] Kumar BK. Cardioprotective potential of *Lathyrus sativus* against experimental myocardial infarction due to isoproterenol in rats. MSc thesis, College of Veterinary Science, Rajendranagar, Hyderabad, India 2005 .

- [40] activitie hypoglycemique Sultana A, Rahmatullah M. Antihyperglycemic activity of methanolic extract of non-boiled and boiled *Lathyrus sativus* L. seeds. *J Chem Pharm Res.* 2016; 8(8):874–6.
- [41] Sultana A and Rahmatullah M. Antihyperglycemic activity of methanolic extract of non-boiled and boiled *Lathyrus sativus* L seeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2016; 8(8):874-876.
- [42] Yerra S, Putta S and Kilari EK. Effect of various processing methods of *Lathyrus sativus* seeds collected from different states of India on the muscle coordination activity in Wistar albino rats. *Int J Food and Nutr Sci* 2015; 4(4): 212-218.
- [43] Rybinski W, Karamac M, Sulewska K, Börner A and Amarowicz R. Antioxidant potential of grass pea seeds from European countries. *Foods* 2018; 7: 142.
- [44] Sarmento A, Barros L, Fernandes Â, Carvalho AM and Ferreira IC. Valorization of traditional foods: nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(1): 179–185.
- [45] Starzyńska-Janiszewsk A, Stodolak B and Jamróz M. Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. *Food Chemistry* 2008; 109(2): 285-292.
- [46] Memoire Online - Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales - Ouafa MEDJOUJDA.” [Online]. Available: <https://www.memoireonline.com/03/15/8988/Methodes-d-etudes-d-activite-des-antioxydants-des-plantes-medicinales.html>.
- [47] Chew, H., lee, C., "A propos d'un cas de syndrome compartimentalglutéal après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale", *Annles de chirurgie vasculaire*, 23 (4), 17 – 21, (2009.)
- [48] Z. Chaibeddra. Etude comparative des substances bioactives chez *Ruta montana* L. et *Ruta tuberculata* Forsk. : Point de vue phytochimique et pharmacologique. Thèse de magister en biochimie, (2014) Université El Arbi Ben M'Hidi-Oum El Bouaghi.
- [49] M. Mimouni. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* de deux régions Mostaganem et Relizane Effet antibactérien. Mémoire de master enbiologie, (2016) Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- [50] PELLI K., LYL M., 2003. Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande.
- [51] <https://www.medinat.fr/blog/176/antioxydants-et-radicaux-libres-qu-est-ce-que>.

- [52] Jean-Charles, P., 2012. Oxidative Stress, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 36: 147.
- [53]. Koppenol, W.H., 2001. The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep* 6: 229-34.
- [54] Thomas, D., "LES ANTIOXYDANTS DE NOS JOURS : DEFINITION ET APPLICATIONS", THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE, UNIVERSITÉ DE LIMOGES, (le 29 mars 2016.)
- [55] Gutteridge and B, C., "Invited review free radicals in disease processes : A compilation of cause and consequence", (1993.)
- [56] Mohammedi, Z., " Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie", Thèse de Doctorat en Biologie Université Abou Beker Belkaid de Tlemcen, 2013.
- [57] M. MERAD et TERKI K. Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de master en biochimie appliquée, (2014) Université ABDERRAHMANE MIRA de Bejaia.
- [58] Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).
- [59] Chew, H., Lee, C., "A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéal après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale", *Annales de chirurgie vasculaire*, 23 (4), 17 – 21, (2009).
- [60] Lozniewski A., Rabaud C., (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques, *Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins*, CCLIN, Sud-Est, Nancy, p4.
- [61] Nauciel C., Vilde J-L., (2005). *Bactériologie médicale*. 2ème édition. Masson, Paris. p.78. 97.

## Chapitre II : Partie expérimentale

### I. Introduction

L'espèce choisie est une plante du genre *Lathyrus* 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 des parties aériennes de la plante à savoir le screening phytochimique, le dosage de tanins condensés, le dosage des flavonoïdes l'évaluation de l'activité oxydante et antibactérienne des différents extraits de cette plante.

Tout cela a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences de l'université Saad Dahleb-Blida et Laboratoire d'hygiène-Faroudja-Blida.

### II. Etude phytochimique

#### II.1. Récolte du matériel végétal

Pour la réalisation des objectifs de notre travail, l'espèce *Lathyrus* a été récoltée en Avril 2021 dans la région de (Médéa). Nous avons choisi ce genre car d'après la littérature, il est très reconnue par sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

Le matériel végétal (partie aérienne) est nettoyé (débarassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'abri de la poussière et de la lumière dans un endroit bien aéré (on obtient  $m=250g$ ). Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre.

#### II.2. Préparation des extraits

Après séchage, 100 g des parties aériennes 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 : Extrait Chloroforme (1.26g), Extrait Chlorométhanol (5.96 g), Extrait Méthanol (13.08g) [1].



**Figure II.1** : Etapes d'extraction

Le diagramme suivant Figure (II.2) résume des différentes étapes d'extraction.

## Chapitre II : Partie expérimentale

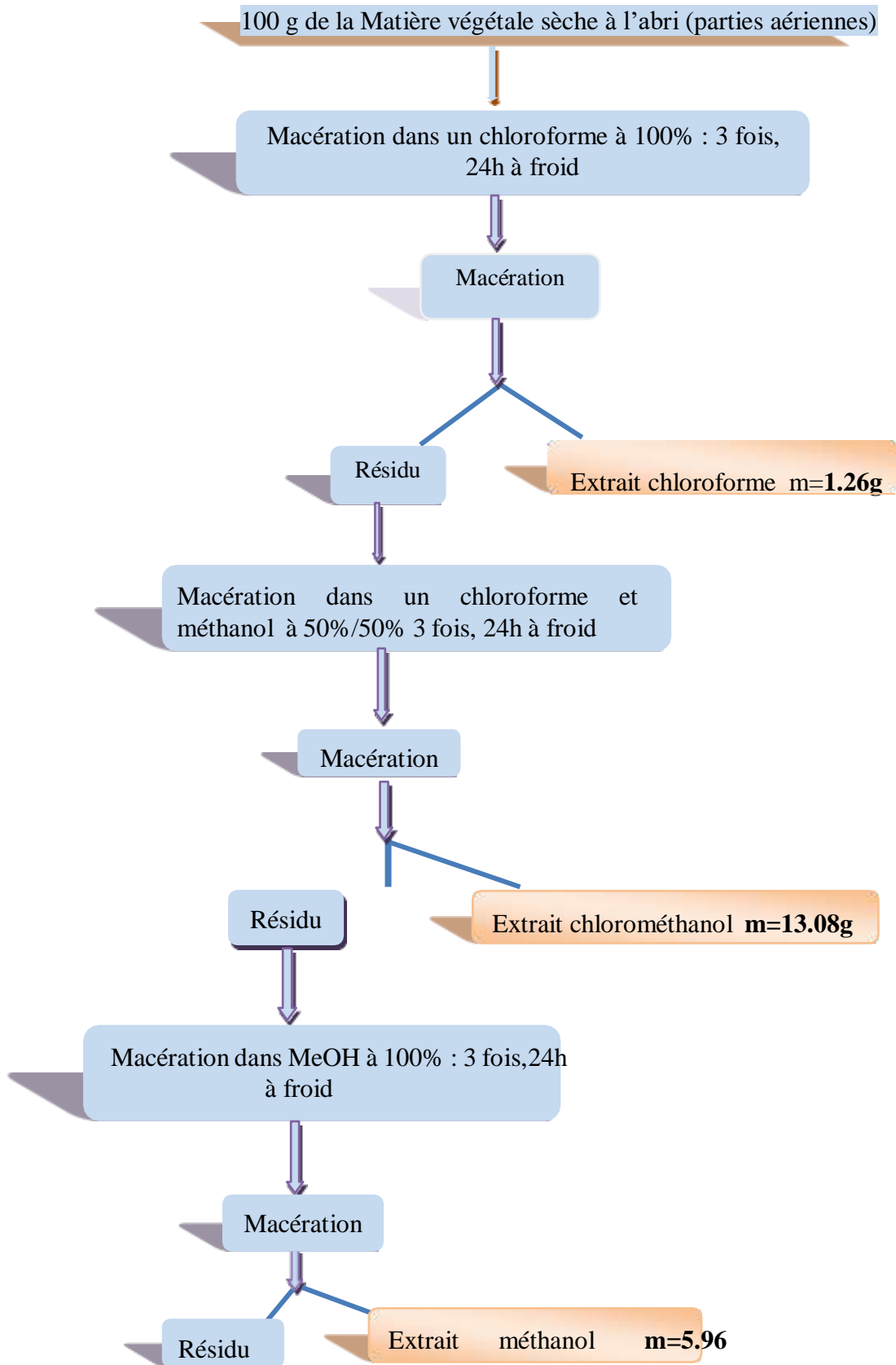


Figure II. 2 : Protocole d'extraction [1].

### II.3. Screening phytochimique :

Le screening photochimique est un ensemble de tests qualitatifs qui permet de mettre en évidence les différents composés chimiques se trouvant dans un produit végétal donné. Telque les alcaloïdes, les saponines, les polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines, les quinones, etc.

La présence de ces derniers est attestée par la formation d'un précipité et / ou changement de coloration du milieu [2]. Pour y parvenir, nous utilisons la technique des réactions en solution qui utilise les réactifs spécifiques.

#### II.3.1. Préparation des extraits

##### □ L'extrait végétale 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'extraction 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 chloroforme et 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 .3 : Préparation des extraits

## Chapitre II : Partie expérimentale

---

### II.3.2. Tests de caractérisations

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

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait hydro-alcoolique. On additionne dans l'un des tubes 0.5 ml de HCl concentré, et l'outre reste comme un témoin. On porter 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 2ml de l'extrait hydro-alcoolique. On additionne dans l'un des tubes l'HCl concentré (0.5 ml) et l'outre 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 (flavonones 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 hydro-alcoolique. On additionner 4 à 5 gouttes de gélatine à 1 % dans le premier tube et on additionne 4 à 5 gouttes de (FeCl<sub>3</sub> en solution méthalonique) dans le deuxième tube et le troisième tube reste comme un témoin

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

#### II.3.2.4. 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 [5-6]. Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer et de Dragendroff.

##### ▪ Réactif de Mayer

Composition : Iodure de potassium (KI) 25g, chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) 6.8 g, l'eau distillée (100 ml).

##### ▪ Réactif de dragendroff

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'acide sulfurique. Dans le premier tube on met 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le 2ème tube on met 5 gouttes de réactif de

## Chapitre II : Partie expérimentale

---

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 [7].

### II.3.2.5. Test des terpènes et des stérols insaturés :

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols [8-9]. Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides [10].

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 [11].

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

- A. Un mélange MeOH/ $H_2O$  (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale.
- B. Après agitation, filtration et concentration non à sec on ajoute 50ml d'éther de pétrole à la solution obtenue et on laisse décanter.
- C. Après séparation des deux phases on procède à l'évaporation à sec de la phase étherée, l'extrait obtenu est additionné 15ml de chloroforme.
- D. 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 [12].



### II.3.2.6. 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 [13]. Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique [14].

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 [14].

### III. Quantification des composés phénoliques

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

#### III.1. Dosage des flavonoïdes totaux :

##### III.1.1. Principe :

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) a été utilisée pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre qui forme une liaison Covalente avec le trichlorure d'aluminium (figure II.4) ce qui donne des complexes jaunâtres ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons.

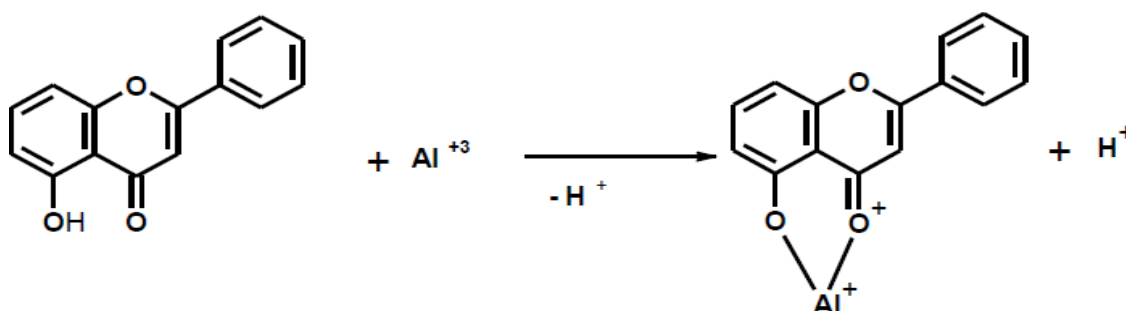


Figure II.4 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes.

Le complexe jaune présente une absorbance maximale à 430 nm dont l'intensité est Proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présents dans l'échantillon [15].

##### III.1.2. Procédure :

###### □ Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode décrite par Marinova *et al* (2005). Avec modification des réactif (remplacé nitrite de sodium par acétate de sodium). Des volumes de 0,1 ml de solution d'acétate de sodium et de 0,1ml de solution de chlorure d'aluminium ont été ajoutés à 2 ml de solution d'extrait ou de fraction Après 5 min d'incubation, le mélange a été mis en contact avec 2.8ml l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 420nm contre un blanc constitué de 0,1 ml de solution d'acétate de sodium de 0,1 ml de solution de chlorure d'aluminium et de 2.8ml de l'eau distillée. La quercétine a été utilisée comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et pour la quantification des teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en

## Chapitre II : Partie expérimentale

milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

Les résultats sont réunis dans le tableau suivant [16].

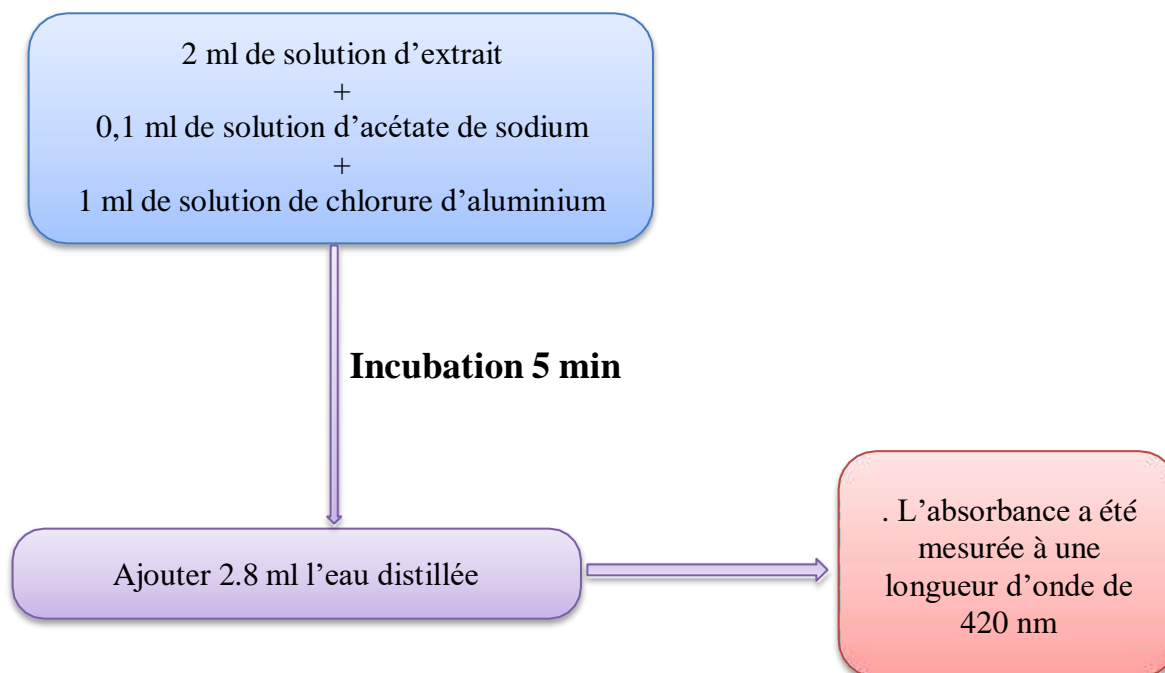
**Tableau II.1:** Absorbance en UV à 420 nm des trois extraits *lathyrus* de dosage flavonoïdes

| Absorbance 1                   | Absorbance 2 | Absorbance moyenne |          |
|--------------------------------|--------------|--------------------|----------|
| Extrait méthanol               | 0.257 nm     | 0.157 nm           | 0.207 nm |
| Extrait chloroforme            | 0.424 nm     | 0.419 nm           | 0.421 nm |
| Extrait mélange (chloro+métho) | 0.536 nm     | 0.555 nm           | 0.545 nm |

### □ Préparation de la gamme d'étalon de la quercétine( $C_{15}H_{10}O_7$ ) :

La gamme d'étalon est préparée avec la quercétine à des concentrations variables de (0 30)  $\mu\text{g/ml}$ . 2000  $\mu\text{l}$  de chaque dilution est a été mélange avec 100  $\mu\text{l}$  de trichlorure d'aluminium (10%) et 100 $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium (1 M) et 2500  $\mu\text{l}$  de l'eau distillée. Après une heure (1h) d'incubation à température ambiante L'absorbance a été mesurée à 420 nm par un spectrophotomètre UV–Visible [16].

La figure II.5 résume le protocole de dosage des flavonoïdes totaux



**Figure II .5 :** Protocole de dosage des flavonoïdes totaux

### III.2. Dosage de tanins

#### □ Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupe aldéhydique de la vanilline sur le carbone en position 6 du cycle A des tanins condensés qui entraînent une coloration verte de la solution qui absorbe à 500 nm.

#### □ Mode opératoire

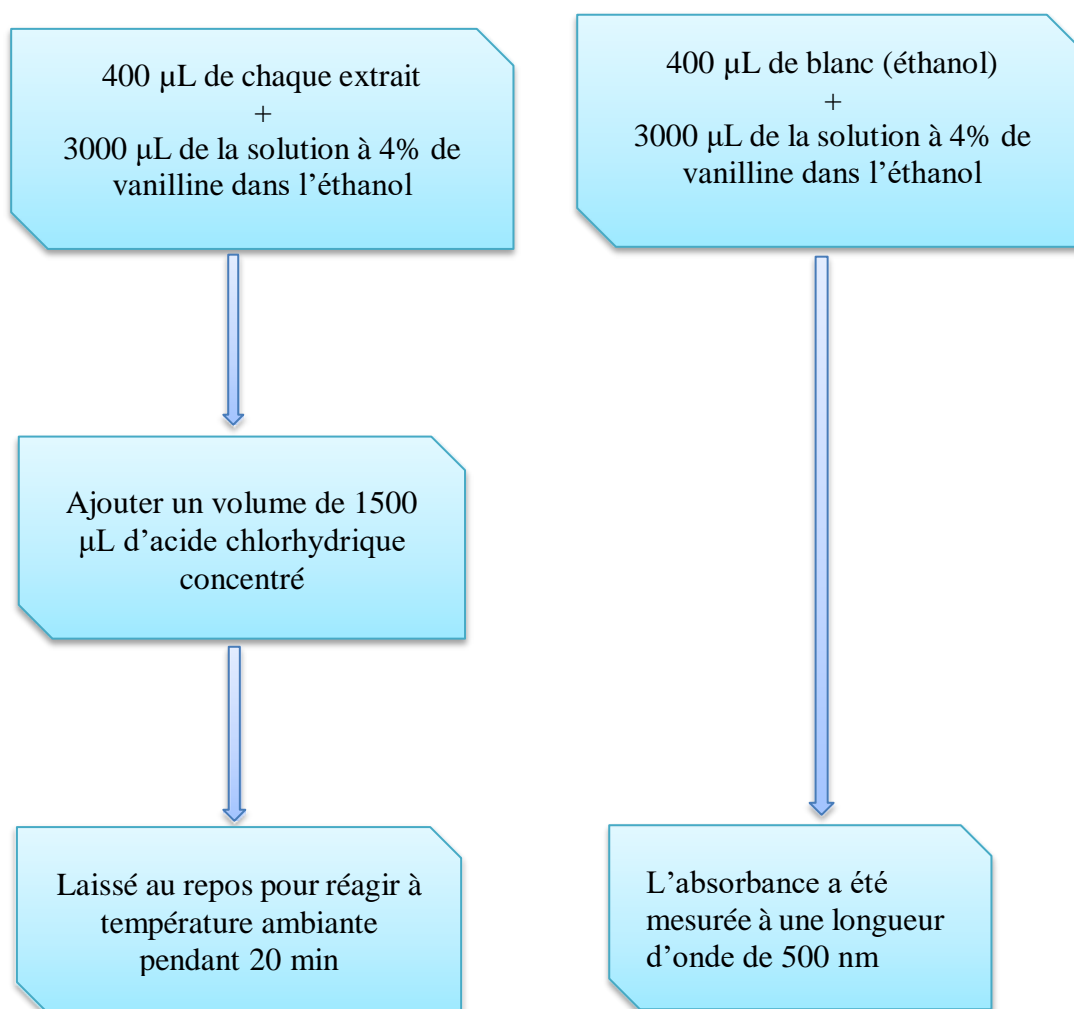
La teneur en tanins condensés a été déterminée selon la méthode décrite par Julkunen-Titto (1985). Une quantité de 400  $\mu\text{L}$  de chaque extrait a été ajoutée à 3000  $\mu\text{L}$  de la solution à 4% de vanilline dans l'éthanol. Le mélange résultant est vigoureusement agité et un volume de 1500  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique concentré y a été additionné. Le mélange obtenu est laissé au repos pour réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 500 nm contre un blanc constitué de la solution à 4% de vanilline dans le méthanol. Une solution mère catéchine ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ) a été utilisée comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et pour la quantification des teneurs en tanins condensés exprimés en milligramme équivalent d'acide tanique par gramme de la matière sèche (mg EAT/g de la matière sèche). Les résultats sont réunis dans le tableau suivant [17]

## Chapitre II : Partie expérimentale

**Tableau II.2.** : Absorbance en UV à 500 nm des trois extraits *Lathyrus* de dosage tanins

|                          | Absorbance 1 | Absorbance 2 | Absorbance moyenne |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| Extrait méthanol         | 0.173 nm     | 0.171 nm     | 0.172 nm           |
| Extrait chloroforme      | 0.130 nm     | 0.127 nm     | 0.128 nm           |
| Extrait (chlorométhanol) | 0.214 nm     | 0.180 nm     | 0.197 nm           |

La figure II. 6 résume le protocole de dosage des tanins totaux



**Figure II.6** : Protocole de dosage des Tanins

### IV. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée in vitro par trois méthodes différentes :

- La méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- La méthode de blanchissement de la  $\beta$ -carotène.
- La méthode de réduction de fer ferrique (FRAP).

#### IV.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH

##### IV.1.1. Principe :

La réduction de ce radical stable par un agent antioxydant en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle. Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de son absorbance caractéristique entre 515-518 nm provoquée par les antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non coûteux [18]. Dans ce test, le substrat est un radical stable, qui peut en fait être neutralisé soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par des transferts d'atome d'hydrogène [18]. En formant le DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son ultime absorbance. Une faible absorbance indique une meilleure activité antioxydante [19].

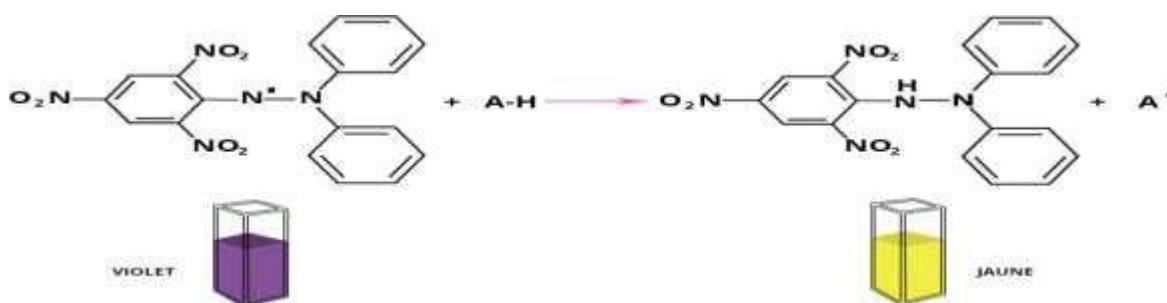


Figure II. 7 : Réaction de radical DPPH• avec un antioxydant AH.

##### IV.1.2. 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.

##### IV.1.3. Mode opératoire :

400  $\mu$ l des solutions d'extraits ont été ajoutés à 1600  $\mu$ l DPPH (3% préparée dans méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 400  $\mu$ l de méthanol avec 1600 $\mu$ l

## Chapitre II : Partie expérimentale

de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 2fois. L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous [19]. L'activité antiradicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

**I%** : Pourcentage d'inhibition de DPPH°

**Abs Contrôle** : Absorbance du **contrôle** Abs

**Echantillon** : Absorbance de l'extrait

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Nous avons utilisé différentes concentrations (8, 4, 2, 1,0.5,0.25mg/ml) des échantillons étudiés. Les résultats sont réunis dans les tableaux suivants :

**Tableaux II.3, II.4** : Absorbance en UV à 517 nm des trois extraits *lathyrus* et des antioxydants de référence lors du test de piégeage de radicale libre DPPH.

| Extrait méthanoliques |         |         |            | Extrait mélange (métha+chloro) |         |         |
|-----------------------|---------|---------|------------|--------------------------------|---------|---------|
| Concentration (mg/ml) | Abs1 nm | Abs2 nm | Abs moy nm | Abs1 nm                        | Abs2 nm | Abs moy |
| 8                     | 0.143   | 0.135   | 0.139      | 0.269                          | 0.246   | 0.257   |
| 4                     | 0.269   | 0.270   | 0.269      | 0.349                          | 0.316   | 0.332   |
| 2                     | 0.410   | 0.419   | 0.414      | 0.446                          | 0.458   | 0.452   |
| 1                     | 0.499   | 0.498   | 0.498      | 0.534                          | 0.524   | 0.529   |
| 0.5                   | 0.561   | 0.558   | 0.559      | 0.567                          | 0.568   | 0.567   |
| 0.25                  | 0.582   | 0.578   | 0.580      | 0.608                          | 0.601   | 0.604   |

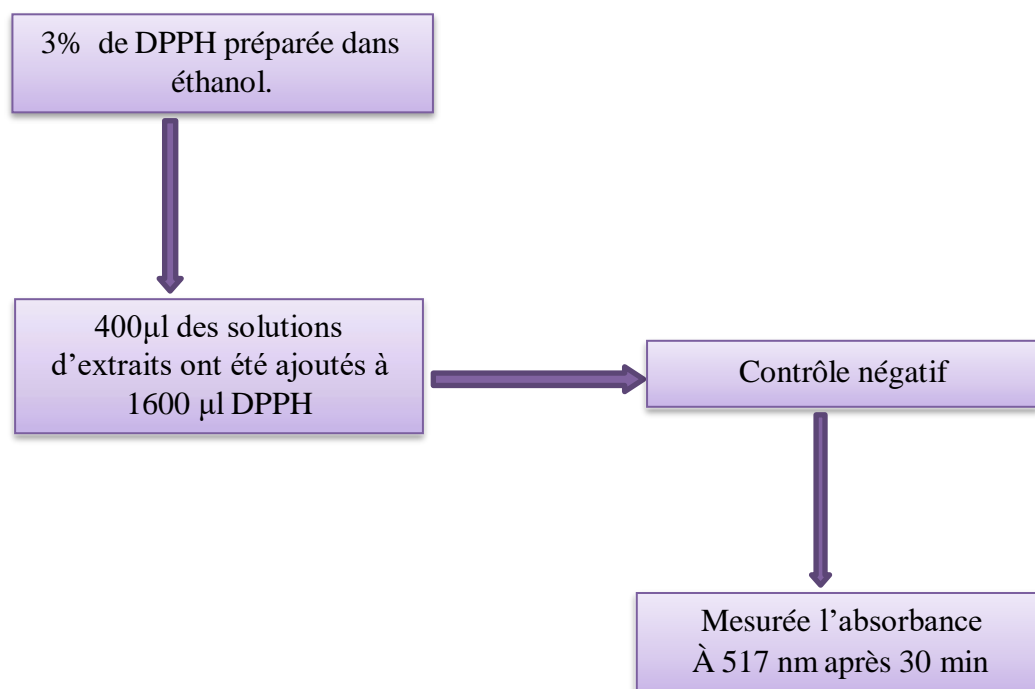
  

| Extrait chloroformique |         |         |         |
|------------------------|---------|---------|---------|
| Concentration (mg/ml)  | Abs1 nm | Abs2 nm | Abs moy |
| 9                      | 0.953   | 0.991   | 0.972   |
| 4.5                    | 0.386   | 0.424   | 0.405   |
| 2.25                   | 0.440   | 0.465   | 0.452   |

## Chapitre II : Partie expérimentale

|              |       |       |       |
|--------------|-------|-------|-------|
| <b>1.125</b> | 0.459 | 0.470 | 0.464 |
| <b>0.562</b> | 0.489 | 0.499 | 0.494 |
| <b>0.281</b> | 0.498 | 0.515 | 0.506 |

Le protocole d'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la (Figure II. 8) :

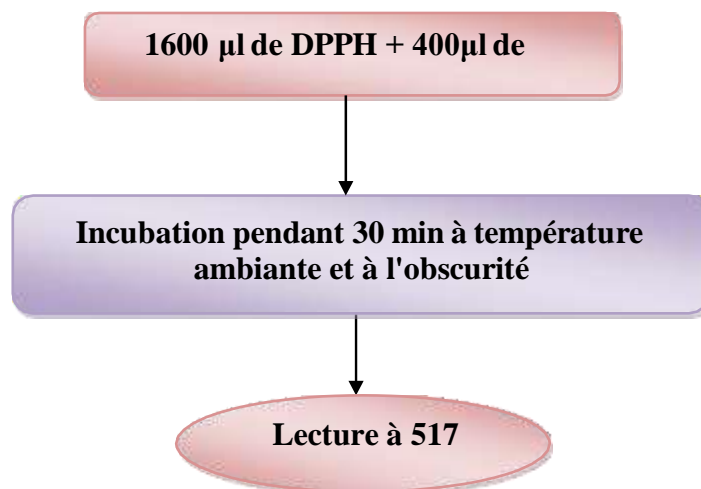


**Figure II.8:** Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des trois extraits de plant *lathyrus* par la méthode de DPPH

L'expérience a été répétée deux fois et les résultats ont été exprimés en valeurs des  $IC_{50}$  (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' $IC_{50}$  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.9) :





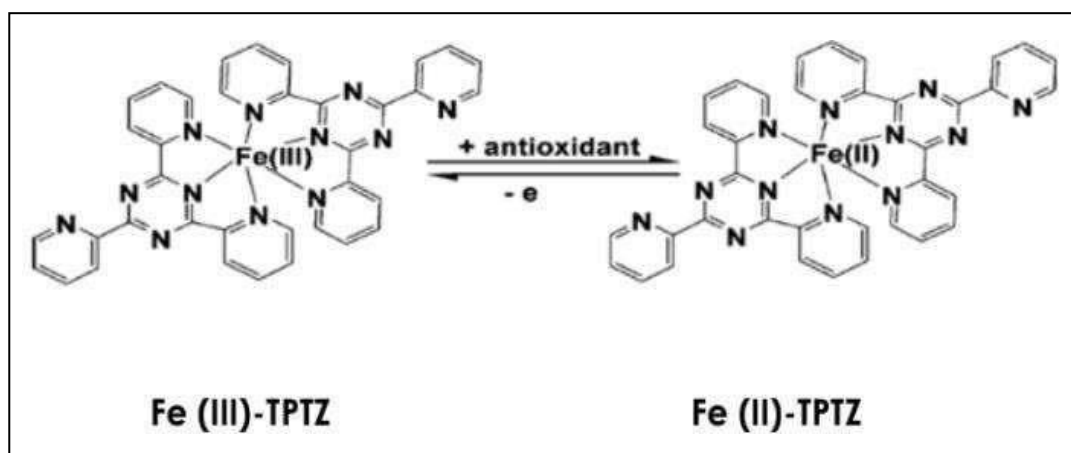
**Figure II. 9:** Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH

### IV. La méthode 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 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) à 700 nm. Le fer ferrique initialement jaune, se réduit et devient bleu ou vert en présence d'un atome d'électron. Le changement de la coloration de jaune à bleu ou vert est proportionnel à l'activité antioxydant [20].

Le pouvoir réducteur du fer des différents extraits a été évalué selon le protocole décrit par [21].



**Figure II .10:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique  $\text{Fe(III)-TPTZ}$  et un antioxydant (AH) [22].

## Chapitre II : Partie expérimentale

---

### ❖ Procédure :

- Préparation de la solution tampon :

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

- 4,54g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans 500ml d'eau distillée .....S1
- 4,24 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans 500 ml d'eau distillée.... S2

Prend 125,5 ml de la solution (1) avec 74,5 ml 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  $\text{FeCl}_3$  (0,1%) :0,1 g de  $\text{FeCl}_3$  dans 100 ml d'eau distillée sous agitation.

Solution de trichloracétique (10%) :10g de TCA dans 100 ml d'eau distillé sous agitation.

### Mode opératoire

A 200  $\mu\text{L}$  de la solution des extraits (solution mère) et les solutions de référence, on introduit dans des tubes à essai, On rajoute 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  puis 500  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon de pH = 6,6. L'ensemble est chauffé à 60°C au bain-marie pendant 20 min, après refroidissement, on ajoute 500  $\mu\text{L}$  de TCA (10%). Le mélange est, par la suite, centrifugé à une vitesse de 3000 tr/min pendant 10min On prélève 2.5ml de surnageant, auquel on ajoute 500  $\mu\text{L}$  d'eau distillées et 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  (la coloration vire au bleu).

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 courbe 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  $\text{CE}_{50}$  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.

Ces mesures sont répétées deux fois pour chaque concentration afin de prendre la valeur moyenne. Les résultats de la méthode de FRAP sont réunis dans le tableau suivant [20].

## Chapitre II : Partie expérimentale

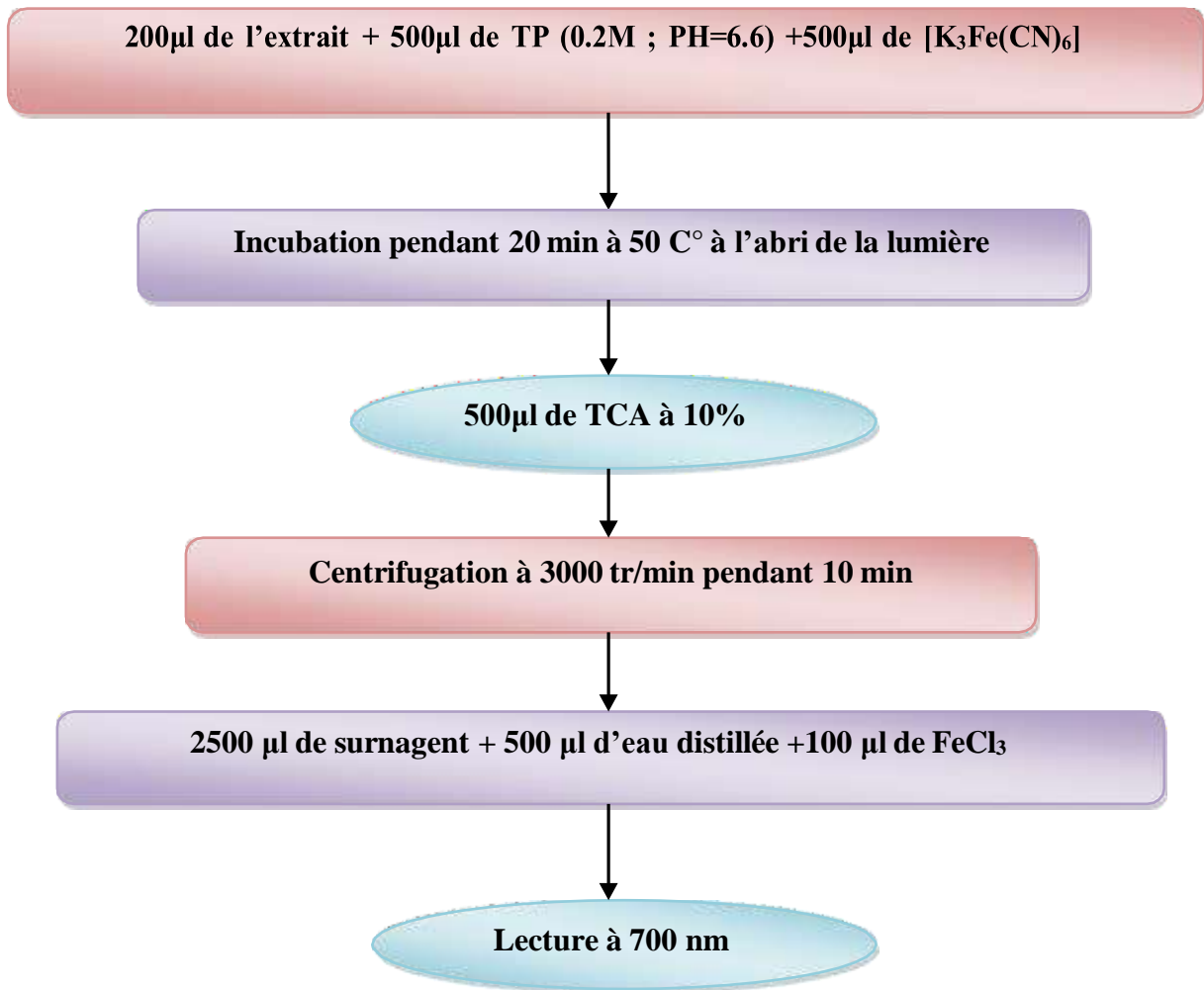
**Tableau II.5 :** Absorbance en UV à 700 nm des solutions des trois extraits *lathyrus* et des antioxydants de référence lors du test FRAP.

|               | Extrait<br>méthanol | Extrait<br>chloroforme | Extrait mélange<br>(chlorométhanol) | BHT    |
|---------------|---------------------|------------------------|-------------------------------------|--------|
| Concentration | Abs nm              | Abs nm                 | Abs nm                              | Abs nm |
| 8mg/ml        | 0.613               | 0.528                  | 0.721                               | 0.999  |
| 4mg/ml        | 0.508               | 0.341                  | 0.314                               | 0.692  |
| 2mg/ml        | 0.32                | 0.099                  | 0.119                               | 0.418  |
| 1mg/ml        | 0.156               | 0.093                  | 0.015                               | 0.260  |
| 0.5 mg/ml     | 0.039               | 0.027                  | 0.013                               | 0.149  |

Le protocole d'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la Figure II.11

## Chapitre II : Partie expérimentale

---



**Figure II.11** : Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur fer

### IV.3. Méthode de blanchissement du $\beta$ -carotène :

#### ❖ Principe :

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco [23], puis légèrement modifiée par Miller [24]. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du  $\beta$ -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du  $\beta$ -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  $\beta$ -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible [25]. La capacité antioxydante de nos échantillons a été évaluée selon la méthode décrite par [26].

#### ❖ Mode opératoire :

Une quantité de 2 mg de  $\beta$ -carotène a été solubilisée dans 10 ml de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), la solution a été transférée dans un ballon contenant préalablement 200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de cette émulsion a été ajouté dans des tubes contenant chacun 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait (à une concentration finale de 8 mg/ml préparé dans l'Ethanol). 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 ont été de nouveau mesurés à la même longueur d'onde ( $t=120$  min).

## Chapitre II : Partie expérimentale

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 ont été lues à 470 nm, après [30, 60, 90, 120] min d'incubation à température ambiante [26].

L'activité antioxydante des extraits et du BHA a été calculée par rapport au contrôle négatif en utilisant l'équation suivante [27].

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

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

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

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

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

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

**Tableau II.6** : Absorbance en UV à 490 nm des trois extraits de *lathyrus* et des antioxydants

| temps              | Extrait métha olique |       | Extrait chloroforme |       |       | Extrait (chlorométhanol) |       |       | BHA     |       |       |         |
|--------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|
|                    | Abs1                 | Abs2  | Abs moy             | Abs1  | Abs2  | Abs moy                  | Abs1  | Abs2  | Abs moy | Abs1  | Abs2  | Abs moy |
| <b>T=0</b>         | 0.406                | 0.394 | 0.4                 | 0.632 | 0.639 | 0.635                    | 0.756 | 0.785 | 0.770   | 0.998 | 0.994 | 0.996   |
| <b>T=30 min</b>    | 0.346                | 0.366 | 0.356               | 0.564 | 0.600 | 0.582                    | 0.740 | 0.758 | 0.749   | 0.993 | 0.990 | 0.991   |
| <b>T=1h</b>        | 0.353                | 0.348 | 0.350               | 0.577 | 0.579 | 0.578                    | 0.598 | 0.634 | 0.616   | 0.984 | 0.980 | 0.982   |
| <b>T=1h, 30min</b> | 0.341                | 0.335 | 0.338               | 0.523 | 0.610 | 0.566                    | 0.541 | 0.547 | 0.544   | 0.979 | 0.975 | 0.977   |
| <b>T=2h</b>        | 0.327                | 0.312 | 0.319               | 0.515 | 0.580 | 0.547                    | 0.486 | 0.463 | 0.474   | 0.963 | 0.964 | 0.963   |

Le protocole d'évaluation du blanchiment du  $\beta$ -carotène est illustré par la (Figure II.12)

## Chapitre II : Partie expérimentale

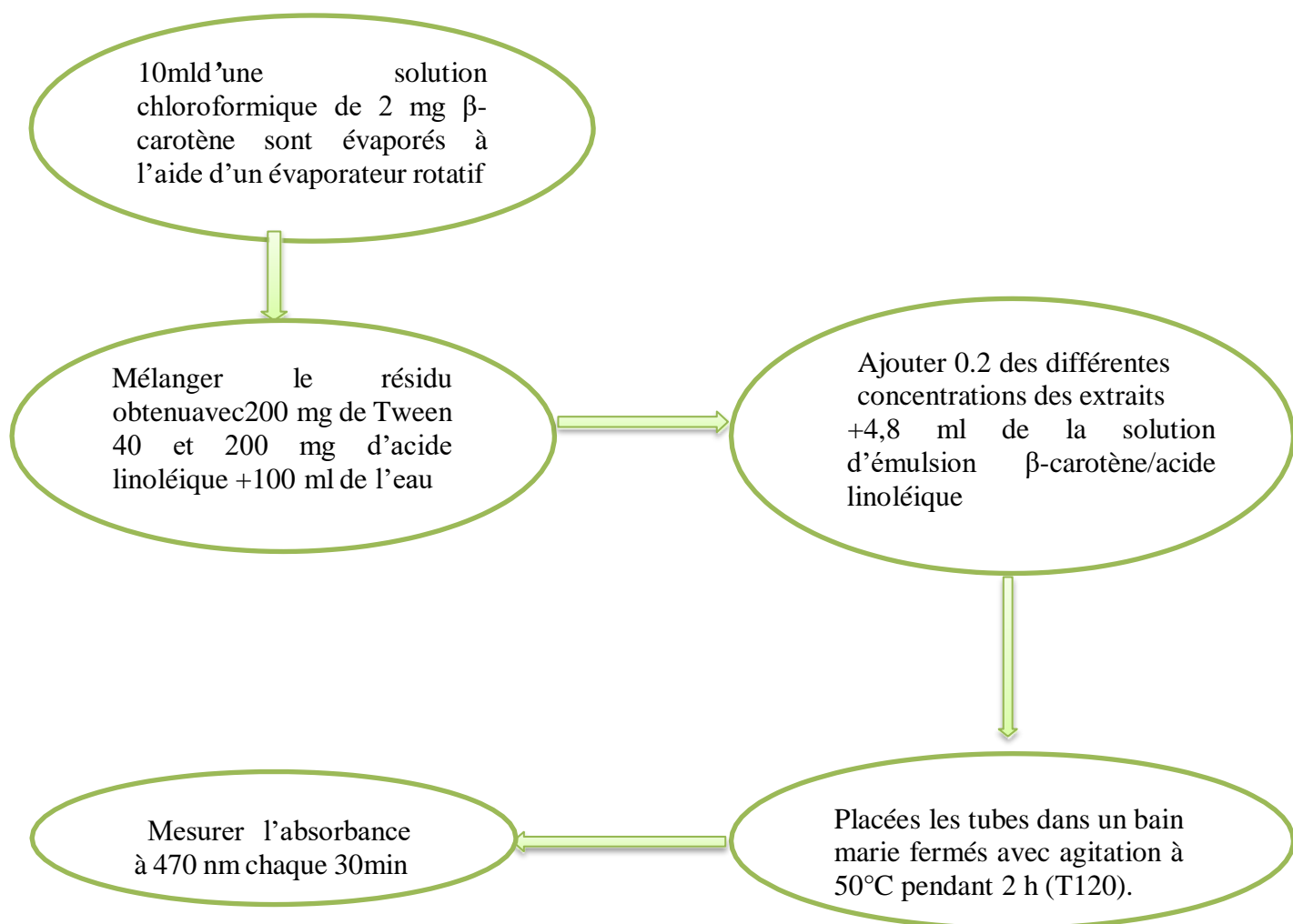


Figure II.12 : Protocole du blanchissement du  $\beta$ -carotène .

### V. 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 *Lathyrus* 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 *Basileus cereus* (ATCC10876). Cette étude de l'activité antibactérienne est réalisée au laboratoire d'hygiène au niveau de l'Établissement Hospitalier Public, Ferroudja ,Blida .

#### V.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 [28].

### IV.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. les solution obtenue et appelée "solution mère" [29].

### IV.2. 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 quelque 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 [30].



Figure II.13 : les souches microbiennes choisies

### IV.3. 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.

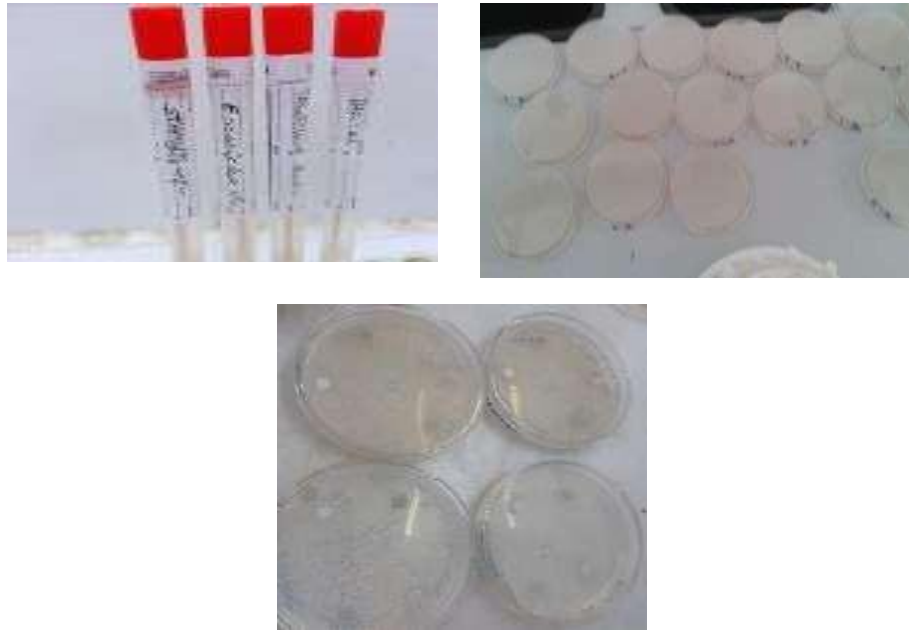


## Chapitre II : Partie expérimentale

---

L'activité d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière [31].

l'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone



**Figure II.14 :** Disposition des disques des trois d'extrait Et le témoin (-) et positif (+) Dans laboite

### **VI. 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 bibliographique :

- [1] Mezrag, A., Bouheroum, M., Malafronte, N., D'Ambola, M., Aissaoui, M., Severino, L., 2014. phytochemical investigation and citotoxicactivity of lotus corniculatus, pharmacologie on line vol.3 •222-225.
- [2] F. Haddouchi · T.M. Chaouche · N. Halla. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. December2018, Vol (5), n°2, P : 2.
- [3] bruneton.j., (1993).pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales .2ème éditionTec et Doc (Ed) paris.
- [4] Dohou. N, Yamnik, Gmiran, Idrissi Hassani. LM, (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, Thymelaea Iychroides. Acta Botanica Malacitana.
- [5] Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions TEC& DOC,3ème édition, 1999, 783- 785.
- [6] Zenk, M.H., Juenger, M. Phytochemistry Review, 2007, 68, 2757 – 2772.
- [7] Chenni. M., (2010). Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'uneplante Médicinale : Bryonia dioica Jasq.Mémoire de Magister Université Essen-Oran.
- [8] Marc, Fr, Davin, A, Deglène, B, L, Ferrand C. médecine sciences, 2004, 20, 458-463.
- [9] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 1841-1856.
- [10] Feher, J., Csomos,G., Vereckei, Berlin Heidelberg, 1987.
- [11] 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.
- [12] Sheel, R., K. Nisha, and J. Kumar, Preliminary phytochemical screening of methanolic extract of Clerodendron infortunatum. IOSR Journal of Applied Chemistry, 2014. 7(1): p.10-3..
- [13] Vincken, J.-P., Heng, L. DE Groot, A., GRUPPEN, H. Phytochemistry, 2007, 68, 275-297.
- [14] Hostettmann, K. et Marston, A. Cambridge University Press, 1995.

- [15] Topçu G, Ay A, Billici A, Sarihurkucu C, Ozturk M, and Ulubelen A. Food Chemistry, 2007, 103, 816-822.
- [16] Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40(3): 255-260.
- [17] Julkunen-Titto R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. J. Agric. Food Chem., 33: 213-217.
- [18] Boligon AA, Machado MM, and Athayde ML. Technical evaluation of antioxidant activity. Medicinal chemistry. 4, 7, (2014), 517-522.
- [19] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Son KlamaKarin J.Sci, Technol*, 26 (2) (2004) 211-219.
- [20] Habibou, H.H., Idrissa, M., Khalide I., “Activité Antioxydante Des Extrait Méthanolique De Différentes Organes De DetariumMicrocarpumGuill&Perr”, *European Scientific Journal*, V15, N°12, (April 2019), 159-171.
- [21] Elmastats M., Isildak O., Turkekul I. et Temur N (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compound in Wild edible mushrooms. *Journal of food composition and analyze*, 20:337-345.
- [22] Ben Moussa, M.T., Khelil, K., Lakehal, S., Hadeif, Y., Chemical Composition, Antimicrobial And Antioxidant Activity Of The Essential Oil Of Brocchia Cinerea Vis, *BatnaJ Med Sci*, (September 2020), V.7, N°2, 122-128
- [23] Marco, G.L.A., “Rapid Method For Evaluation Of Antioxidants”. *J Am Oil Chem Soc*, (1968), V. 45, 594-8.
- [24] Mille, He. A., “Simplified Method For The Evaluation Of Antioxidants”. *J Am Oil Chem Soc* (1971), 48 - 91.
- [25] 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.
- [26] 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; 13(1), 8-17.
- [27] Amin Ismail; Tan Siew Hong. Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds.

Mal J Nutr 8(2): 167-177, September 2002 .

[28] Le Minor L., Veron M ;(1989). Bactériologie médicale. 2ème édition. Ed. Flammarion, Paris.

[29] Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargas R., (1987). Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2ème tirage), France

[30] Ericsson H.M., Sherris J.C., (1971). Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. *Acta Pathol .Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl* 217, pp 1-90.

[31] Billing J. and Sherman P. W. 1998; Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 3-49.

## Chapitre III : Résultats et Discussions

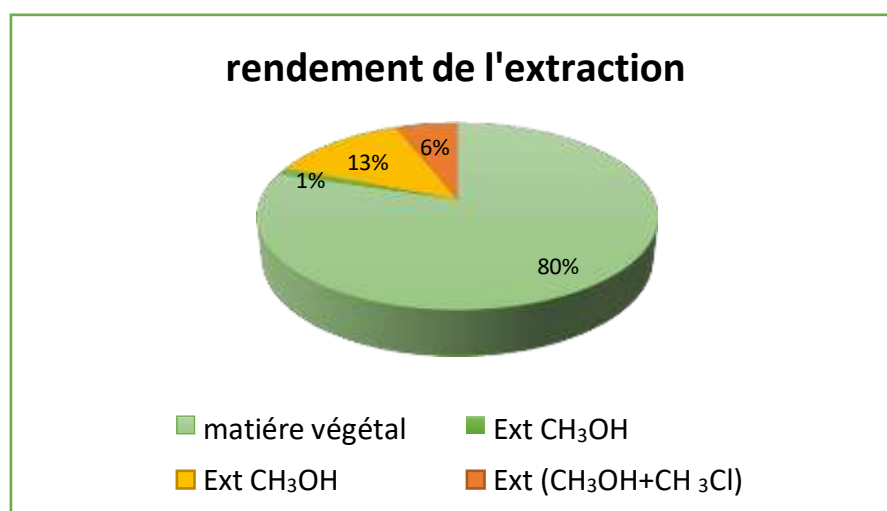
### I. Etude phytochimique

#### I.1. Rendement de l'extraction

Le rendement en extrait sec, l'aspect et le solvant de solubilité des différentes modes d'extraction ont été présentés dans le tableau suivant

**Tableaux III.1:** Aspect couleur et rendement de différents extraits *lathyrus*.

| Extrait        | Aspect   | Couleur     | Masse (g) | Rendement |
|----------------|----------|-------------|-----------|-----------|
| Chloroformique | Pâteux   | Verts foncé | 1.26      | 1.26 %    |
| Méthanoliques  | Visqueux | Verts       | 13.08     | 13.08 %   |
| Chlorométhanol | Visqueux | Verts       | 5.96      | 5.96 %    |



**Figure III.1 :** Histogrammes schématiques des résultats obtenus pour l'extraction des 100 g

D'après ces résultats les rendements obtenus pour les 100 g de feuilles séchées en utilisant la technique de l'extraction solide-liquide avec des solvants de polarité croissante.

Les extraits obtenus présentent un aspect pâteux et visqueux, de couleur verte, marron ou jaune. Cela est dû à la présence des pigments végétaux ou bien à la nature des polyphénols entraînés par les différents solvants et à leur solubilité dans ces solvants.

Selon les résultats (tableau), nous observons une nette différence entre les trois rendements des extractions successives.

- L'extrait méthanoïque donne le rendement le plus élevé avec un pourcentage de 13.08% et l'extrait mélange (CH<sub>3</sub>Cl+CH<sub>3</sub>OH) quant à lui présente un pourcentage de 5.96% suivie de l'extrait chloroformique 1.26% qui donne le plus faible rendement.

## Chapitre III : Résultats et Discussions

Cette variabilité dans les valeurs des rendements d'extraction est due par les différents solvants utilisés montrent que les rendements des extractions par des solvants polaires (le méthanol) et moyennement polaire (mélange (CH<sub>3</sub>Cl+CH<sub>3</sub>OH) sont plus importants par rapport aux solvants les moins polaires (chloroforme).

- Toutefois, il est difficile de comparer strictement nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de l'espèce végétale étudiée, la partie utilisée dans l'extraction, les conditions de séchage et d'entreposage, le contenu de chaque espèce en métabolites secondaires, la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement, sa polarité ainsi que la méthode d'extraction elle-même [2]

### I.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 *Lathyrus* Ils sont classés en fonction des différents critères d'observation :

Très positive +++ : Présence confirmée










Réaction positive ++ : Présence modérée

Réaction plus au moins positive + : Présence en tant que trace réaction négative - : absence.

**Tableau III.2.** : Résultats de screening phytochimique

| Identification     |   |  | Observations  | Résultats |
|--------------------|---|--|---|-----------|
| Test de wilsster   |  |  | Le changement de couleur vers le <b>rouge pourpre</b> | +++       |
|                    | Témoin  | Après  |   |           |
| Test de bate-smith |  |  | Le changement de couleur vers le <b>rouge</b>         | ++        |
|                    | Témoin  | Après  |   |           |

## Chapitre III : Résultats et Discussions

|  |   |   |  |                             |   |
|--|---|---|--|-----------------------------|---|
| <b>Test d'alcaloïde</b>                | <br>Témoin   | <br>Après   | Précipitation et changement de couleur vers <b>Blanc jaunâtre</b>                          | +++                         |   |
| <b>Test de terpènes et des stérols</b> | <br>Témoin   | <br>Après    | <br>Après | Aucun changement de couleur | - |
| <b>Test de Saponosides</b>             | <br>Témoin  | <br>Après  | L'apparition d'une mousse persistante  | +++                         |   |
| <b>Test de tanins</b>                  | <br>Témoin | <br>Après | Le changement de couleur vers le brun verdâtre   | ++                          |   |

Le criblage phytochimique préliminaire a révélé la présence de divers groupes photochimiques

- ✓ Les flavonoïdes sont fortement présents ;
- ✓ Les saponosides sont fortement présents ;
- ✓ Les alcaloïdes sont fortement présents ;
- ✓ Les tanins sont moyennement présents ;
- ✓ Les terpènes et des stérols sont absents.



## Chapitre III : Résultats et Discussions

L'analyse complète du résultat du screening phytochimique met en évidence la présence des métabolites secondaires possédant des activités biologiques intéressantes. On note principalement la présence des flavonoïdes connus pour leurs propriétés antioxydants [3], inflammatoires [4] et anti tumorale [5]. En plus, les tanins qui font partie des composés phénoliques ayant un rôle d'armes chimiques défensif contre certains parasites et contre l'attaque des microorganismes [6].

### II. Résultats de l'étude quantitative

#### II.1. Dosage des flavonoïdes

Le dosage L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), La quercétine a été utilisé comme étalon. d'étalonnage, ayant l'équation

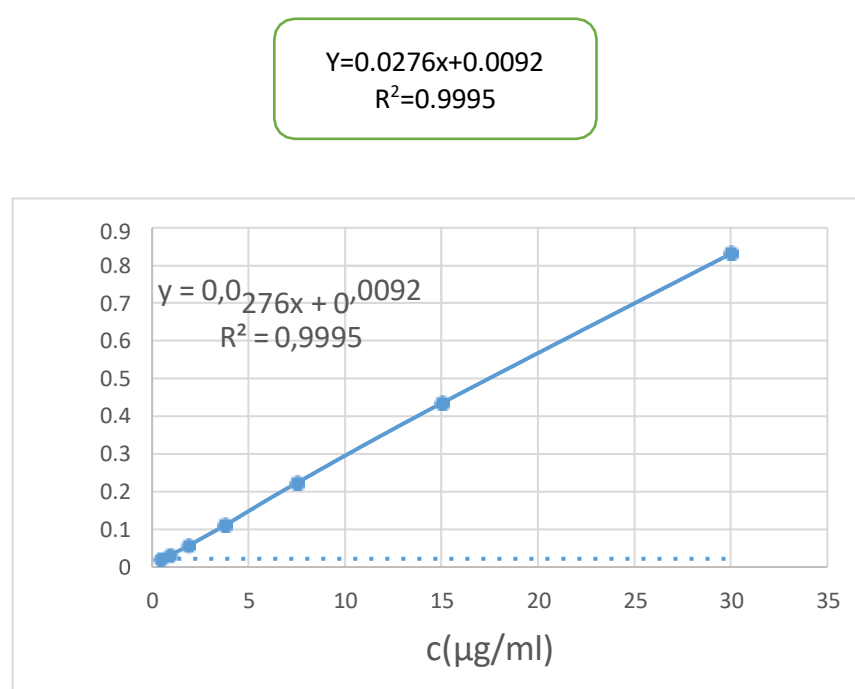


Figure III.2: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats de dosage des flavonoïdes dans les échantillons des trois extraits de plants *lathyrus* sont rapportés dans le **tableau III.3**

**Tableau III.3** : Teneurs en flavonoïde totaux dans les trois extraits *lathyrus*

| Extrait     | Extrait $CH_3Cl$ | Extrait $CH_3OH$ | Extrait<br>( $CH_3Cl+CH_3OH$ ) |
|-------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| mg EAG/g PS | 7.16±1.81        | 19.43±0.345      | 14.93±0.09                     |

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et

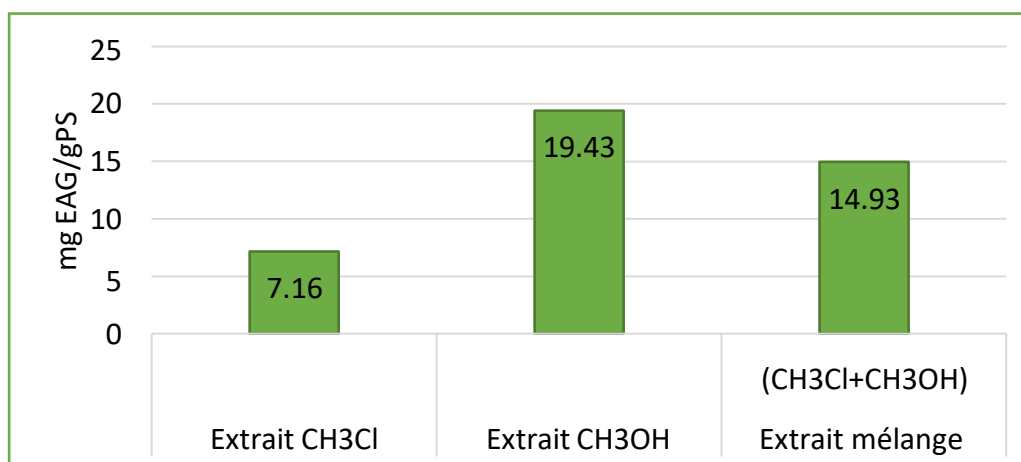
### Chapitre III : Résultats et Discussions

exprimée en mg d'équivalents quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

Comme cité précédemment, les flavonoïdes suivent aussi la même tendance. Nous remarquons, d'après ces résultats, que la quantité de flavonoïdes est comprise entre 7.16 mg EQ/ g d'extrait. Il paraît clairement que le taux de flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait mélange (chlorométha) (14.93 mg EQ/ g d'extrait), par contre la quantité enregistrée pour l'extrait chloroformique (7.16 mg EQ/g d'extrait) reste la plus faible par rapport à l'extrait mélange et l'extrait méthanolique (19.43 mg EQ/g d'extrait), ces deux derniers sont plus riches que l'extrait chloroformique et méthanolique.

Donc la concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation d'extrait [7].

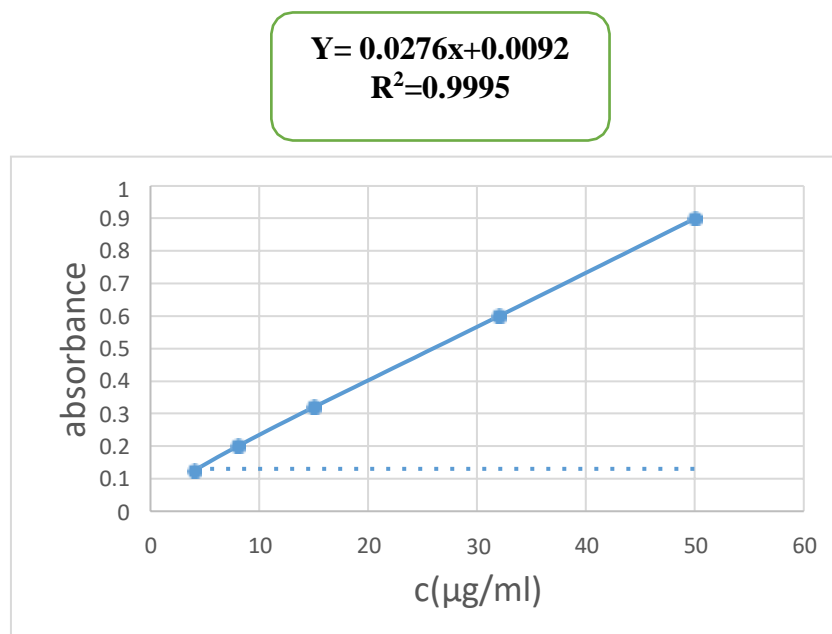
Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés sous forme d'histogramme comme le montre la figure ont résumés dans la figure suivante :



**Figure III.3.** : Evaluation des flavonoïdes totaux des trois extraits de plants *lathyrus*

### II.2. Dosage des tanins

Le dosage de tanins a été déterminé selon la méthode Julkunen-Titto. La catéchine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 550 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation :



**Figure III.4 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine

Les résultats de dosage des tanins dans les échantillons des trois extraits de *lathyrus* sont rapportés dans le tableau III.5.

**Tableau III.4 :** Teneurs en tanins totaux dans les trois extraits des plants *lathyrus*.

| Extrait    | Extrait CH <sub>3</sub> Cl | Extrait CH <sub>3</sub> OH | Extrait mélange<br>(CH <sub>3</sub> Cl+CH <sub>3</sub> OH) |
|------------|----------------------------|----------------------------|--|
| mg EC/g PS | 4.32±0.055                 | 5.89±0.035                 | 6.80±0.62  |

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD

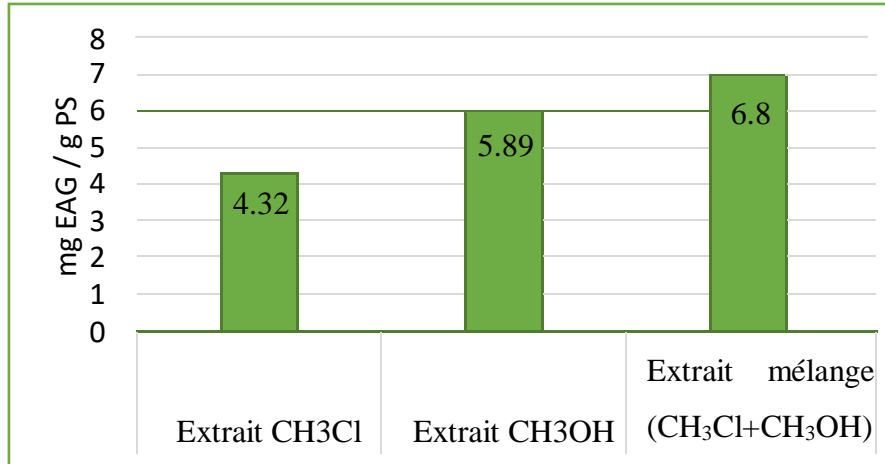
Teneur en tanins condensés de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalents catéchine par g d'extrait (mg EC/g Ext).

D'après les résultats présentés par l'histogramme, nous avons enregistré une Variabilité significative. Nous notons que la quantité des tanins condensés varie entre 4.32 et 6.80 mg EC/g d'extrait, elle est la plus élevée (6.8 mg EC/g d'extrait) dans l'extrait mélange (chloro+métha), cependant elle est faible dans ceux rapportés dans les extraits chloroformique et méthanolique avec 4.32 et 5.89 (mg EC/g d'extrait) respectivement. Donc la teneur en tanins des extraits est

### Chapitre III : Résultats et Discussions

plus élevée dans les solvants polaires et moyennement polaire.

Les résultats du dosage des tanins sont représentés sous forme d'histogramme comme le montre la figure ont résumés dans la figure suivante :



**Figure III.5 :** Evaluation des tanins totaux des trois extraits de plants *lathyrus*

### III. Résultats des tests biologiques

#### III.1. Activité antioxydante

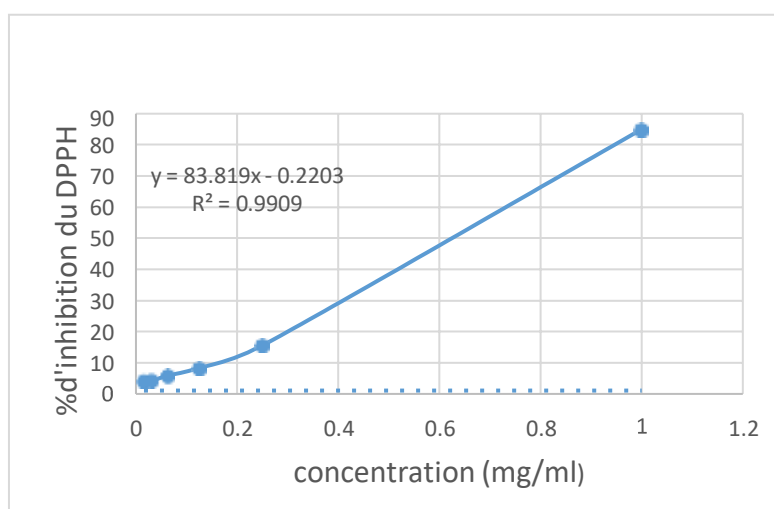
L'activité antioxydants des extraits a été évaluée in vitro par trois méthodes différentes : blanchissement  $\beta$ -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH et méthode de FRAP.

##### III.1.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH

Les activités antiradicalaires des extraits de *Lathyrus* 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.

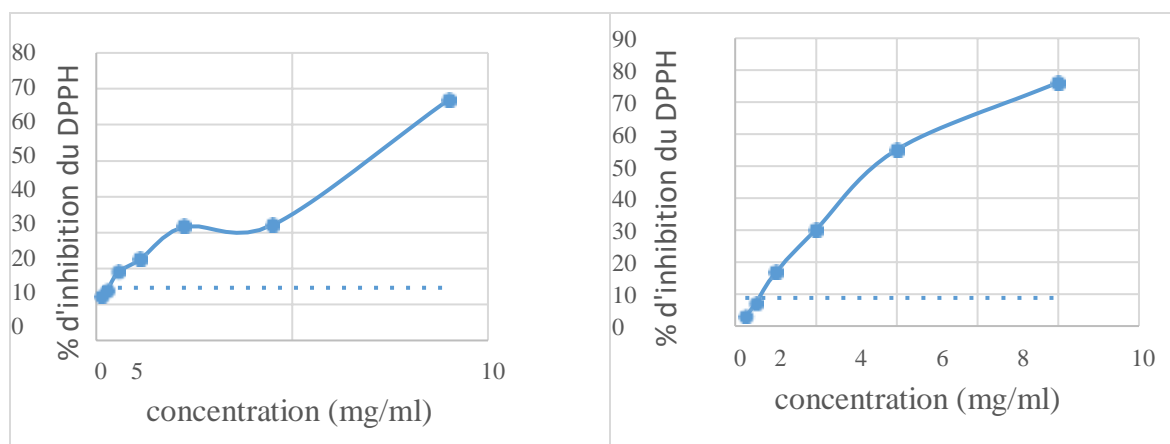
Les résultats obtenus, à une longueur d'onde de 517 nm par spectrophotomètre, ont permis de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les différents extraits de l'espèce *Lathyrus* (Figure III.6) Ces courbes montrent que tous les extraits ainsi que le standard (acide ascorbique) (Figure III.7) 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'IC<sub>50</sub> (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.



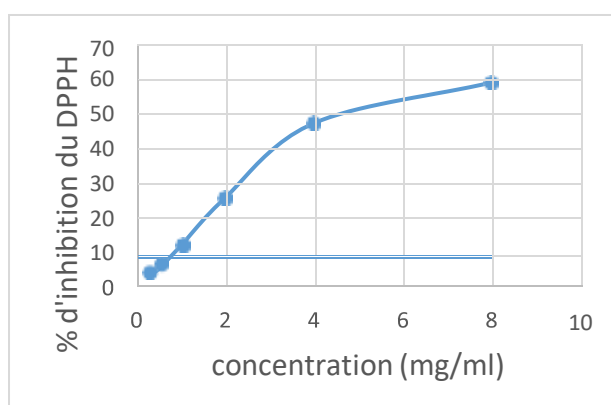
**Figure III.6:** Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par standard testé (Acide ascorbique) En fonction de la concentration

## Chapitre III : Résultats et Discussions



(1)

(2)



(3)

**Figure III.7:** Activité antioxydants des trois extraits de *lathyrus*.

(1) : extrait chloroforme (2) : extrait méthanol (3) : extrait mélange ( $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$ ).

Les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  de chaque extrait sont représentées dans le tableau suivant

**Tableau III.5:** valeur des  $\text{IC}_{50}$  des extraits

| Extrait                  | $\text{CHCl}_3$  | $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ | MeOH             | Vit (c)          |
|--------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
| $\text{IC}_{50}$ (mg/ml) | $5.96 \pm 0.175$ | $6.18 \pm 0.255$            | $4.54 \pm 0.005$ | $0.020 \pm 0.01$ |

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions  $\pm$  SD.

Les valeurs de la concentration inhibitrice 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) des différents extraits bruts et standards sont représentées dans le tableau, qui est un paramètre employé pour quantifier l'activité antioxydants d'un produit chimique. L' $\text{IC}_{50}$  d'une substance antioxydants correspond à la

### Chapitre III : Résultats et Discussions

concentration nécessaire pour inhiber 50 % d'un oxydant impliqué. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé [8]. A des fins comparatives, les trois antioxydants standards concernant l'acide ascorbique et, extrait méthanol, extrait chloroforme et extrait mélange (métha+chloro), ont montré des activités antioxydants importantes présentant des  $IC_{50}$  avec des valeurs respectivement de 0.60, 4.54, 5.96 ,6.18 mg/ml.

Les  $IC_{50}$  obtenu pour l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits, est donc, l'acide ascorbique possède une activité antioxydants très élevé. Tous d'abord, l'extrait extrait méthanol montré une activité antioxydants plus au moins élevée comparativement à celle de deux autres extraits avec une  $IC_{50} = 4.54 \pm 0.005$  mg/ml suivie par extrait chloroforme ( $IC_{50} = 5.96 \pm 0.175$ mg/ml) et ensuite extrait mélange (métha+chloro) ( $IC_{50} = 6.18 \pm 0.255$ mg/ml) (Tableau III.5). Nous remarquons que Les trois Extraits bruts des plantes testées s'avèrent moins actifs en comparaison avec les antioxydants Standards. Donc l'activité anti radicalaire de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence des composés phénoliques qui sont détectés uniquement dans les extraits polaires [9]

Les résultats d' $IC_{50}$  de tous les extraits et de l'acide ascorbique sont résumés dans la figure suivante

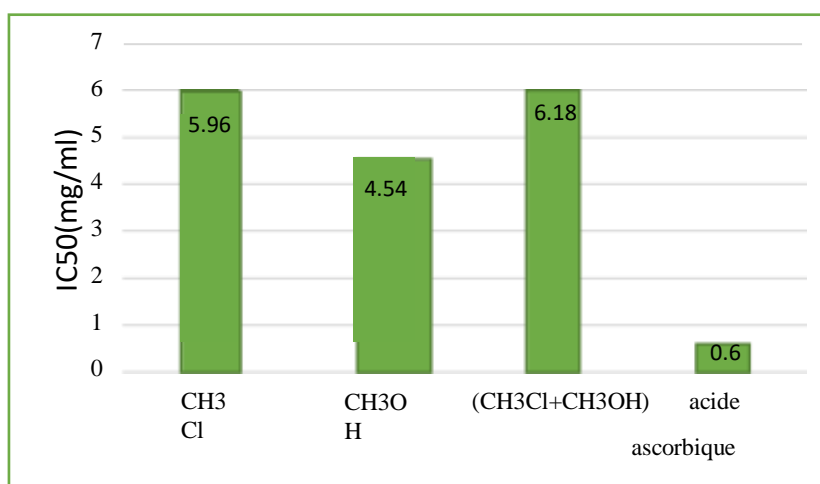
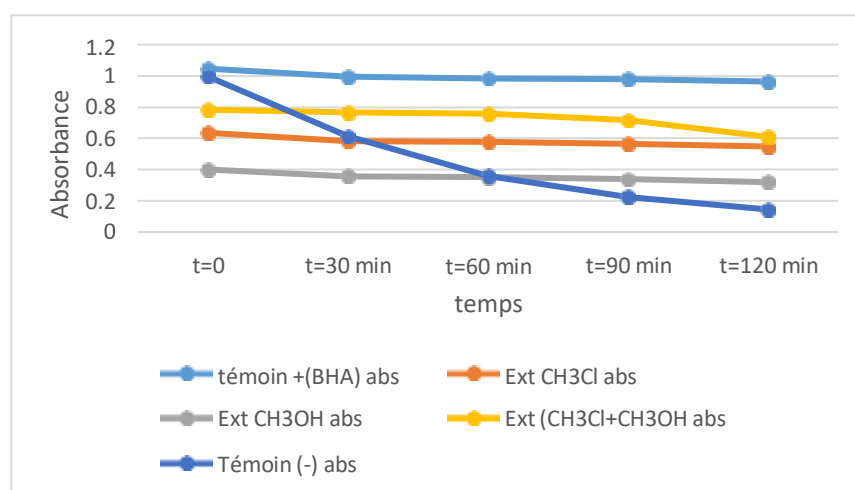


Figure III. 8: Valeur  $IC_{50}$  de trois extraits des *lathyrus* et de composé standard Acide

### III.1.2. Méthode de blanchissement du $\beta$ -carotène (BCB)

La méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène a été utilisée pour l'évaluation de l'activité Antioxydante des trois extraits  $\text{CH}_3\text{Cl}$  et  $\text{CH}_3\text{OH}$  et mélange ( $\text{CH}_3\text{Cl}+\text{CH}_3\text{OH}$ ) de plant lathyrus. La cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en fonction de la présence ou de l'absence des composés phénoliques dans les trois extraits et celle du standard BHA est montrée dans la figure III.9.



**Figure III.9:** Cinétique de l'inhibition de blanchissement du  $\beta$ -carotène par extraits *Lathyrus* et du témoin positif BHA

Le tableau ci-dessous rapporte les valeurs moyennes de trois mesures d'AA % (Coefficient d'activité antioxydants).

**Tableau III.6 :** Activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène des extraits et de standard

| Extrait | Extrait $\text{CH}_3\text{Cl}$ | Extrait $\text{CH}_3\text{OH}$ | Extrait mélange ( $\text{CH}_3\text{Cl}+\text{CH}_3\text{OH}$ ) | BHA        |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|---|------------|
| AA%     | 90.25±3.215                    | 91.02±0.173                    | 67.2±2.880  | 96.4±0.276 |

D'après Les résultats de blanchiment du  $\beta$ -carotène (tableaux) indiquent que les extraits méthanolique, chloroformiques et mélange (chloro+méth) possèdent une activité très similaire avec des % d'inhibition de 91.02% 90.25% 67.2% respectivement mais très modérée comparativement à celle du BHA qui montre un % d'inhibition beaucoup plus important (96,42%).

- Comme le montre la figure, les courbes ont la même allure. En effet, à l'instant  $t=0$  les Valeurs des absorbances des trois extraits ainsi que celle du standard sont très proches et ayant un seuil d'absorbance d'environ 1. Cela s'explique par le fait qu'à ce moment, il n'y a pas

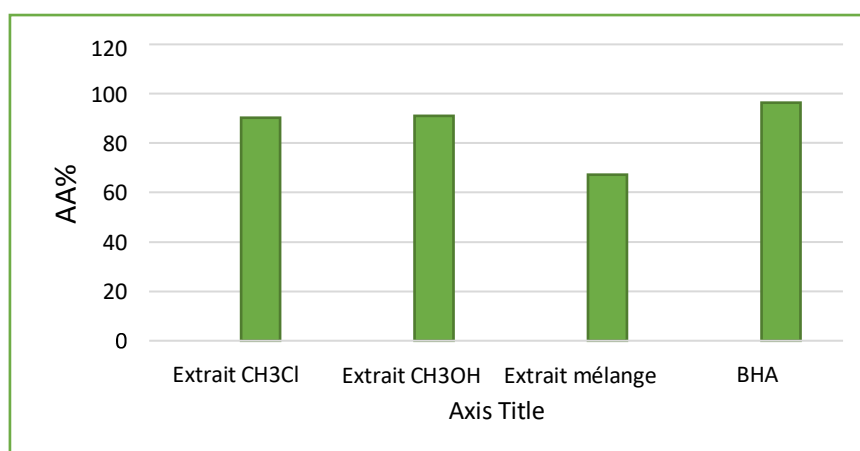


## Chapitre III : Résultats et Discussions

de radical qui a été formé dans le milieu réactionnel [9]. Après 2 heures de réaction, l'absorbance des trois extraits, du standard ainsi que celle du contrôle négatif commence à diminuer progressivement indiquant le début de la formation des radicaux libres dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la dégradation des doubles liaisons par le tween40.

- L'étude de la cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène montre qu'elle diminue progressivement avec le temps, atteignant un état d'équilibre après 48 heures car le nombre de Radicaux libres devient important. Après cette période, la diminution de l'absorbance reste constante indiquant que toutes les doubles liaisons présentes dans le  $\beta$ -carotène sont dégradées, ce qui se termine par l'épuisement irréversible du jaune par la transformation en une couleur blanche. C'est le blanchissement total du  $\beta$ -carotène. [10]

Les résultats d'activités de blanchiment de tous les extraits et du standard sont résumés dans la figure suivante



**Figure III.10 :** Valeur de AA% des trois extraits des *lathyrus* et de composé standard BHA.

## Chapitre III : Résultats et Discussions

### III.1.3. Méthode Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Les résultats du pouvoir réducteur du fer des extraits de la plante *lathyrus* et des standards BHT sont représentés dans les figures III.11 et III.12. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes. À partir de ces courbes nous avons déterminé la valeur A 0,5 en utilisant l'équation des graphes correspondants (Tableau III.7)

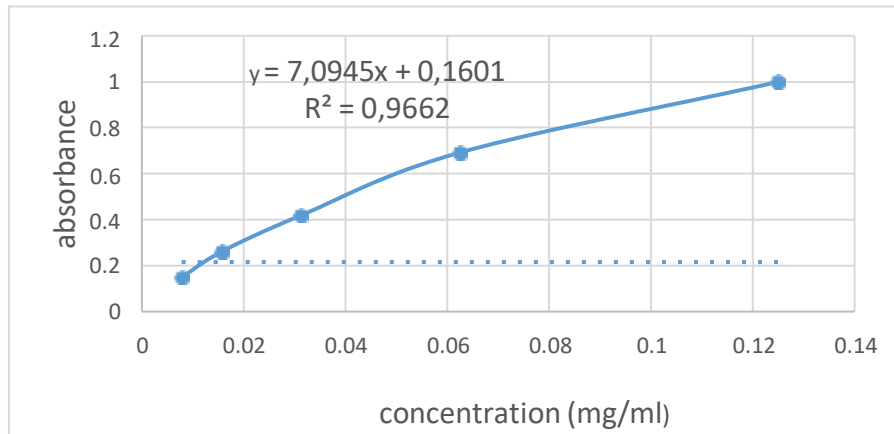
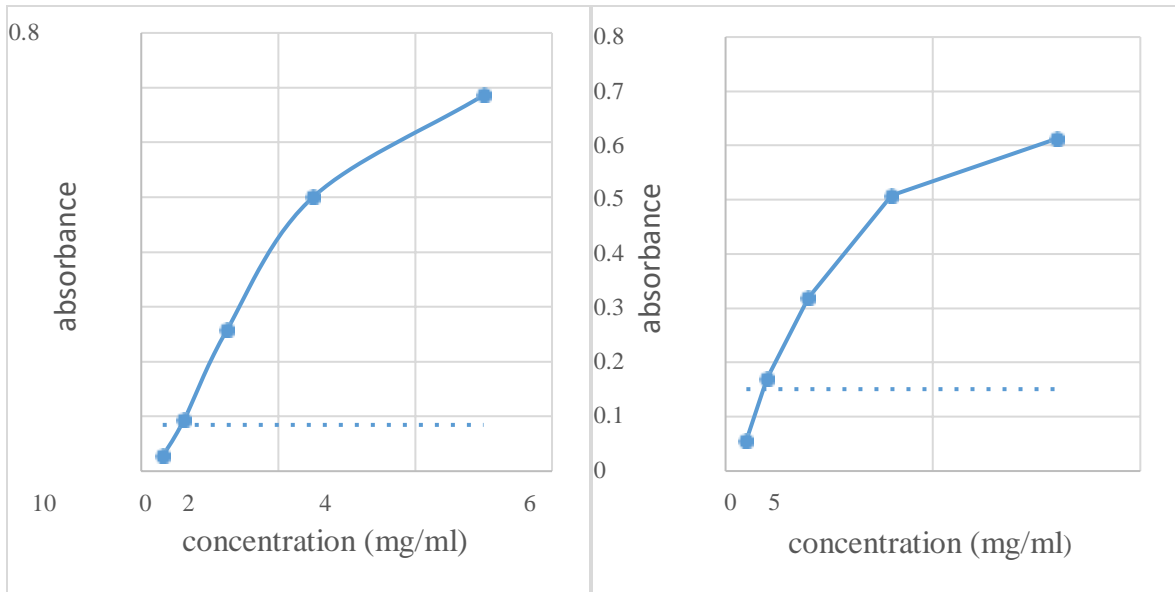


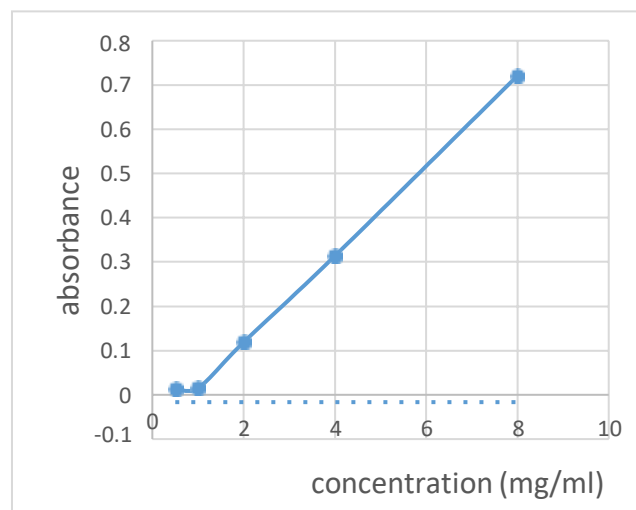
Figure III.11 : Pouvoir réducteur du fer de standards BHT

## Chapitre III : Résultats et Discussions



(1)

(2)



(3)

**Figure III.12 :** Pouvoir réducteur du fer des extraits de la plante *lathyrus*

(1) : extrait chloroforme (2) : extrait méthanol (3) : extrait (CH<sub>3</sub>Cl+CH<sub>3</sub>OH).

Le pouvoir réducteur des extraits a été également exprimé par la détermination de leur concentration efficace (CE<sub>50</sub>) qui correspond à une absorbance égale à 0,5 (Tableau III.8). Il est à noter que l'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur CE<sub>50</sub>.

## Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.7: Les valeurs de EC<sub>50</sub> des extraits

| Extrait                  | Extrait<br>CH <sub>3</sub> Cl | Extrait<br>CH <sub>3</sub> OH | Extrait<br>(CH <sub>3</sub> Cl+CH <sub>3</sub> OH) | BHT        |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|------------|
| CE <sub>50</sub> (mg/ml) | 3.27±0.685                    | 5.47±0.070                    | 4.46±0.049   | 4.79±0.077 |

D'après les graphes nous constatons que l'extrait méthanolique a présenté le plus d'activité pour réduire le fer avec une CE<sub>50</sub>=5.47±0.070mg/ml suivi par l'extrait mélange (CE<sub>50</sub>=4.46±0.049) alors que l'extrait chloroformique a présenté le pouvoir réducteur le plus faible avec une CE<sub>50</sub>=3.27±0.685.

Le BHT sont employés dans cette méthode comme un contrôle positif, ont montré un pouvoir réducteur plus élevé.

Donc Nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des extraits de la plante de lathyruse. et Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et in activateurs des oxydants [10.11]. L'ensemble des résultats obtenus par le test au DPPH et la méthode de blanchissement du β-Carotène et FRAP indique que l'extrait méthanoliques montre un effet antioxydant plus important que les deux extraits chloroformique et mélange, il semble que ce résultat corrèle bien avec leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, il a été reporté que les composés phénoliques, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les groupes les plus importants de métabolites secondaires et de composés bioactifs que comportent les plantes. Ils ont été signalés avoir de multiples effets biologiques, y compris l'activité antioxydant.

Les résultats du pouvoir réducteur de tous les extraits et du standard sont résumés dans l'histogramme suivante

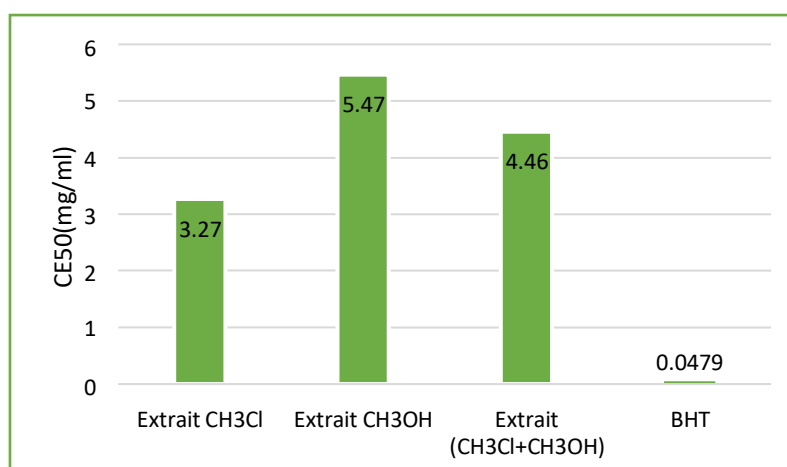


Figure III.13: Pouvoirs réducteurs des extraits bruts des plants *lathyrus*.

## Chapitre III : Résultats et Discussions

### III.2. Résultat de l'évaluation de l'activité antibactérienne

Après 24h d'incubation à 37°C, on a récupéré les boîtes de pétri et on a mesuré les diamètres des zones d'incubation des extraits CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>3</sub>OH, (CH<sub>3</sub>Cl+CH<sub>3</sub>OH) sur les souches bactériennes Testées, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.8

**Tableau III.8 :** Résultats de l'antibiogramme des extraits de la plante *lathyrus* et le témoin positif (gentamicine).

| Zone d'inhibition (mm)        |                    |                    |                                       |            |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|------------|
| Souche bactérienne            | CH <sub>3</sub> Cl | CH <sub>3</sub> OH | CH <sub>3</sub> Cl+CH <sub>3</sub> OH | Témoin (+) |
| <i>Escherichia coli</i>       | -                  | 6,5                | -                                     | 44         |
| <i>Pseudomonas aeruginose</i> | 15,5               | 12                 | 6                                     | 33,5       |
| <i>Staphylococcus Aureus</i>  | 18                 | 11                 | 15,5                                  | 26,5       |
| <i>Basileus cerous</i>        | 17,5               | 16,5               | 16                                    | 24         |

D<8mm (**Résistante**), 9mm>D<14mm (**sensible**), 15mm>D<19mm (**très sensible**), D>20mm (**extrêmement sensible**).

Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en millimètre, 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 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 le germe est très sensible. 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.

Au vu des résultats, la croissance de la souche *Basileus cerous* été inhibée par la plupart des extraits. *Basileus cerous* est la souche la plus sensible avec les trois extraies surtout l'extrait chloroforme (17.5 mm). La souche du *staphylococcus aureus* se comportent différemment dans des diamètres allant de 18 mm à 15.5 mm pour les trois extraits avec une fort sensibilité contre les extraits chloroformique et mélange.

La souche *Pseudomonas aeruginosese* présente un diamètre de 15 mm contre les extrait chloroformique.

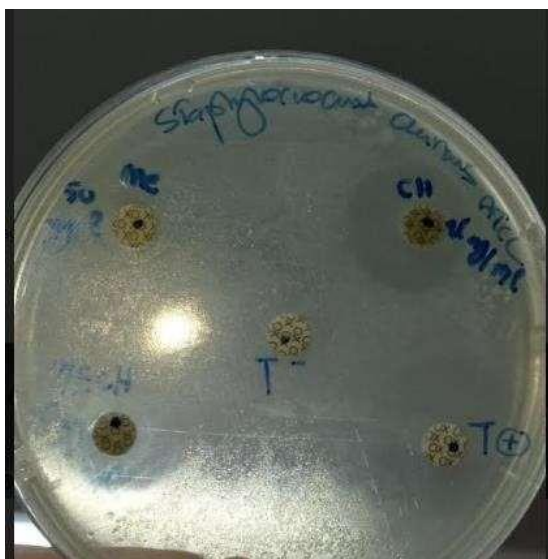
En effet, l'absence de zone d'inhibition dans les boîtes test ensemencées avec *E. coli* et parfois un diamètre ne dépassant pas 9 mm traduit leur résistance à l'extrait étudié.



**Figure III.14:** Activité de *E. coli*



**Figure III.15** Activité de *P.aeruginosese*



**Figure III.16:** Activité de *Staphylococcus Aureus*



**Figure III.17:** Activité de *Bacillus cerous*

### IV. 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

### Chapitre III : Résultats et Discussions

---

métabolites secondaires [12]. Selon Wojdylo *et al.* [13] 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 *lathyrus* sont des sources importantes de composés phénoliques avec une activité antioxydante pertinente [14].

## Référence bibliographique

- [1] 26. Cushnie TPT, Lamb AJ (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoïds. *Internat J Antimicrob Agents* 1–9.
- [2] Mouri.N.F., Latreche.A, Mehdadi.Z., Bengherraz.Z., Activités Antibactérienne De QuatreExtrait 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.
- [3] Ghedira. K., (2005). Les flavonoids: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 3, 162-169.
- [4] Bruneton. J., (1993). *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. 2eme Ed. Lavoisier. Londres. New-York. 625-642.
- [5] Bouchet. N., Lévesque. J., Pousset. J.L., (2000). HPLC isolation, identification and quantification of tanins from *Guiera senegalensis*. *Phytochem*. 11, p.52-55.
- [6] J.B. Harbone, (1988). *introduction to ecological biochemistry*. New York :academic press.
- [7]. Stanković MS (2011) Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L extracts. *Kragujevac J Sci* 33: 63–72.
- [8] Kadri A, Zarai A, Békir A, et al (2011) Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10(19): 3908–14.
- [9] Ghedadba N, Bousselela H, Hambaba L, et al (2014) Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12:15–2
- [10] Su MS, Shyu YT, Chien PJ (2008) Antioxydant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem* 111: 892–6.
- [11] Liuk L, Sun Y, Laura T, et al. (2009) Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chem* 112: 35–41.
- [12] Ben Abdallah, D. Frikha, S. Maalej, S. Sassi, 2019, Evaluation In Vitro De L'activités AntiBactérienne Et Anti Fongique De Quatre Espèces Algales Marines, *J. I Sfax*. N° 31, 2019, 38- 44.
- [13] Falleh, H., et al., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 2008. 331(5): p.372-379.



[14] Wojdyło, A., J. Oszmiański, and R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007. 105(3): p.940-949.

## Conclusion générale

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Ce travail a pour objectif d'étudier la composition chimique et l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes d'une fabacées Algérienne du genre *lathyrus*

L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et tanin était conséquent.

Les résultats de l'analyse quantitative montrent que la teneur de flavonoïde dans l'extrait est moyenne.

L'activité antioxydant des différents extraits de genre *lathyrus* a été évaluée par trois méthodes : le test blanchissement du  $\beta$ -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH, et la technique de réduction du fer (FRAP). Pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation du  $\beta$ -carotène. En effet, la capacité antioxydant la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de méthanol. Pour le test de réduction du radical libre DPPH, l'activité anti radicalaire est élevée dans l'extrait le plus polaire (extrait méthanolique), par contre elle est faible pour les deux autres extraits.

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 la fraction méthanol a une activité plus élevée par rapport aux deux autres extraits.

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 *E. Coli* qui manifeste une résistance pour tous les extraits.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

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 antioxydant et antimicrobienne des extraits de cette plante.