



UNIVERSITE BLIDA 01
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire Présenté Par

AZZOUNE Farid

MEBREK Yasser

En vue de l'obtention du diplôme de Master (LMD)

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Naturels

Titre

**Screening phytochimique et dosage des polyphénols
totaux des extraits de l'espèce Lotus Corniculatus
(Fabaceae)**

Devant le jury

O. Touafek	Pr	Président	Université Blida 1
R. Boukaabache	MCB	Examinatrice	Université Blida 1
A. Mezrag	MCB	Promoteur	Université Blida 1

Promotion : 2019/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

En tout premier lieu, nous remercions Dieu pour être notre meilleur confident, merci de nous avoir guidés, de nous avoir donné aussi la volonté et la force pour dépasser toutes les difficultés pour la réalisation de ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Nous tenons remercier tout d'abord à notre promotrice Monsieur Abderrahmane MEZRAG, qui nous a dirigées tout au long de ce travail, pour ses conseils, sa confiance et pour ses directives les plus précieuses, pour sa gentillesse, sa disponibilité.

Nous tenons également à remercier notre chef d'option Mme O.Touafek pour sa patience, compréhension ainsi que sa gentillesse.

Ainsi l'enseignement dispensé par le Master « CPN » a également su nourrir nos réflexions, merci donc aux enseignants-chercheurs.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.



Dédicace

Avec ma gratitude mon amour, je dédie ce travail à :
A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études
A mes chères sœurs : Asma, Sarah, et Nesrine pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral
A mes chers frères : Mossaab, Mohamed, Salim, pour leur appui et leur encouragement
A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

A mon binôme : Farid
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible
Merci d'être toujours là pour moi.

MEBREK Yasser





Dédicace



Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à :
Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect, j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.

Mes très chers frères et sœur : F-Zohra, Yasmine, Ibrahim et la petite Zineb.

A mon binôme Yasser

Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts Et un spécial merci pour Redha BOUZIDA qui m'a beaucoup aidée dans le design.

Tous mes amies pour les moments que nous avons vécu ensemble.

AZZOUNE FARID





Résumé



Lotus coniculatus est une plante vivace de la famille des fabaceae du genre *lotus*. C'est une espèce largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols.

L'intérêt de notre étude est de contribuer à l'analyse phytochimique et le dosage des polyphénols totaux de la partie aérienne de l'espèce *lotus coniculatus* récoltée dans la région de Constantine. Afin d'identifier les classes phytochimiques majoritaires présentes dans les différentes parties de la plante, nous avons eu recours à des tests phytochimiques par plusieurs tests qualitatifs basés sur des phénomènes de précipitation ou de coloration à l'aide des réactifs spécifiques. Les résultats de ce screening phytochimique montrent la richesse de cette plante en composés phénoliques,

La quantification des polyphénols totaux des extraits de l'espèce *lotus coniculatus* a été réalisée par la méthode spectrophotométrie. Cette étape a montré une teneur très élevée en polyphénols dans l'extrait brut de cette espèce

Mots clés

Phytochimique, Polyphénols, Spectrophotométrie.

Abstract

lotus coniculatus L. a perennial plant of the family *fabaceae* of the genus *lotus* is a species widely used in traditional medicine for its biological properties attributed mainly to polyphenols.

The interest of this study is to contribute to the phytochemical analysis and the determination of total polyphenols from the aerial part of *lotus coniculatus* harvested in the constantine region.

To identify the most importante phytochemical classes in different parts of the plant we have been using phytochemical tests by several qualitative methods based on precipitation phenomena or staining with specific reagents. The results of phytochemical tests show the richness of this plant in phenolic compounds,

Quantification of the total polyphenols of the extract was performed by spectrophotometry method.

This step showed a very high polyphenol content in the crude extract of this species

Key words:

Phytochemical, Polyphenols, Spectrophotometry

ملخص :

اللوتس كورنيكولاتوس هو نبات معمر في عائلة فاباسيا من جنس اللوتس، وهو نوع يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لخصائصه البيولوجية المنسوبة أساسًا إلى مادة البوليفينول. تكمن أهمية دراستنا في المساهمة في التحليل الكيميائي النباتي وتحديد البوليفينول الكلي للجزء الجوي من نوع لوتس كورنيكولاتوس التي تم جمعها في منطقة قسنطينة من أجل تحديد الفئات الكيميائية النباتية الرئيسية الموجودة في الأجزاء المختلفة من النبتة.

لقد استخدمنا الاختبارات الكيميائية النباتية من خلال عدة اختبارات نوعية تعتمد على الترسيب أو ظواهر التلوين باستخدام كواشف محددة.

تظهر نتائج هذا الفحص الكيميائي النباتي ثراء هذا النبات في المركبات الفينولية، تم إجراء القياس الكمي لمجموع البوليفينول من مستخلصات من اللوتس كورنيكولاتوس باستخدام طريقة القياس الطيفي. أظهرت هذه الخطوة نسبة عالية جدًا من مادة البوليفينول في المستخلص الخام لهذا النوع.

الكلمات الدالة

الكيمياء النباتية، البوليفينول، قياس الطيف الضوئي.

Abréviation

EtOH : ethanol

HCl : Acide chlorhydrique

NaOH : Hydroxyde de sodium

KOH : Hydroxyde de potassium

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

CHCl₃ : Chloroforme

MeOH : Méthanol

n-BuOH : n butanol

Me : Methyl(-CH₃)

g : Gramme

UV : Ultra violet.

AG : acide gallique

EAG : équivalent d'acide gallique,

ES : poids sec de l'extrait.

L : lotus



Liste Des Figures



Figure 1 Carte de répartition géographique des Fabaceae d'après Heywood (1996) . _____	3
Figure 2 répartition géographique de l'espèce <i>Lotus corniculatus</i> L. _____	18
Figure 3 évaporation de solution hydroalcoolique. _____	25
Figure 4 Schéma d'extraction de la plante <i>lotus coniculatus</i> _____	26
Figure 5 Protocole de dosage des polyphénols totaux _____	30
Figure 6 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique _____	35
Figure 7 Le contenu total en polyphénols des extraits de l'espèce <i>lotus coniculatus</i> (mg EAG/g PS) _____	36



Liste Des Tableaux



Tableau 1 <i>Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique.</i>	3
Tableau 2 <i>Quelques flavonoïdes isolés du genre lotus</i>	9
Tableau 3 <i>Divers composés isolés du genre lotus</i>	12
Tableau 4 <i>Classification de Lotus corniculatus L.</i>	17
Tableau 5 <i>composés isolés de l'espèce lotus corniculatus L.</i>	19
Tableau 6 <i>Résultats du screening chimique</i>	32
Tableau 7 <i>Résultats de l'extraction</i>	35
Tableau 8 <i>Résultats du dosage des polyphénols</i>	36



Sommaire



Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des abréviations

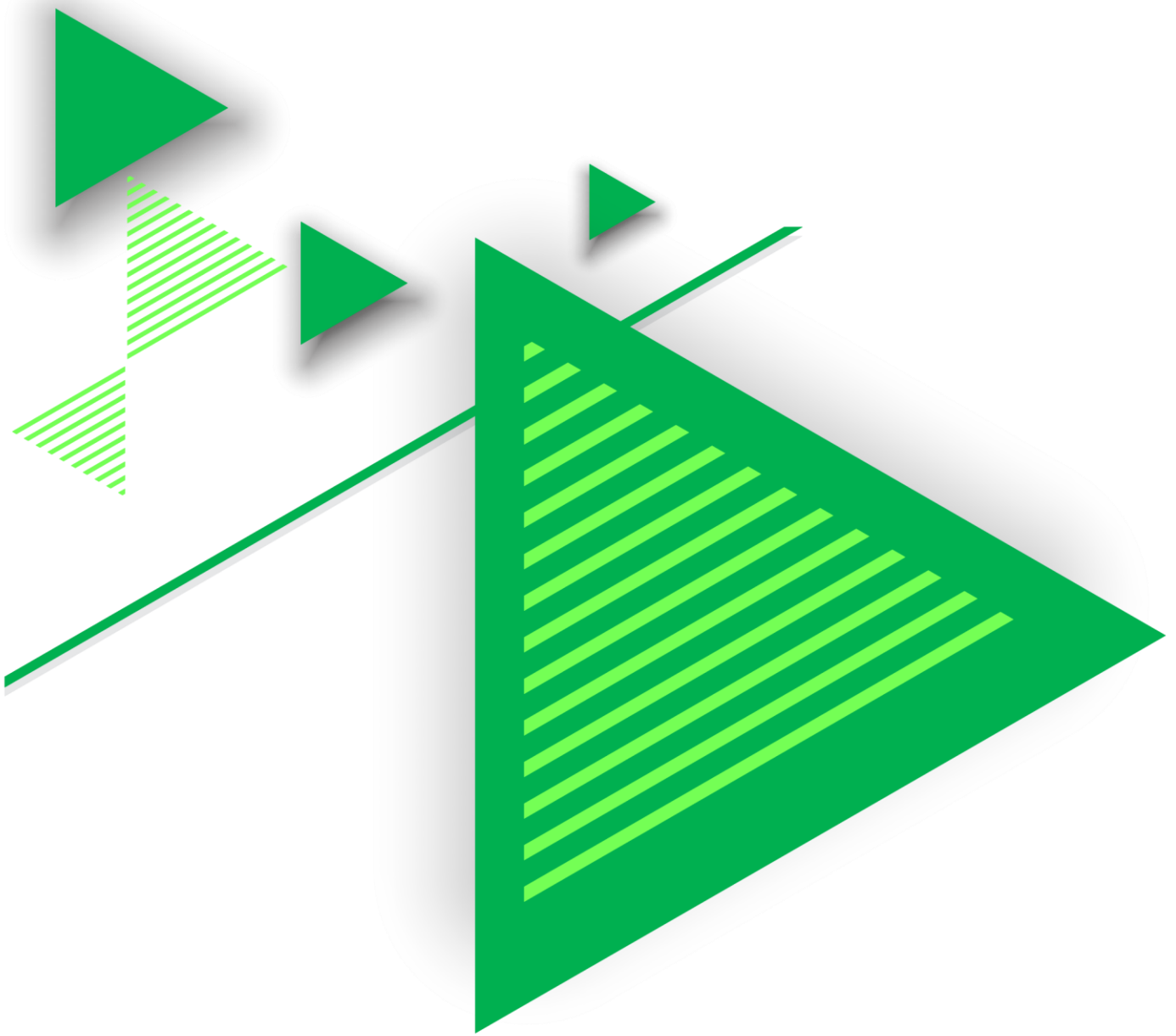
Liste des figures

Liste des tableaux

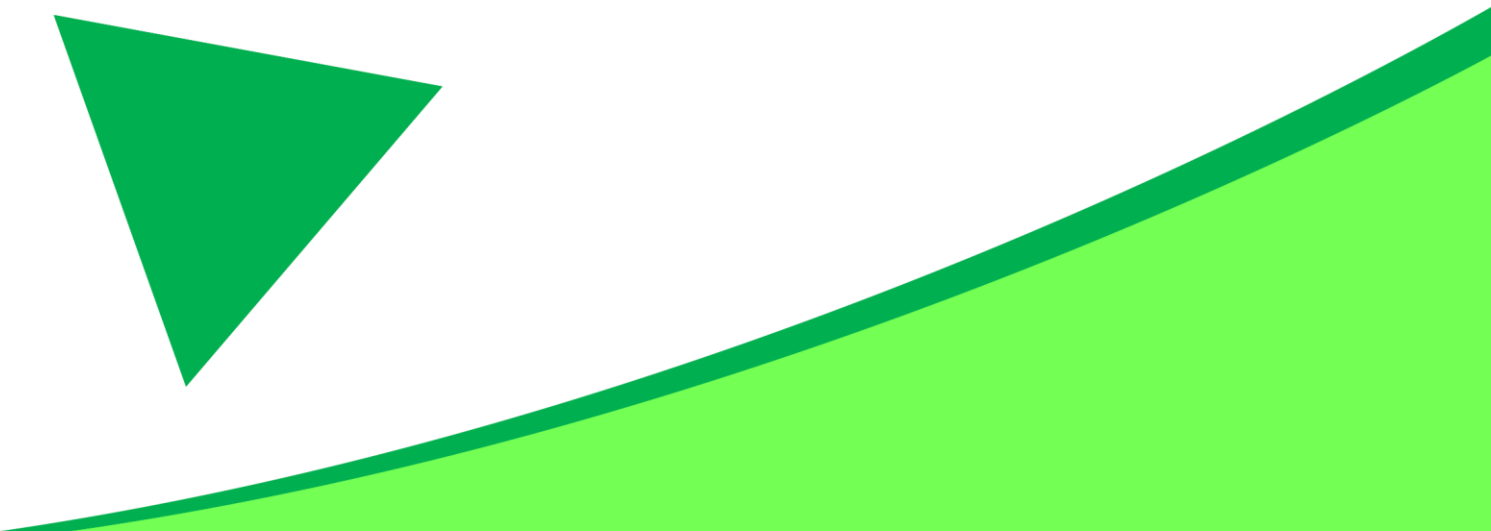
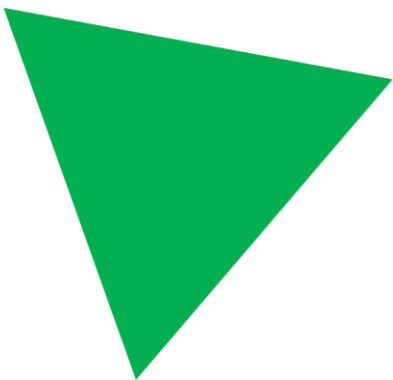
Introduction Générale	1
Chapitre I Etude Bibliographique	2
I. Généralités sur la famille des Fabaceae	2
I.1 L'ordre de Fabales	2
I.2 Aspects généraux	2
I.3 Position systématique de la famille des Fabaceae	2
I.4 Distribution géographique	3
I.5 Description botanique des fabacées	4
I.6 Importance économique	4
I.7 Intérêt thérapeutique des Fabacées	5
I.8 Intérêt dans la médecine contemporaine	6
I.9 Toxicité des Fabacées	7
II Présentation du genre Lotus	8
II.1 Toxicité	8

II.2 Usage traditionnel _____	8
II.3 Caractère chimique du genre Lotus _____	9
II.3.1 Les flavonoïdes _____	9
II.3.2 Autres composés _____	12
III. Etude phytochimique de l'espèce <i>Lotus corniculatus</i> : _____	16
III.1 Description et caractéristiques botanique de l'espèce <i>L.corniculatus</i> _____	16
III.2. Place dans la systématique botanique : _____	17
III.3. Noms communs _____	17
III.4. Habitat et répartition _____	17
III.5. Sous-espèces : _____	18
III.6. Utilisation médicale _____	18
Chapitre II Partie Expérimentale _____	23
Introduction : _____	23
I. Récolte du matériel végétal : _____	23
II. Méthodes d'extraction _____	23
II.1 La première méthode _____	23
II.1.1 préparation de l'extrait hydro alcoolique (HA) _____	23
II.1.2 préparation de l'extrait chloroformique (C) _____	24
II.1.3 préparation de l'extrait éthérique (E) _____	24
II.1.4 préparation de l'extrait sulfurique (S) _____	24
II.2 La deuxième méthode _____	25
III. Méthodes d'analyse phytochimique des extraits _____	27
III.1 Qu'est-ce que le screening phytochimique _____	27
III.2 Caractérisation générale des extraits de l'espèce lotus coniculatus _____	27
III.2.1 Détection des flavonoïdes : _____	27

III.2.1.1 Détection des flavonols et flavanones (Test de Wilstater)	27
III.2.1.2 Détection des flavon3,4 diols (Test de bate-smith) :	27
III.2.2 Détection des coumarines :	27
III.2.3 Détection des Quinones :	28
III.2.4 Détection des Anthraquinones :	28
III.2.5 Détection des des Alcaloïdes	28
III.2.6 Détection des saponines	28
IV. Dosage des polyphénols totaux	29
IV.1 Principe	29
IV.2 Protocole	29
Chapitre III Résultats Et Discussion	31
Introduction	31
I. Les résultats du screening phytochimique	31
II. L' extraction	35
III. Dosage des polyphénols :	35
Conclusion Générale	37



Introduction Générale



Introduction générale

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux [1].

L'utilisation des plantes en thérapeutique est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt. Il est possible d'utiliser ces plantes entières ou alors des produits d'extraction qu'elles peuvent fournir [2].

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethno-pharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles et une approche chimio-taxonomique [3].

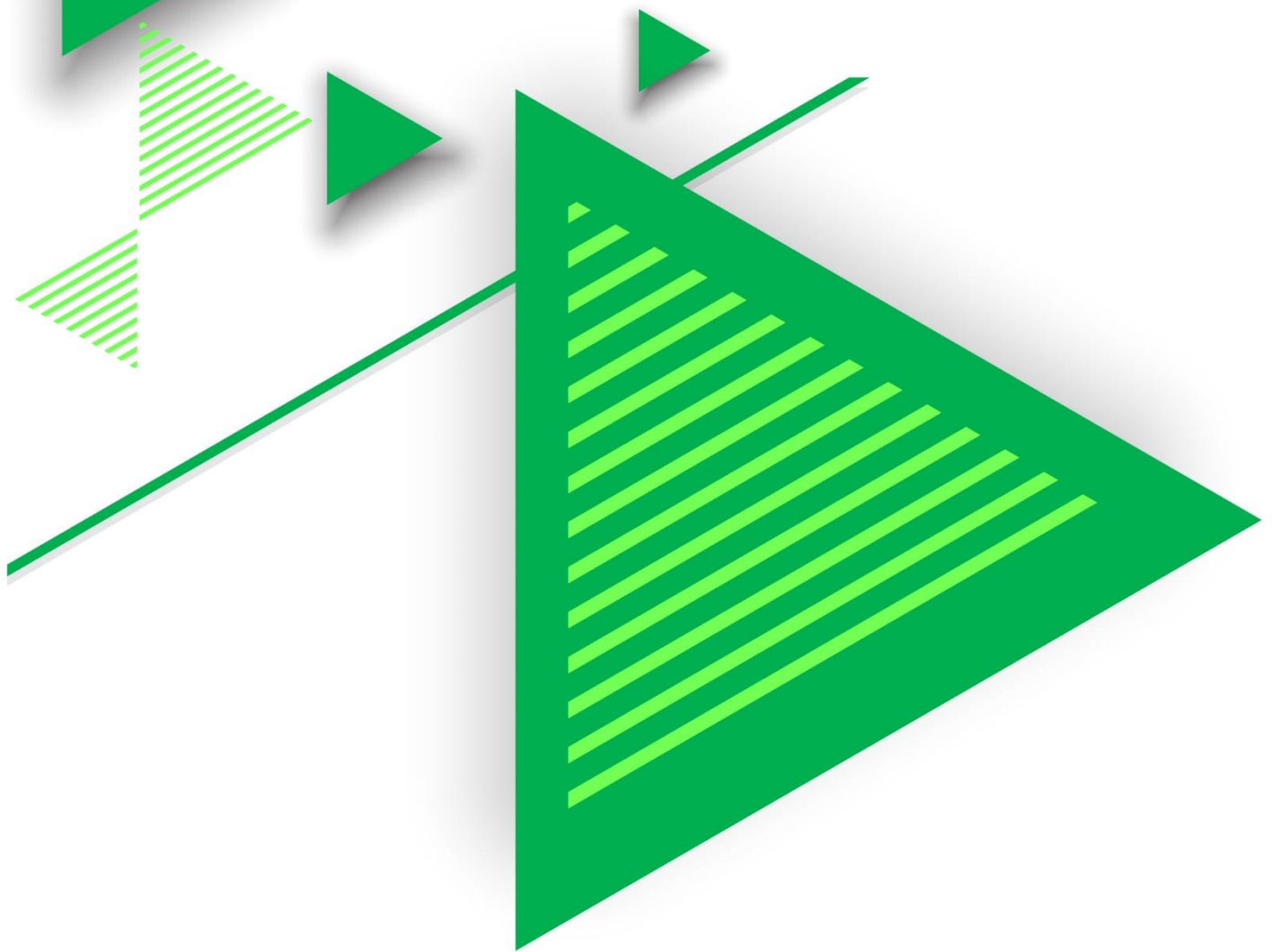
L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne. Il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales [4].

La flore algérienne qui fait partie de la flore africaine, estimée à plus 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne et saharienne. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15 %) d'espèces endémiques [5, 6].

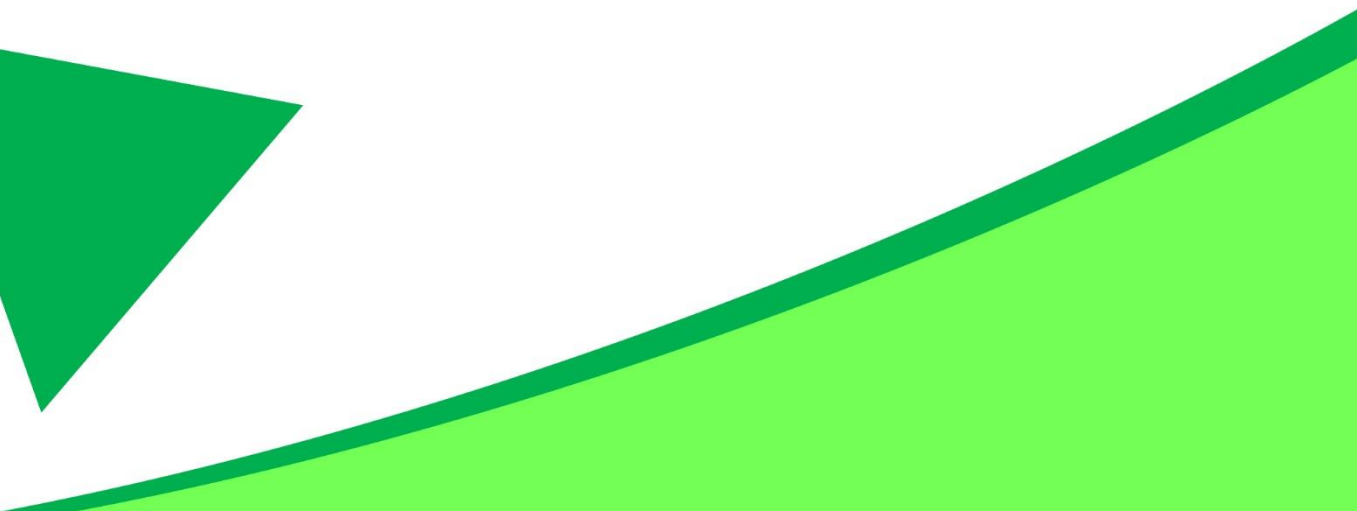
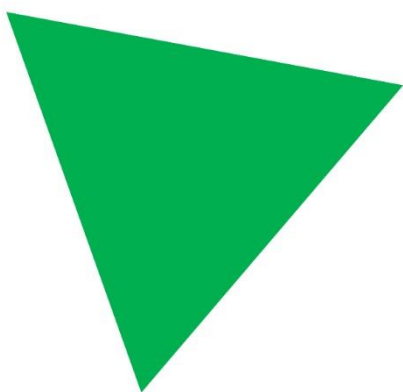
Notre mémoire est constitué de trois chapitres :

- le premier chapitre, d'ordre général est consacré à l'étude botanique de la famille des Fabaceae (classification, description), répartition géographique et à leur utilisation thérapeutique. Ainsi que les métabolites secondaires les plus courants chez les fabacées
- le deuxième chapitre, est consacré à la présentation de nos travaux personnels
- Le troisième chapitre consiste une analyse des résultats obtenus et une discussion qui mettra l'emphasis sur leur signification par rapport aux données de la littérature. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale.

Chapitre I



Étude Bibliographique



I. Généralités sur la famille des Fabaceae

I.1 L'ordre de Fabales

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 19 000 espèces. Les familles principales sont les Fabaceae, les Polygalaceae, les Surianaceae. Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Genista ulicina* que nous avons étudiée [7]

I.2 Aspects généraux

La famille Fabaceae ou Légumineusae est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs après la famille Orchidaceae et la famille Asteraceae, avec 730 genres et plus de 19 400 espèces. Elle regroupe de très nombreuses plantes qui poussent dans le monde entier. Leur emploi est très développé dans divers secteurs économiques : pharmaceutiques, agricoles, agroalimentaires, paysagers et horticoles [8].

Cette famille représente une part importante de l'alimentation humaine, de nombreuses espèces sont utilisées comme sources de protéine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille, etc.). Gaston Bonnier écrivait en 1905 dans son cours de botanique : « La famille des légumineuses est une des plus importantes 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. » [9].

I.3 Position systématique de la famille des Fabaceae

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques. Quatre sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabacées : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae, les Bauhinioïdes, et les Faboideae (= Papilionoideae). Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Dans la plupart des classifications, ces groupes sont considérés comme des sous-familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN). [8] [10]. La position systématique des Fabaceae est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique [11] [12] [13] [14].

	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APGIII (2009)
Règne	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Embryophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Spermatophytae</i>	<i>Spermatophyta</i>
Sous-branchement	<i>Angiospermae</i>	-	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledonae</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliidae</i>	<i>Eudicotyledonae</i>
Sous-classe	<i>Archichlamydeae</i>	<i>Rosidae</i>	<i>Rutanae</i>	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>	<i>Fabales</i>	<i>Rutales</i>	<i>Eurosidae I</i> (= <i>Fabidées</i>)
Sous-Ordre	<i>Leguminosineae</i>	-	<i>Fabineae</i>	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Leguminosae</i>	<i>Fabaceae</i> = <i>Papilionaceae</i> <i>Mimosaceae</i> <i>Caesalpiniaceae</i>	<i>Fabaceae</i>	<i>Fabaceae</i> (= <i>Leguminosae</i>)
Sous- Famille	<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinoideae</i>		<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinoideae</i> <i>Swartzioideae</i>	<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinoideae</i> <i>Bauhinioides</i>

I.4 Distribution géographique

Originaires d’Afrique, de Chine, d’Indonésie, d’Europe, d’Amérique du Sud et cultivées depuis plus de 6000 an, Les Fabaceae constituent la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (figure 1). Cette famille s’accommode d’une très large gamme d’habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles [15].



Figure 1 Carte de répartition géographique des Fabaceae d’après Heywood (1996) [15].

I.5 Description botanique des fabacées

La famille Fabaceae étant extrêmement vaste, nous allons nous intéresser pour la suite, plus particulièrement à la sous-famille Faboideae qui est la plus importante de la famille. En effet, elle compte plus de 300 genres, dont une vingtaine représente la flore saharienne [16].

Les caractères morphologiques principaux des Faboideae sont les suivants :

Feuilles : rarement simples, formées de plusieurs folioles (généralement au nombre de trois).

Fleurs : de type « papilionacé », corolle est plus nettement irrégulière, les deux pétales inférieurs sont soudés en une pièce unique dite carène.

Fruits : Gousse ou légume (fruit sec, déhiscent par deux fentes).

I.6 Importance économique

Les Fabacées, et plus particulièrement la sous-famille des Faboideae, ne seraient dépassées que par les Poaceae dans un classement des familles par importance économique. De nombreuses plantes alimentaires, mais aussi des plantes fourragères, ornementales ou encore médicinales de premier ordre appartiennent à cette sous-famille. Il est néanmoins important de noter que de nombreux genres sont hautement toxiques [7] [10] [15][17].

Une grande quantité de graines et de cosses de diverses espèces herbacées de Faboideae, communément appelées légumineuses ou légumes secs, sont une source alimentaire universelle autant humaine qu'animale. Ces plantes alimentaires de grande consommation comprennent entre autres *Arachishypogaea L.* (l'arachide ou cacahuète), *Cajanuscajan (L.) Millsp.* (lepoïd d'Angole), *Cicer arietinum L.* (le pois chiche), *Dolichoslablab L.* (le pois indien), *Glycine max Merr.* (le soja), *Glycyrrhizaglabra L.* (la réglisse), *Lens* (les lentilles), *Phaseolus* (les haricots), *Pisum* (les pois) et *Vicia* (les fèves). Ces espèces sont cultivées dans le monde entier. Elles sont recherchées pour leur haute teneur en protéines et en minéraux.

Certains genres font l'objet d'un usage ornemental. Les plus connus étant *Cytisus* (les gènets), *Laburnumanagyroides Medik.* (La pluie d'or ou Cytise à grappes), *Lathyrus* (les gesses), *Lupinus* (les lupins), *Wisteria* (les glycines) et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes, *Genista tinctoria L.* ou genêt des teinturiers, de même que certaines espèces d'Indigofera dont est tirée la teinture d'indigo [10] [15].

De nombreuses plantes Faboideae ont joué un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique, notamment comme source de matière première à l'image de la lécithine de *Glycine max* Merr., présente dans toutes les cellules vivantes et qui est un constituant important des cellules nerveuses et cérébrales. Plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses plantes Faboideae. On citera la spartéine, cet alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolé de *Cytisus scoparius* (L.) Link ou la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolé de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigma venenosum* Balf. Cette dernière qui est un inhibiteur réversible des cholinestérases, est utilisée comme antidote lors de l'intoxication par les parasympholytiques. Elle est aussi testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [17].

I.7 Intérêt thérapeutique des Fabacées

De nombreuses espèces appartenant à la famille des fabacées possèdent des propriétés thérapeutiques. Les exemples suivants peuvent nous faire prendre conscience de l'utilité des Fabacées dans des domaines d'applications thérapeutiques. Dans ce qui suit, on citera quelques exemples de Fabacées ayant un usage thérapeutique traditionnel [18][19] [20] [21] [22] [23].

- Les graines de fenugrec, riches en mucilages et en tannins, ont longtemps été employées pour la confection de cataplasmes émollients et pour prendre du poids.
- La gomme extraite du caroubier est employée comme adjuvant des régimes amincissants car, tout en ayant un fort caractère épaississant, il est totalement dénué de pouvoir nutritif.
- Les Sénéés (fruits et folioles) produits à partir de *Cassia acutifolia* et *C. angustifolia* ont des propriétés laxatives dues à des dérivés anthracéniques.
- La pulpe de tamarin, aux mêmes propriétés mais aux constituants différents, a la même utilisation.
- L'oléorésine de *Copaifera*, servant à la confection du baume de Copahu, a longtemps eu une réputation internationale dans le traitement de la gonorrhée.
- Le baume du Pérou est employé en usage externe comme cicatrisant et antiseptique ; il contient 6 à 8% de benzoates et près de 60% de « cinnaméine » (mélange de benzoates et de cinnamates de benzyle et de cinnamyle). Il est très employé dans la fabrication de cosmétiques et de produits d'hygiène.

- Le baume de Tolu renferme sensiblement les mêmes composés ; il est employé en usage interne comme antiseptique et expectorant.
- Les rameaux de *Cytisus scoparius* contiennent un alcaloïde, la spartéine, qui présente des activités analeptique et cardiaque. La plante renferme aussi des amines aromatiques dont l'hydroxy tyramine aux propriétés vasoconstrictrice et hypertensive.
- La racine de la réglisse, *Glycyrrhiza glabra*, contient des saponosides et des flavonoïdes et présente des activités anti-inflammatoire, expectorante et antispasmodique ; plus récemment, une activité oestrogénique a été mise à jour.

I.8 Intérêt dans la médecine contemporaine

Les composés d'origine végétale possédant des propriétés comparables à celles exercées par les œstrogènes, sont qualifiés de « phytoœstrogènes ». Ces propriétés ouvrent la perspective d'applications thérapeutiques ou curatives pour les dérèglements hormonaux, les traitements de substitution hormonale ou encore les cancers hormono-dépendants. Des investigations phytochimiques menées sur les végétaux ont montré que les phytoœstrogènes, notamment les isoflavones, sont essentiellement contenues dans les Fabacées [24] [25].

Le soja est certainement l'exemple sur lequel on a fait le plus de publicité dernièrement. Très récemment, divers extraits de Fabacées ont été évalués pour leurs propriétés œstrogéniques [18] sur une lignée cellulaire tumorale œstrogéno-dépendante, la lignée MCF-7. Il est apparu que les extraits de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Vignaradiata*, *Puerarialobata* et *Trifolium pratense* présentent une affinité préférentielle vis-à-vis des récepteurs ERœstrogéniques, les deux derniers extraits présentent les résultats les plus probants. Les substances actives ont été identifiées comme étant la dizaine, la génistéine et la génistine, et les résultats confortent donc les propriétés déjà reconnues de ces isoflavones.

I.9 Toxicité des Fabacées

Des intoxications se produisent de façon directe ou indirecte par certains métabolites secondaires présents dans certaines espèces de la famille Fabaceae [26].

- Des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans des espèces du genre *Crotalaria*, en particulier *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 du 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.
- Contamination suite à la présence de champignons du type *Aspergillus* développés sur les graines en cas d'humidité, et qui élaborent des aflatoxines cancérogènes.
- La principale allergie alimentaire est celle à l'arachide (*Arachis hypogaea*) à cause des allergènes présents dans les graines (cacahuètes), mais aussi dans l'huile et le beurre d'arachide.
- Maladie du 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.
- La glycyrrhizine de la réglisse, présente une action minéralo-corticoïde, qui se traduit par une rétention de sodium et d'eau, accompagnée d'une perte de potassium. Cela provoque un œdème au niveau de la face, des anomalies cardiaques, d'où un risque d'hypertension

II Présentation du genre Lotus

Le genre Lotus, avec 120-130 espèces, est le plus grand genre de la tribu Loteae [27]. Il est largement distribué autour de la Méditerranée. Ce genre comprend des plantes annuelles et vivaces avec une racine pivotante ramifiée forte Il est représenté en Algérie par 15 espèces : *Lotus conimbricensis* Brot, *L. glinoides* Del, *L. edulis* L, *L. drepanacarpus* Dur, *L. ornithopodioides* L, *L. roudairei* Bonnet, *L. jolyi* Batt, *L. creticus* L, *L. pedunculatus* Cav, *L. palustris* Willd, *L. corniculatus* L, *L. parviflorus* Desf, *L. hispidus* Desf, *L. pusillus* Medik. Et *Lotus angustissimus* L [11].

Il possède les caractères suivants :

- Calice à 5 dents presque égales ou à 2 lèvres, ovaire multi ovulé, gousse linéaire déhiscente non ailée sur les sutures.
- Feuilles trifoliées et stipulées.
- Fleurs jaunes, blanchâtres ourosées.

II.1 Toxicité

Les espèces *Lotus jolyi* Batt et *L. arabicus* L. (vesce d'égypte) sont toxiques pour les animaux (chevaux, moutons, chèvres, dromadaires). Plusieurs cas d'intoxication de bétail par *Lotus jolyi* ont été observés au Maroc. Les symptômes de l'intoxication sont les suivants : météorismes, inappétence, immobilité de l'animal [28].

II.2 Usage traditionnel

L'espèce *Lotus jolyi* Batt est utilisée, en cataplasmes, avec de l'ail haché et de l'huile d'olive, pour faire pousser les cheveux. Cependant, en phytothérapie, il est connu que *Lotus corniculatus* est un antidépresseur naturel qui agit également sur l'hypertension artérielle et certaines de ses conséquences. Il agit aussi sur la production par le cœur d'une hormone qui augmente la pression artérielle [29].

II.3 Caractère chimique du genre Lotus

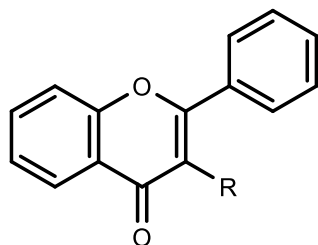
II.3.1 Les flavonoïdes

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre lotus, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires, Les flavonoïdes sont des composés largement répandus dans le genre lotus [30].

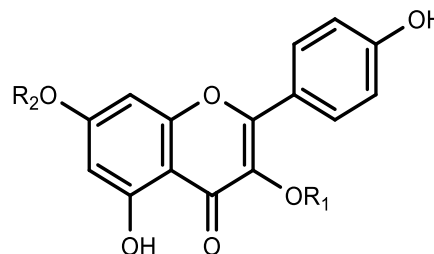
L'ensemble des flavonoïdes isolés du genre lotus est rassemblé dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 Quelques flavonoïdes isolés du genre lotus

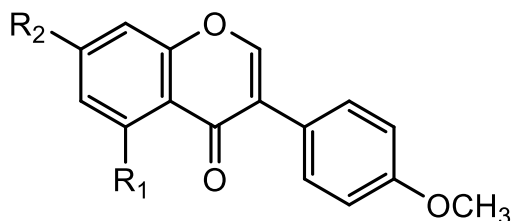
Espèces	Structure	Référence
<i>L. tenuis</i>	<u>1</u> , <u>2</u> , <u>3</u> , <u>4</u> , <u>5</u> , <u>6</u> , <u>7</u>	[29]
<i>L. creticus</i>	<u>8</u> , <u>9</u> , <u>10</u> , <u>11</u>	[30] [29]
<i>L. polyphyllus</i>	<u>12</u> , <u>13</u> , <u>14</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> , <u>18</u> , <u>19</u> , <u>20</u> , <u>21</u> , <u>22</u> , <u>23</u> , <u>24</u> , <u>25</u>	[31]
<i>L. hispidus</i>	<u>26</u> , <u>27</u> , <u>28</u>	[32]
<i>L. pusillus</i>	<u>11</u>	[33]
<i>L. pusillus</i>	<u>19</u>	[43]



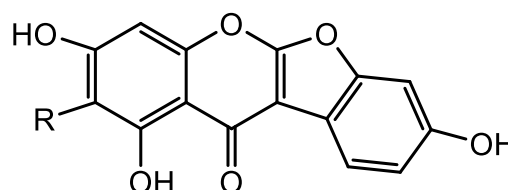
1 (R=H)
2 (R=OH)



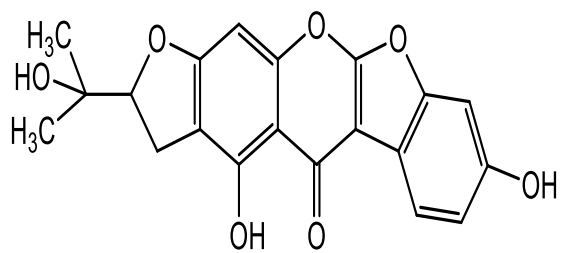
3 (R1=H, R2= Glu)
4 (R1 = Glu, R2= H)
5 (R1= Rha, R2= Rha)
6 (R1= H, R2= Rha)
7 (R1= Glu, R2= Rha)



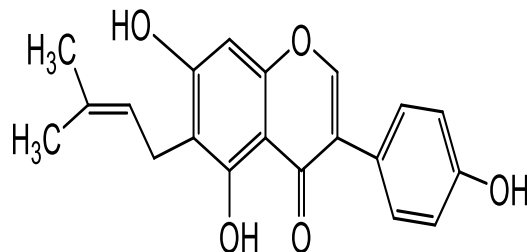
8 (R1=H, R2= OH)
9 (R1=OH, R2= OH)



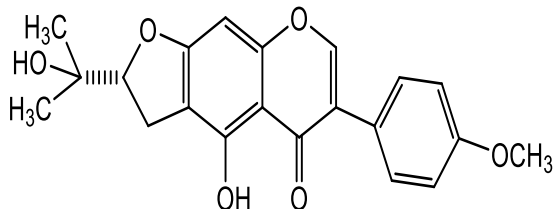
10 (R=H)
11 (R1=C(CH3)2= CH-CH2 -)



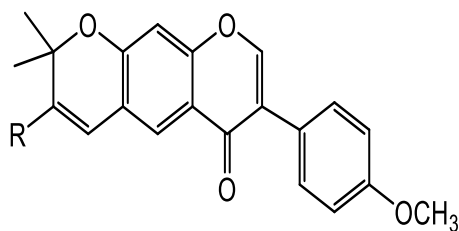
12



13

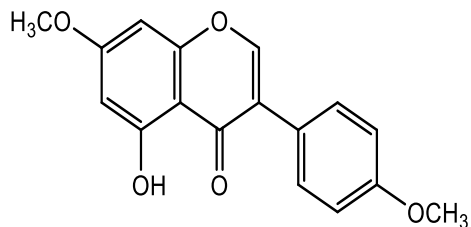


14

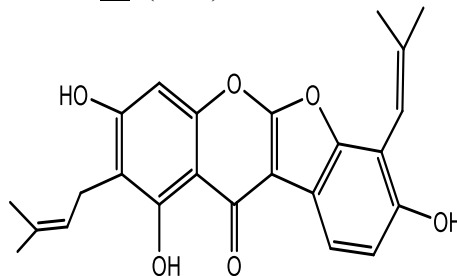


15 (R=OH)

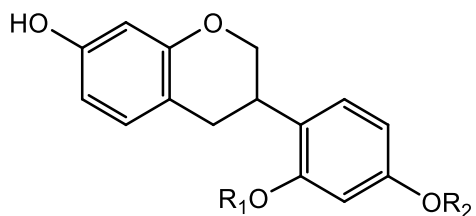
16 (R=H)



17



18

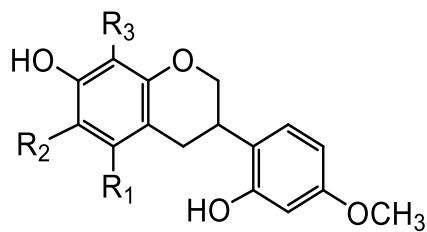


19 (R₁=H, R₂=H)

20 (R₁=OH, R₂=OCH₃)

21 (R₁=R₂=OCH₃)

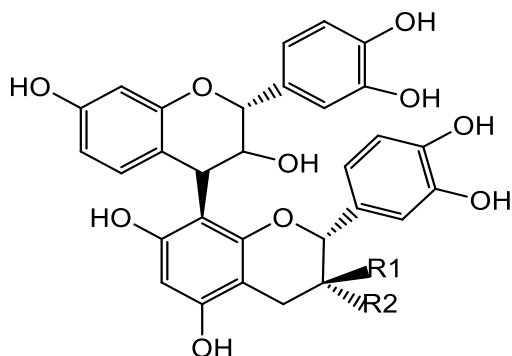
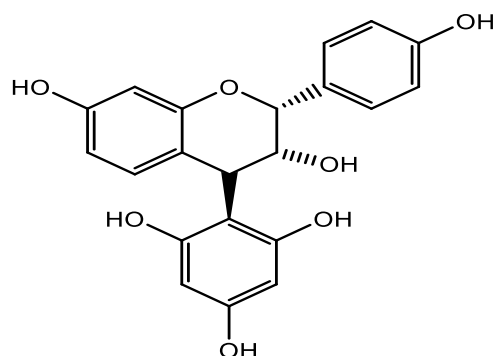
22 (R₁=OCH₃, R₂=H)



23 (R₁=OCH₃, R₂=R₃=H)

24 (R₁=R₃=H, R₂=OCH₃)

25 (R₁=R₂=H, R₃=OCH₃)

26 ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$)27 ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$)28

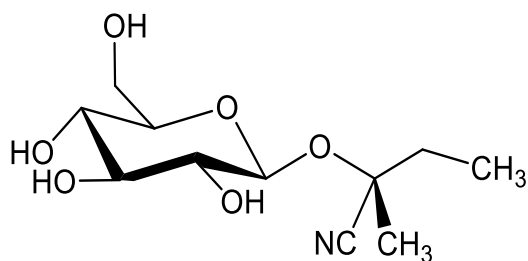
- 1 Flavone
- 2 Flavonole
- 3 Kaempférol-7-*O*- β -glucoside
- 4 Kaempférol-3-*O*- β -glucoside
- 5 Kaempférol-3,7-di-*O*- α -rhamnoside
- 6 Kaempférol-3,7-di-*O*- α -rhamno glucoside
- 7 Kaempférol-7-*O*- α -rhamnoside
- 8 Formononétine
- 9 Biochanine A
- 10 Lupinalbine A
- 11 Lupinalbine B
- 12 Lupinalbine C
- 13 Wightéone-4''-Méthyléthere
- 14 4'-*O*-méthylerythrine C
- 15 4'-*O*-méthyl-2''-hydroxydihydroalpinumisoflavone
- 16 4'-*O*-méthylalpinumisoflavone
- 17 4',7- diméthoxy-5-hydroxyisoflavone
- 18 Lupinalbine F
- 19 Deméthylvestitol (7, 2',4'- trihydroxyisoflavane)
- 20 Vestitol (7,2'-dihydroxy-4'- méthoxyisoflavane)
- 21 Sativane (7-hydroxy-2',4'- diméthoxyisoflavane)
- 22 Isovestitol (7, 4'dihydroxy-2'- méthoxyisoflavane)
- 23 5-méthoxyvestitole
- 24 6-méthoxyvestitole
- 25 8-méthoxyvestitole
- 26 Epicatéchine-(4 β →8)-catéchine
- 27 Epicatéchine-(4 β →8)-épicatéchine
- 28 Epicatéchine-(4 β →2)-phloroglucinole

II.3.2 Autres composés

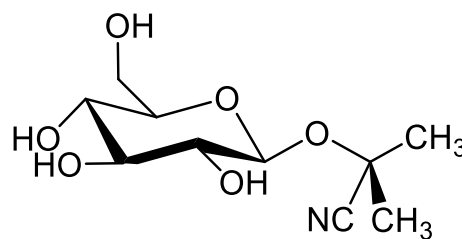
D'autres types de composés ont été isolés et identifiés dans le genre *lotus*. Un certain nombre est cité dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 Divers composés isolés du genre *lotus*

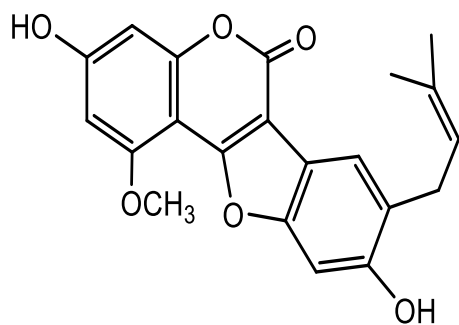
Espèces	Structure	Référence
<i>L. tenuis</i>	33, 34, 35, 36, 37	[34]
<i>L. garcinii</i>	38, 44, 45	[35]
<i>L. lalambensis</i>	39, 40, 41, 42, 43	[36]
<i>L. creticus</i>	29, 30, 31, 32	[37]
<i>L. pusillus</i>	46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53	[43]



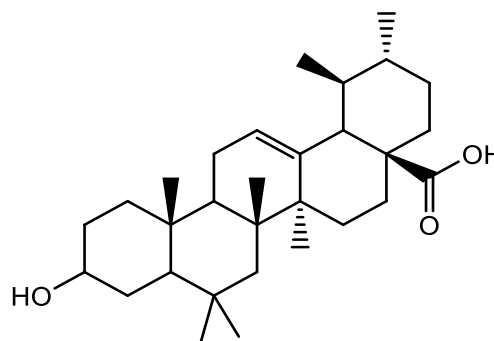
29



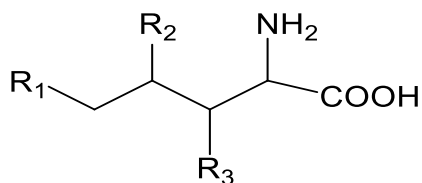
30



31



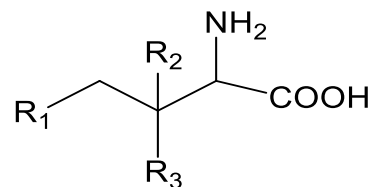
32



33 R₁= NH₂, R₂= R₃=H

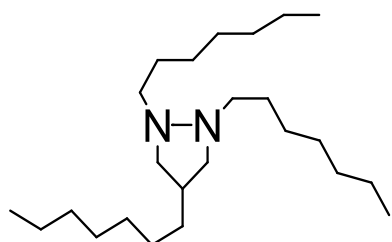
34 R₁= R₂=H, R₃= NH₂

35 R₁= R₃=H, R₂= NH₂

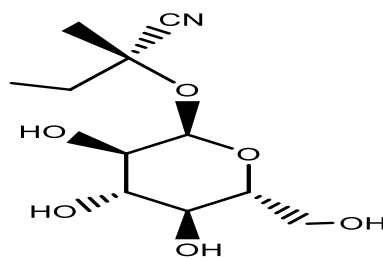


36 R₁= H, R₂= Me, R₃= NH₂

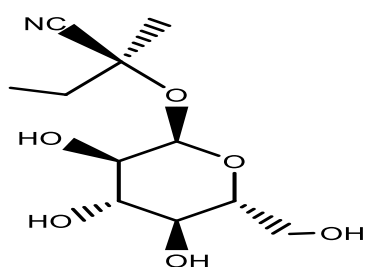
37 R₁= NH₂, R₂= H, R₃= M



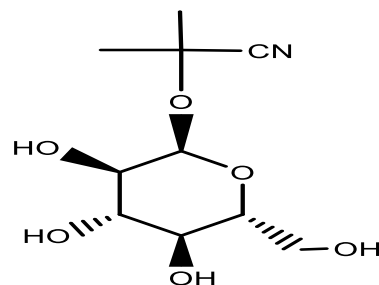
38



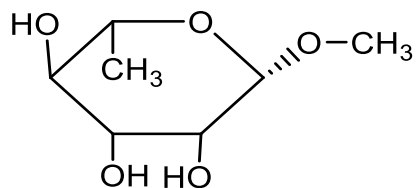
39



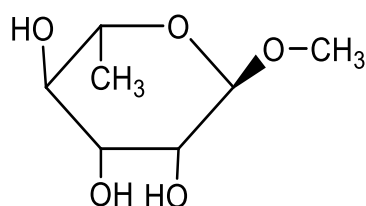
40



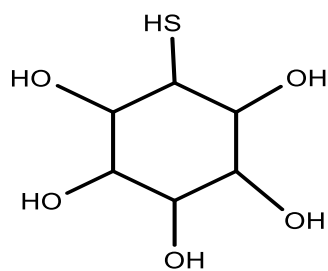
41



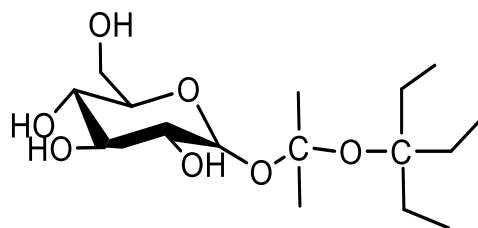
42



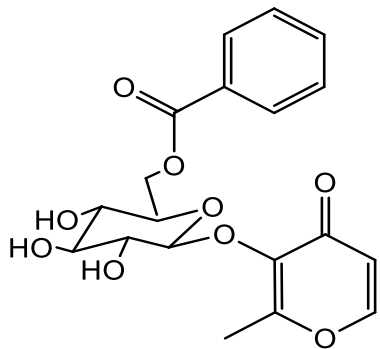
43



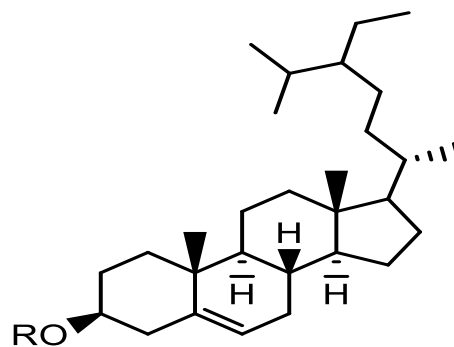
44



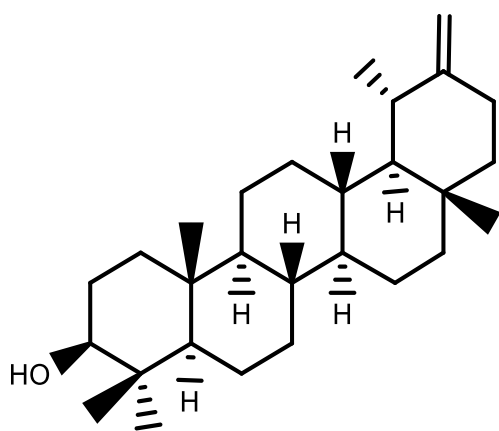
45



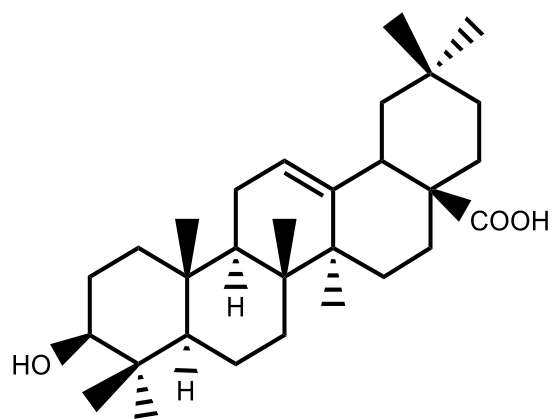
46



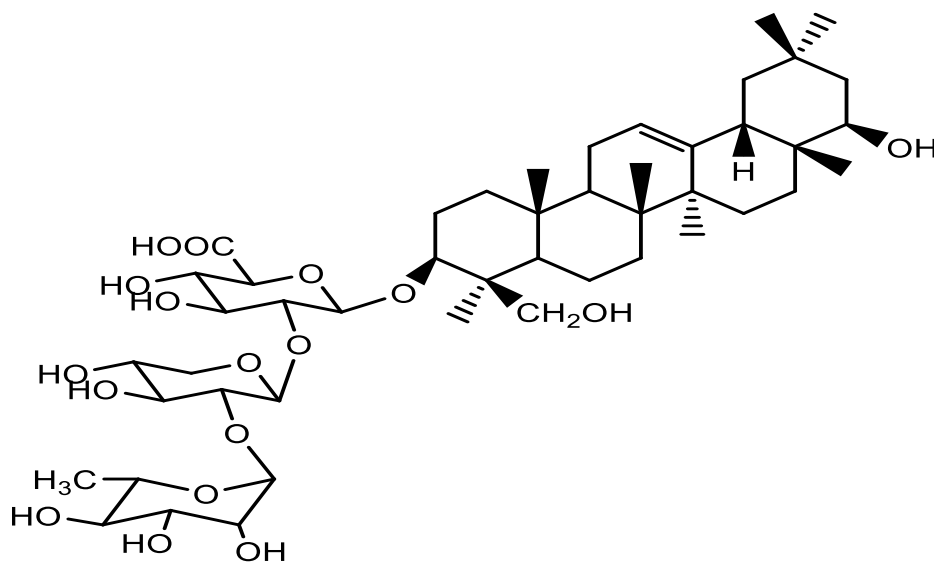
47 (R= H)
48 (R=Glu)



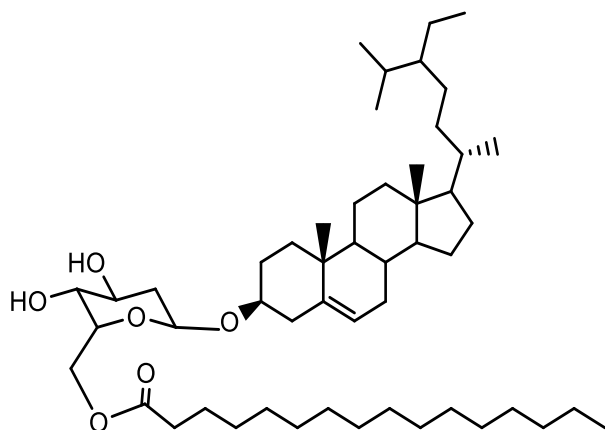
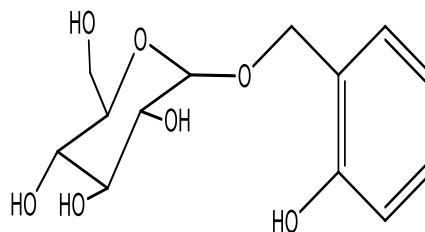
49



50



51

525329 Lotaustralin30 Linamarine31 8-(γ,γ -dimethyl-allyl)-1-Methoxycoumestrol32 L'acide ursolique33 L'acide 2,5-diaminopentanoïque34 L'acide 2,3-diaminopentanoïque35 L'acide 2,4-diaminopentanoïque36 L'acide 2,3-diamino-3-méthylbutanoïque37 L'acide 2,4-diamino-3-méthylbutanoïque38 Garcène39 Epilotaustraline40 Lotaustraline41 Linamarine42 Méthyl- β -L-rhamnopyranoside43 Méthyl- α -L-rhamnopyranoside44 Garthiole45 Garoside46 Maltol 3-O-[6-O-benzoyl]- β -D-glucopyranoside47 β -sitostérole (R= H)48 Daucostérole(R=Glu)49 Taraxastérole50 Acide oléanolique51 Astragaloside VIII52 β -sitostérol 3- β -D-glucopyranoside-6-O-palmitate53 2-hydroxybenzyle- β -D-glucopyranoside

III. Etude phytochimique de l'espèce Lotus corniculatus :

III.1 Description et caractéristiques botanique de l'espèce *L.corniculatus*

Le Lotier corniculé (*Lotus corniculatus L.*) est une plante herbacée vivace de la famille des Fabaceae couramment cultivée comme plante fourragère qui entre dans la composition des mélanges de semences pour prairies mixtes graminées-légumineuses. Lotier vient de lotos, un mot qui désignait plusieurs plantes chez les Anciens Grecs, dont le lotier corniculé. Corniculé vient de cornu qui signifiait corne, une allusion aux gousses de la plante qui ressemblent à de petites cornes. *Lotus corniculatus L.* est une plante basse, plutôt couchée, qui mesure de 5 à 30 cm, pouvant atteindre 50 cm lorsqu'elle est soutenue par d'autres plantes. [16]



Feuille

A trois folioles, ovales, les stipules situées à la base y étant semblables.



Fleur

Jaunes ou jaune-orangé sont en petites têtes.



Tiges

Glabres, anguleuses, pleines ou à peine creuses (ce qui permet de distinguer cette espèce d'un autre Lotier très commun, le Lotier des marais).



Racines

Pivotante peut atteindre 1 m de long.

III.2. Place dans la systématique botanique : [16]

Tableau 4 Classification de Lotus corniculatus L.

<i>Règne</i>	<i>Végétal</i>
<i>Sous-Règne</i>	<i>Tracheobionta</i>
<i>Taxonomie</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
<i>Division</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Classe</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Sous Classe</i>	<i>Rosidae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Rasales (fabales)</i>
<i>Famille</i>	<i>Légumineuseae (fabaceae)</i>
<i>Genre</i>	<i>Lotus</i>
<i>Espèce</i>	<i>Corniculatus</i>

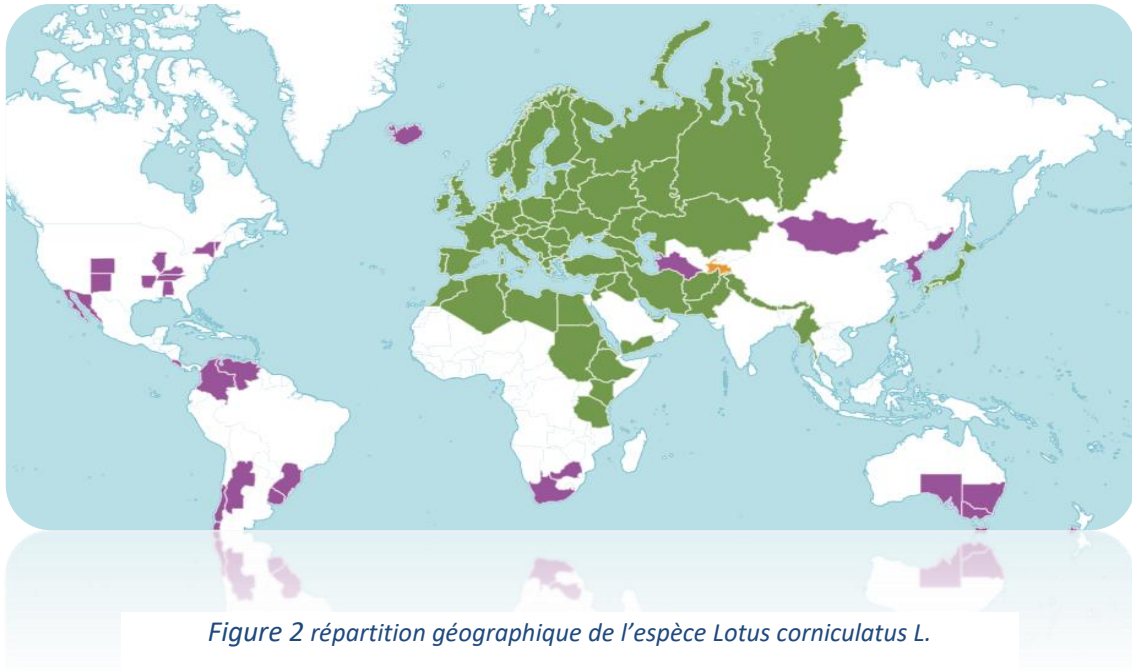
III.3. Noms communs

Le lotier est communément connu sous les noms vernaculaires de pied de poule, pois joli, sabot de la mariée, sabot du petit Jésus, trèfle cornu, cornette, fourcette, pantoufle, pantoufle du petit Jésus, petit sabot... [38]

III.4. Habitat et répartition

Espèce hygrophile et neutrocalcicole, elle recherche des substrats alluvionnaires ou argileux riches en nutriments, d'où son habitat type : pelouses basophiles méditerranéennes occidentales, mésohydriques, vases exondées, friches herbacées et jachères à engorgement hivernal, ballastières [39].

Originnaire d'Eurasie méridionale, elle a une répartition cosmopolite ; en Amérique du Nord, elle s'est échappée des cultures et colonise maintenant les lieux ouverts. [40]



III.5. Sous-espèces :

- *Lotus corniculatus* subsp *afghanicus* Chrtkova
- *Lotus corniculatus* subsp *alpinus*
- *Lotus corniculatus* subsp *corniculatus* Linné
- *Lotus corniculatus* subsp *delortii*
- *Lotus corniculatus* subsp *frondosus* Freyn
- *Lotus corniculatus* subsp *fruticosus* Chrtkova
- *Lotus corniculatus* subsp *preslii*
- *Lotus corniculatus* subsp *valdepilosus*

III.6. Utilisation médicale

Ce sont les vertus calmantes, antispasmodiques et sédatives des fleurs qui intéressent les spécialistes en phytothérapie. En cas d'insomnie et d'excitation nerveuse, le lotier corniculé peut s'avérer efficace en aidant à trouver l'endormissement et en diminuant l'anxiété. Les fleurs, légèrement narcotiques, procurent un sommeil calme et réparateur suivi d'un réveil lucide. [41]

Chapitre I Etude phytochimique de l'espèce Lotus corniculatus

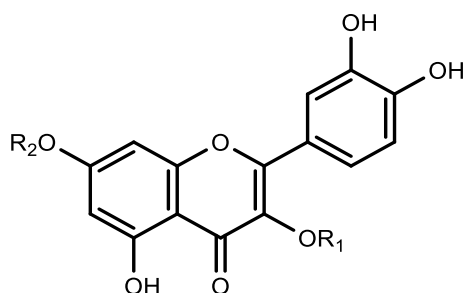
Toxique pour l'homme et même mortel à haute dose, la dose thérapeutique utilisée autrefois pouvait être mortelle lorsque prise durant une longue période. [42]

III.7. Etude phytochimique antérieure de l'espèce *lotus corniculatus L.*

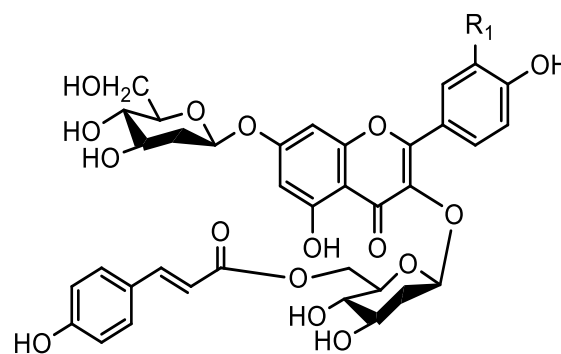
D'après des études phytochimiques d'extraits de n-butanol et de chloroforme de *Lotus corniculatus L.*, Cette étude a rapporté l'isolement de 16 composés. Les structures de tous les composés ont été élucidées sur la base d'une analyse RMN et MS.

Tableau 5 composés isolés de l'espèce *lotus corniculatus L.*

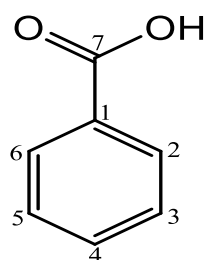
Espèces	Structure	Référence
<i>L. corniculatus</i>	<u>54</u> , <u>55</u> , <u>56</u> , <u>57</u> , <u>58</u> , <u>59</u> , <u>60</u> , <u>61</u>	[43, 44]
	<u>62</u> , <u>63</u> , <u>64</u> , <u>65</u> , <u>66</u> , <u>67</u> , <u>68</u> , <u>69</u>	[45]



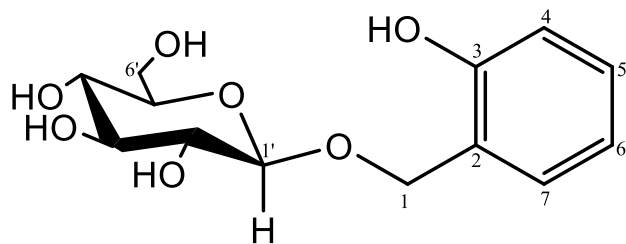
- 54 (R₁=H, R₂=Rha)
55 (R₁= Rha, R₂=H)
56 (R₁=Gal, R₂=H)
57 (R₁= Rha , R₂=Glu)
58 (R₁= Rha, R₂= Rha)



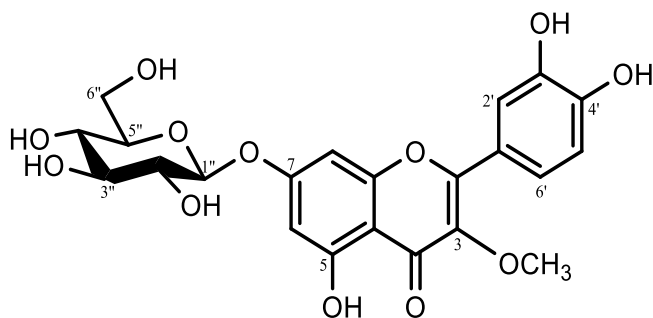
- 59 (R₁=H)
60 (R₁=OH)
61 (R₁=OCH₃)



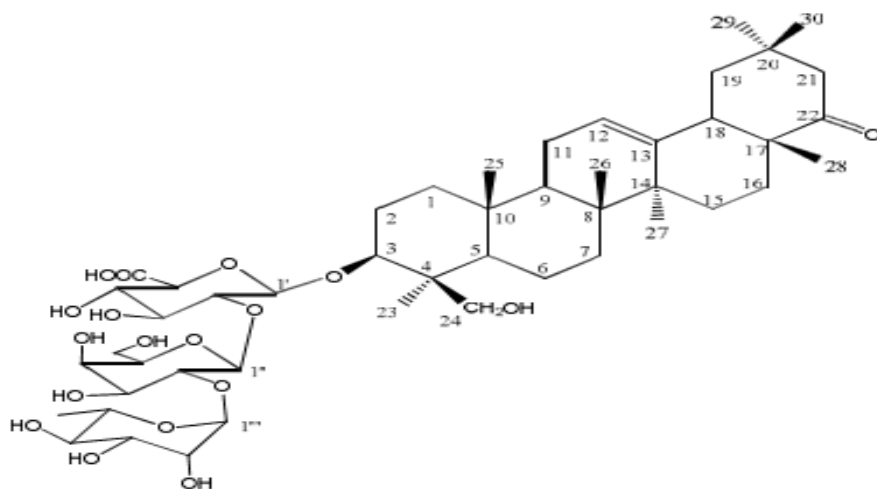
62 L'acide benzoïque



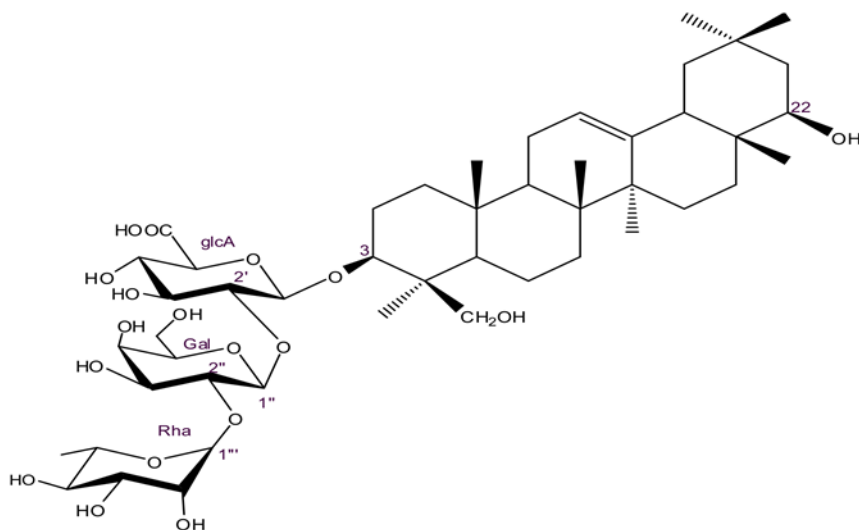
63 Isosalicin



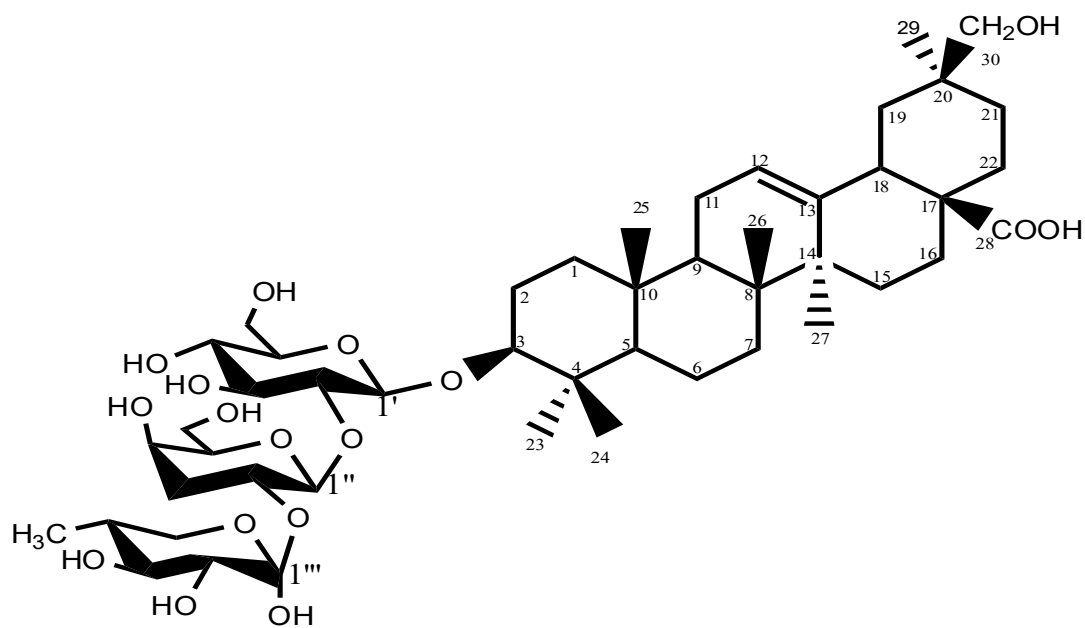
64 Transilinin



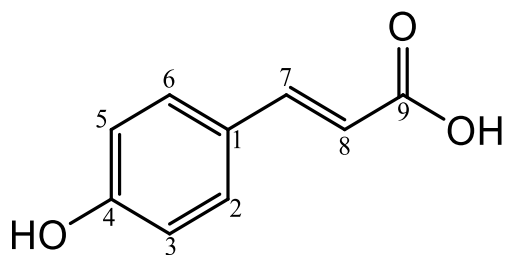
65 Dehydrosoyasaponine I



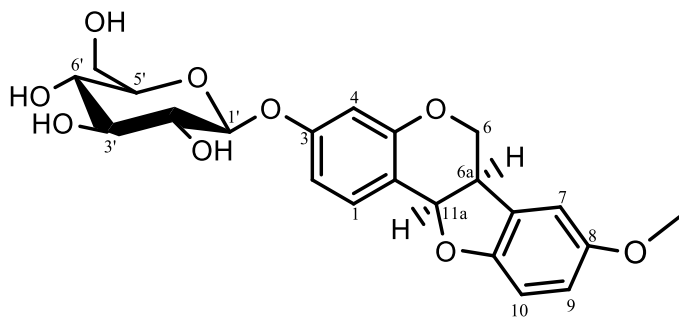
66 Soyasaponine I



67 Pharabitoside A



68 l'acide *p*-coumarique



69 Medicarpin 3-O- β -D-glucoside.

54 Quercétin-7-O- α -rhamnoside

55 Quercétin-3-O- α -rhamnoside

56 Quercétin-3-O- β -galactoside

57 Quercétin-3,7-di-O- α - rhamnoglucoside

58 Quercétin-3,7-di-O- α - rhamnoside

59 Kæmpférol-3-O-(6''-O-E-*p*-coumarylglucoside) -7-O- glucoside

60 Quercétin -3 -O-(6''-O-E-*p*-coumarylglucoside) -7-O- glucoside

61 Isorhamnétine -3-O-(6''-O-E-*p*-coumarylglucoside) -7-O- glucoside

62 L'acide benzoïque

63 Isosalicin

65 Dehydrosoyasaponine I

64 Transilin

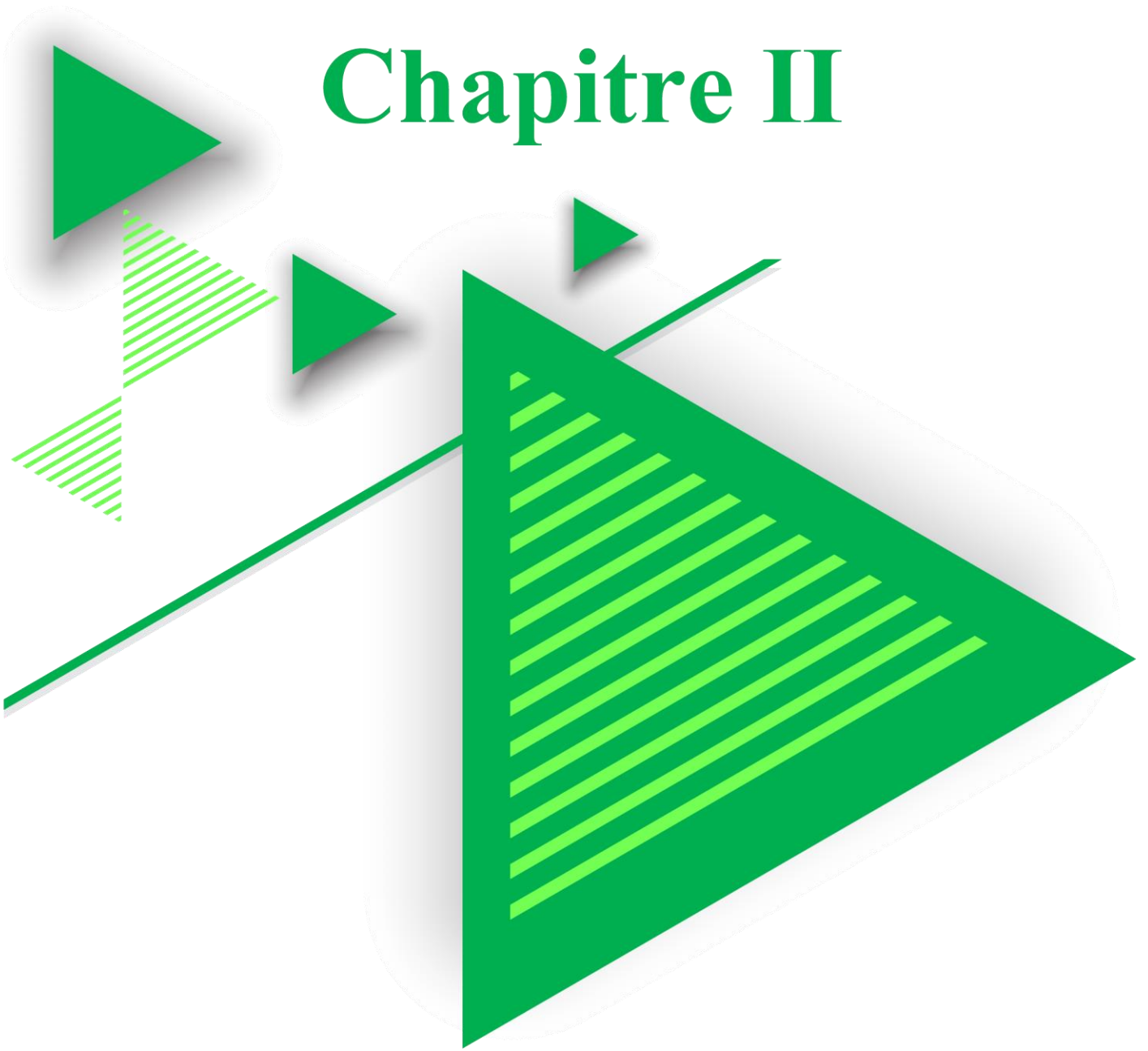
66 Soyasaponine I

67 Pharabitoside A

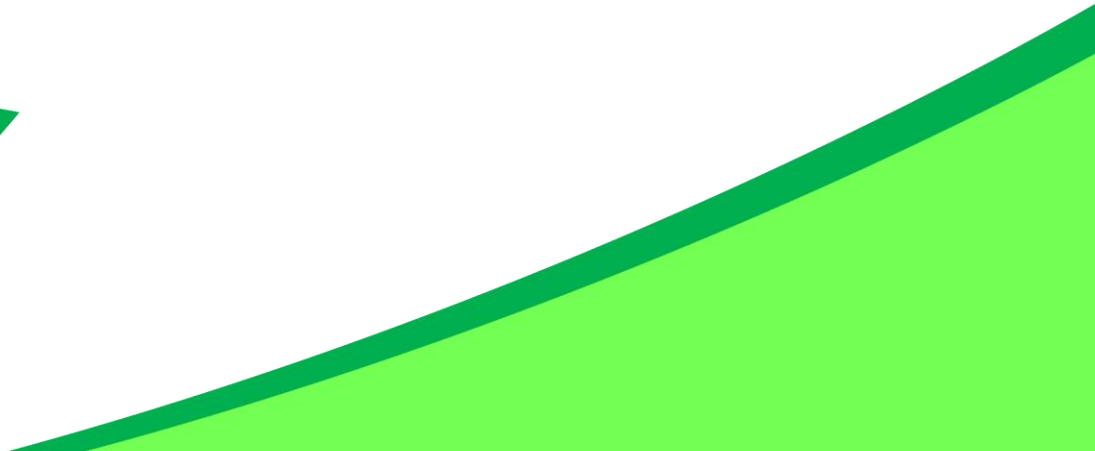
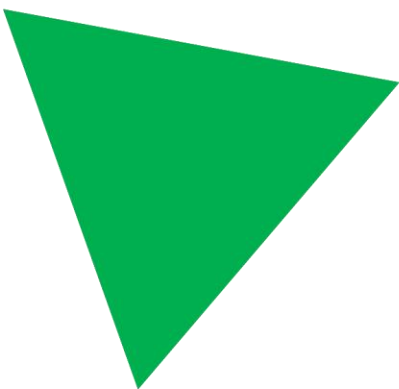
68 l'acide *p*-coumarique

69 Medicarpin 3-O- β -D-glucoside

Chapitre II



Partie Expérimentale



I Introduction :

Le principe actif est une matière première accumulée en petite quantité dans une plante qui peut être groupée en familles parmi ces substances on peut citer les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes etc. il existe plusieurs méthodes d'extraction de la substance actif qui est basée sur la différence de solubilité des substances d'un mélange dans un solvant.

II Récolte du matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de La plante *Lotus corniculatus* qui a été récoltée en mois de juin 2016 de la région de Constantine (nord-est de l'Algérie). Après séchage dans un endroit sec, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées, la masse été 200 g.

III Méthodes d'extraction

Pour cette espèce du genre *lotus* deux méthodes d'extraction ont été réalisées la première méthode pour faire le screening phytochimique : c'est une extraction solide-liquide pour les parties aérienne de *Lotus Coniculatus* en utilisant des différents solvants polaire et apolaire, quatre extraits sont obtenus : l'extrait hydro alcoolique (HA), l'extrait chloroformique (C), l'extrait éthérique (E) et l'extrait sulfurique (S)

La deuxième méthode c'est une macération suivie par une extraction liquide- liquide trois phase sont obtenus : la phase chloroformique, la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol.

III.1 La première méthode

III.1.1 préparation de l'extrait hydro alcoolique (HA)

On met dans un erlenmeyer :

- 7g du matériel végétal.
- Extrait méthanoïque 100 ml de EtOH/eau (80/20).
- Filtration de l'extrait éthanolique après 24 h. on obtient une solution de l'extrait hydro alcoolique (HA)

III.1.2 préparation de l'extrait chloroformique (C)

On met dans un erlenmeyer :

- 4g du matériel végétal (Broyée).
- 50 ml chloroforme et éther de pétrole (40/10).
- Filtration de l'extrait chloroformique après 24 h. on obtient une solution de l'extrait chloroformique (C)

III.1.3 préparation de l'extrait étherique (E)

On met dans un erlenmeyer :

- 7g du matériel végétal (Broyée).
- 30 ml éther de pétrole.
- Filtration de l'extrait étherique après 24 h. on obtient une solution de l'extrait étherique (E)

III.1.4 préparation de l'extrait sulfurique (S)

On met dans un erlenmeyer :

- 0,2 g du matériel végétal (Broyée).
- 10 ml de l'acide sulfurique.
- Agitation pendant 2 minutes, et filtration. On obtient une solution de l'extrait sulfurique (S)

III.2 La deuxième méthode

Le matériel végétal broyé (feuilles, fleurs et tige 200 g) est soumis à une extraction par macération à température ambiante dans un mélange hydro alcoolique (Méthanol/Eau ; 80/20 ; v/v). L'extraction est réalisée par percolation 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures. Après extraction l'extrait est filtré, le filtrat récupéré est séché à sec à une température de 37 °C, Le résidu sec est repris dans l'eau distillée (400 ml pour 1kg de matière végétale sèche) sous agitation magnétique. Après une décantation une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. La figure. 3 présente les étapes de l'obtention des extraits bruts. Les différentes phases organiques récupérées (Chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) sont filtrées, évaporées à sec sous pression réduite, pesées. Les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation pour le diagnostic chromatographique, pour la réalisation des dosages [8].



Figure 3 évaporation de solution hydroalcoolique.

❖ Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma suivant.

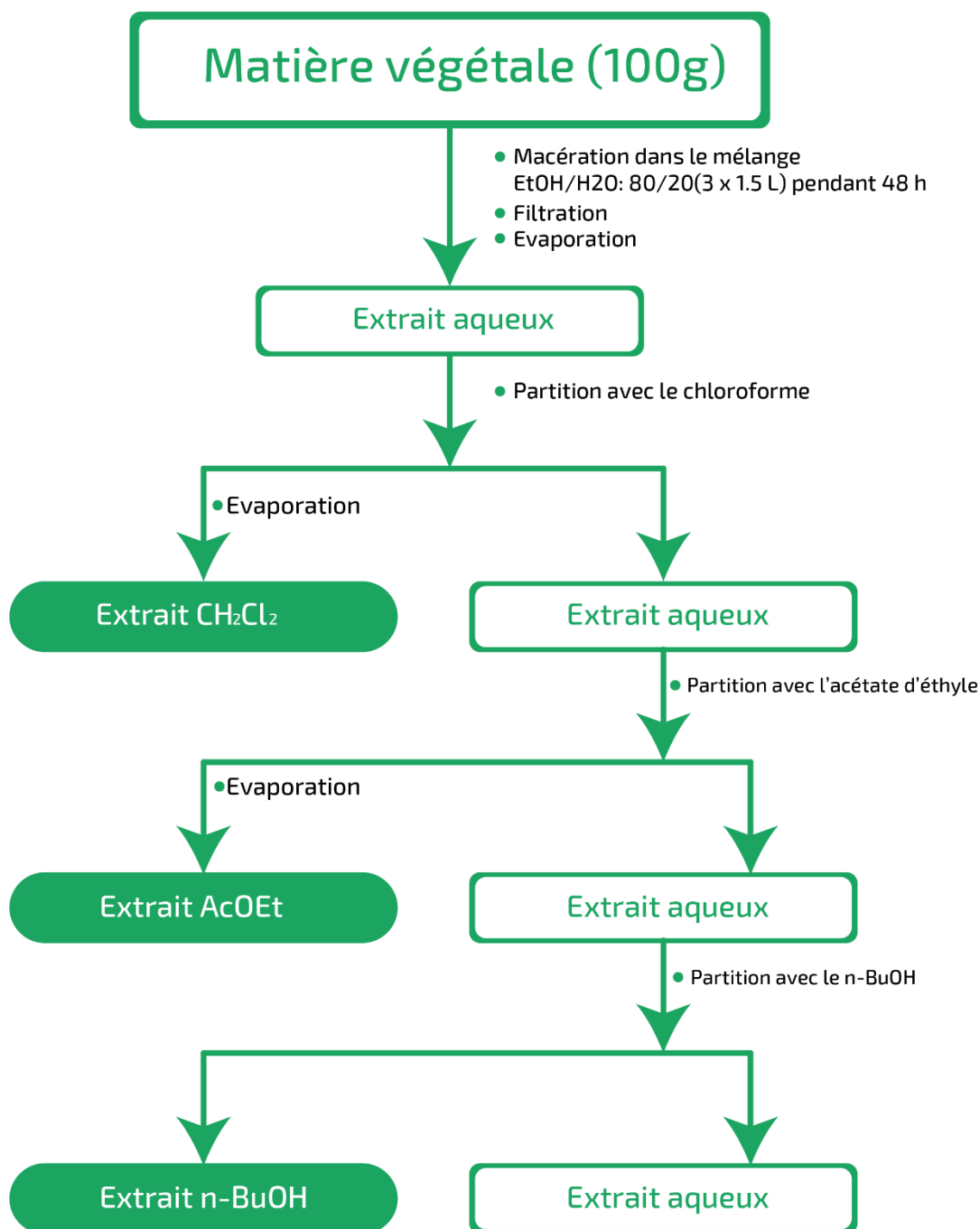


Figure 4 Schéma d'extraction de la plante Lotus Coniculatus

IV Méthodes d'analyse phytochimique des extraits

IV.1 Qu'est-ce que le screening phytochimique

Le screening phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée [46].

Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante. De ce point de vue, les techniques générales de screening phytochimique peuvent être d'un grand secours. Ces techniques permettent de détecter, dans la plante, la présence des produits appartenant à des classes de composés ordinairement physiologiquement actifs [47]. Le principe est basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration entre les réactifs et les substances désirés.

IV.2 Caractérisation générale des extraits de l'espèce *Lotus*

Coniculatus.

IV.2.1 Détection des flavonoïdes :

IV.2.1.1 Détection des flavonols et flavanones (Test de Wilstater)

Le test consiste à ajouter dans un tube essai 2 mL de l'extrait hydro-alcoolique (HA), puis quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5g de copeau de magnésium.

L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (Flavonols) ou le rouge violacées (Flavonones et Flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes [48].

IV.2.1.2 Détection des flavon3,4 diols (Test de bate-smith) :

Dans un tube à essai contenant une quantité de l'extrait hydro-alcoolique (HA) ont ajouté 0.5 mL l'HCl concentré, Porter le tube dans un bain marie contient de l'eau bouillante pendant 30 minutes.

L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de Leucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols [49].

IV.2.2 Détection des coumarines :

Dans un tube à essai une quantité d'extrait éthérique (E) (5ml) est ajoutée à 2 ml d'eau chaude, ensuite 0.5 mL de NH₄OH à 25%

L'observation d'une fluorescence intense dans le tube sous une lampe UV à 366 nm indique la présence de coumarines [50].

IV.2.3 Détection des Quinones :

La présence des Quinones est mise en évidence en ajoutant à 2 ml de l'extrait éthérique (E), dans une solution de NaOH 10 % l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violette de la phase aqueuse confirme la présence des quinones [51].

IV.2.4 Détection des Anthraquinones :

Les anthraquinones sont des dérivés de l'anthracène. Du point de vue structural, les anthraquinones sont des composés naturels dont le squelette carboné de base en C₁₄ présente un enchainement de type C₆-C₂-C₆ [52].

Quelques millilitres de l'extrait chloroformique (C) a été traitée avec 1 ml de soude KOH (10%). L'apparition de la couleur rouge indique la présence des anthraquinones.

La présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge [53].

IV.2.5 Détection 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 [54 ,55].

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des **Réactif de Mayer :**

Le Réactif de Wagner (1.7g d'iode+ 2 g d'iodure de Potassium sont dissout dans 5 ml d'eau et complété avec l'eau jusqu'à 100 ml de solution). Deux millilitres de ce réactif sont ajoutés au 5 ml l'extrait végétal de l'acide sulfurique (S).

L'apparition d'un précipité brun indique la présence des alcaloïdes. [56].

IV.2.6 Détection des saponines

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal. Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique [57,58].

Le test consiste à ajouter quelques millilitres de l'eau chaude dans un tube qui contient petite quantité de la plante *lotus corniculatus*.

Après filtration La solution obtenue est agitée vigoureusement durant 15 secondes et laissée reposer pendant 15 minutes. La formation de 1 à 2 cm de mousse indique la présence des saponines.

V Dosage des polyphénols totaux

V.1 Principe

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont déterminées au moyen du réactif de folin – Ciocalteu, ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, la coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g d'extrait.

V.2 Protocole

0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) ont été mélangés avec 0,25 ml de chaque extrait préparé dans l'eau distillée avec une concentration de (1 mg/ml), après 4 minutes à température ambiante et à l'obscurité, 2,5 ml de Carbonate de Sodium (20%) ont été ajoutés. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons et de la solution étalon ont été mesurés à 760 nm avec un spectrophotomètre. Des concentrations croissantes d'acide gallique (3.90-1000µg/ml) ont été utilisées pour obtenir une courbe standard. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (mgEAG/g PS) [59].

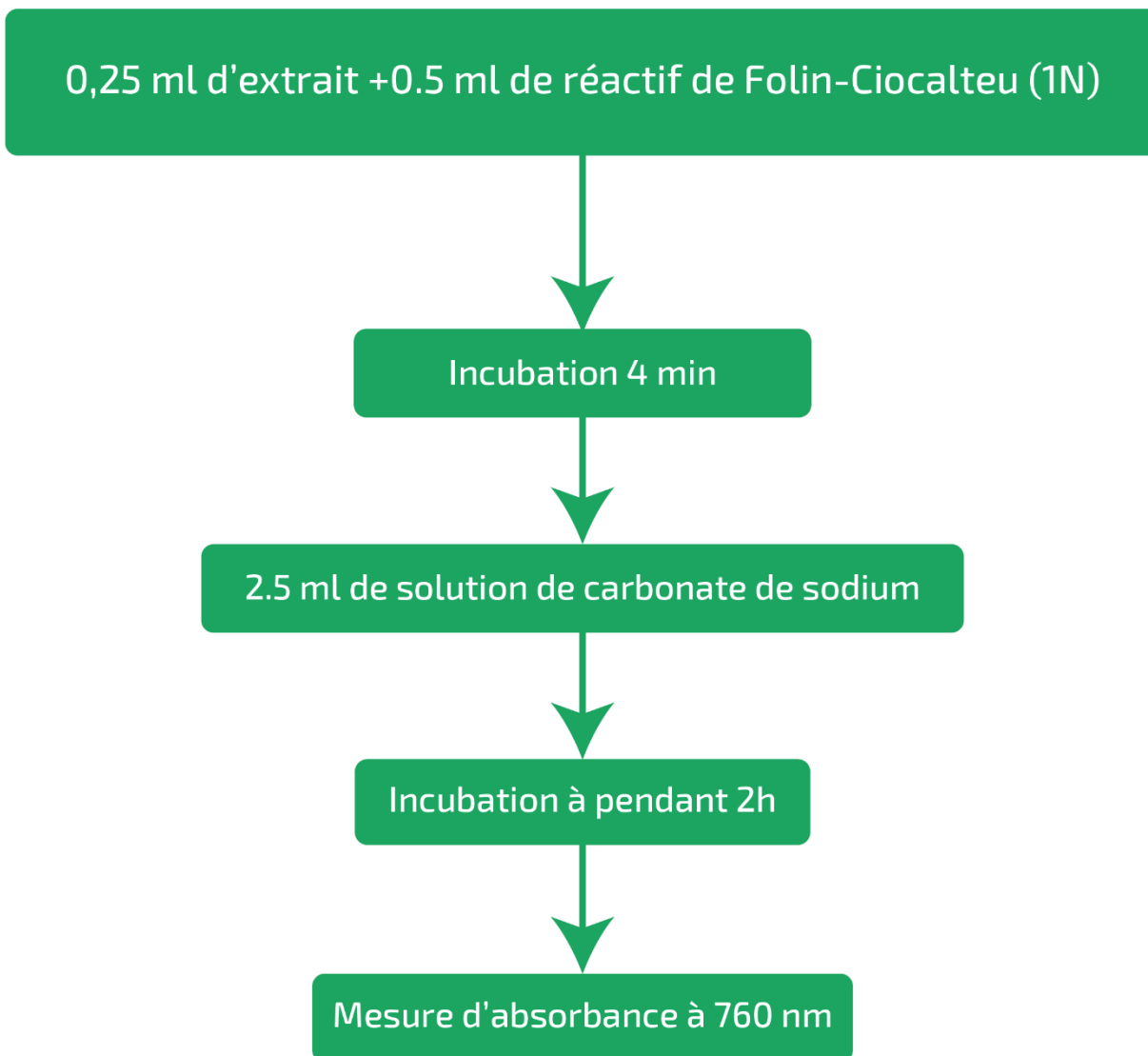
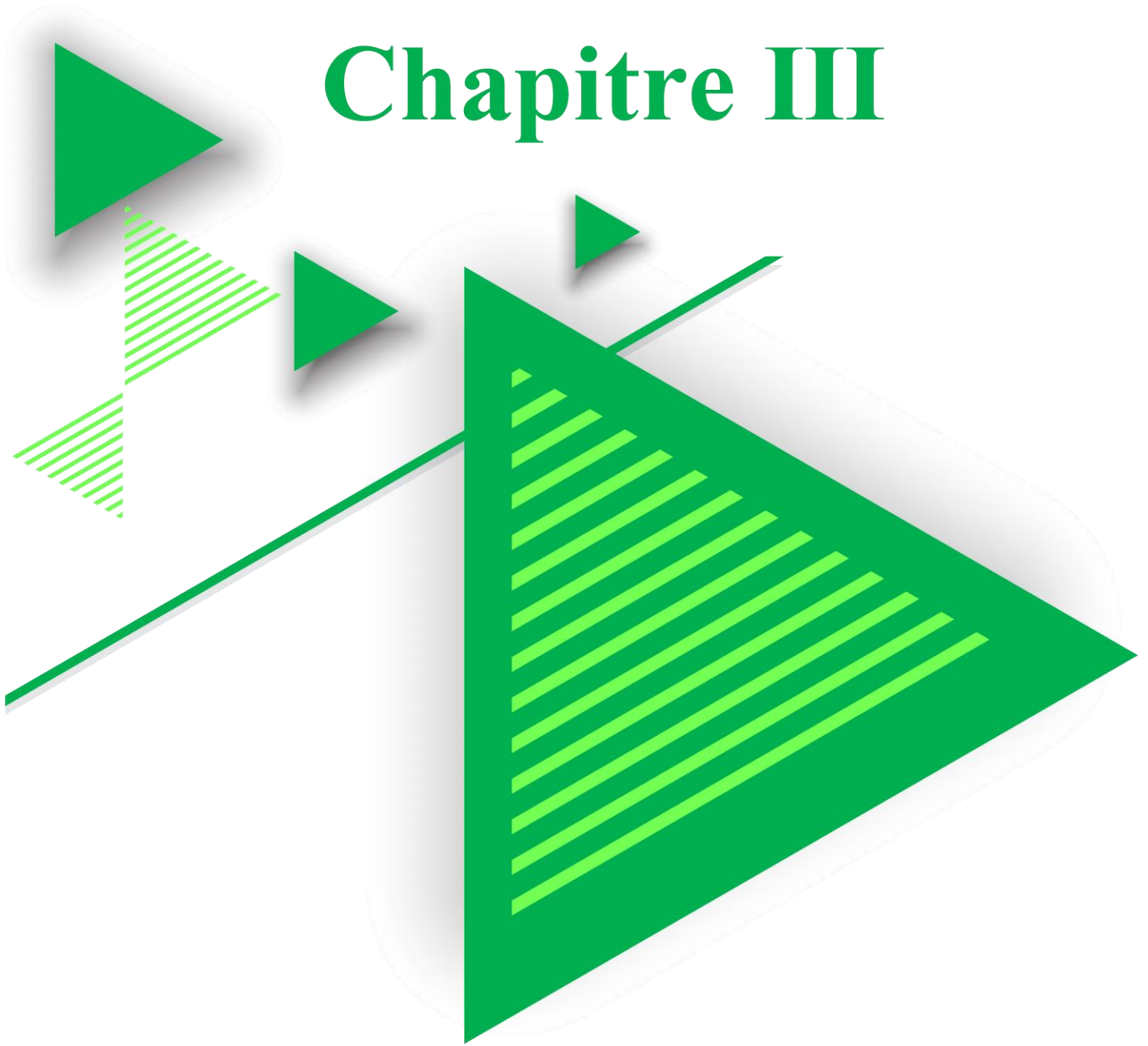
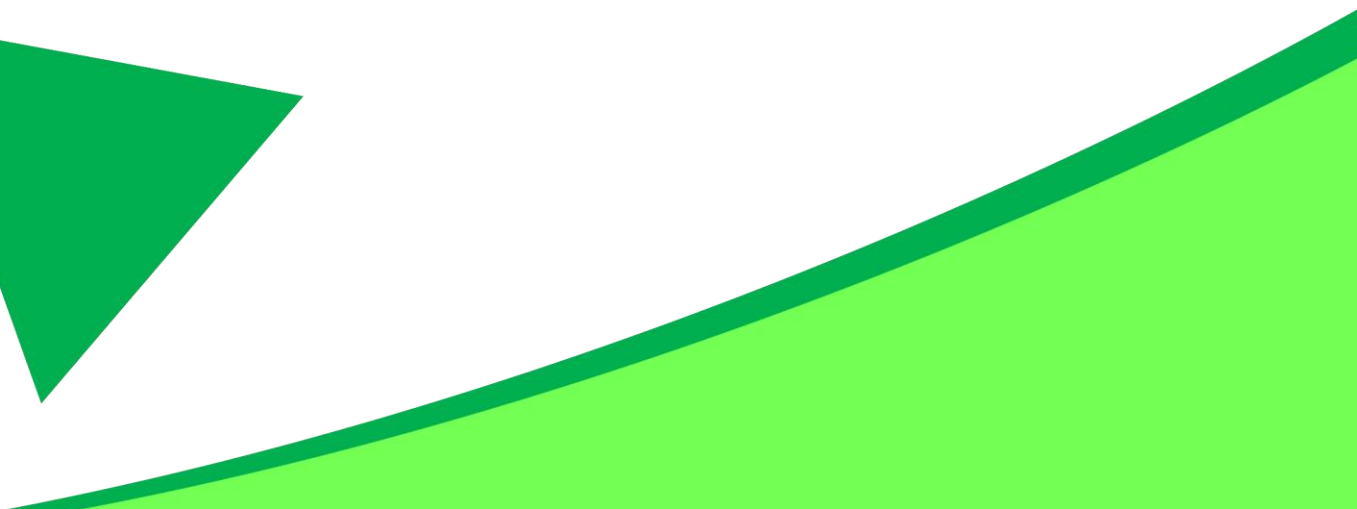
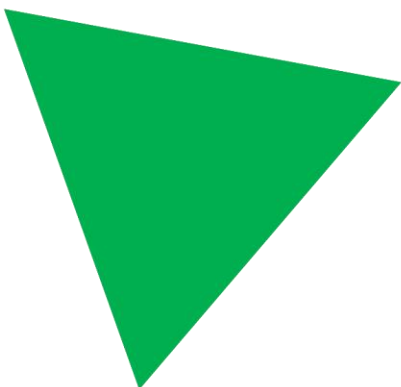


Figure 5 Protocole de dosage des polyphénols totaux

Chapitre III



Résultats Et Discussion



Introduction

Les plantes constituent une source précieuse des composés biologiquement actifs. Les criblages biologique et chimique sont des approches complémentaires pour la détection rapide des constituants végétaux. Les composés phénoliques comportent un large groupe de métabolites secondaires qui peuvent être trouvés dans les plantes, comme les phénols simples, acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tanins, etc [60]

Les polyphénols qui sont considérés comme l'un des plus importants phytoconstituants ayant des propriétés antioxydantes et plusieurs applications industrielles ont gagné un intérêt particulier dans les dernières décennies. Ce chapitre contient le screening phytochimique et le dosage des polyphénols totaux présents dans les extraits de l'espèce *lotus corniculatus*.

I. Les résultats du screening phytochimique

Le screening chimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre espèce étudiée. La détection de ces derniers est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits contenant des substances naturelles, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau ci-dessous. (**Tableau 5**)

Tableau 5 Résultats du screening chimique

<u>Composés recherchés</u>	<u>Présence/absence</u>	<u>Coloration</u>	<u>Résultats</u>
<u>Test de bate-smith (test de flavan3, 4diols)</u>	+++	Rouge Pourpre	
<u>Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones)</u>	+++	Orange	
<u>Tannins</u>	++	Précipitation	

<p><u>Test des Quinones</u></p>	<p>++</p>	<p>Jaune</p>	
<p><u>Test des Coumarines</u></p>	<p>++</p>	<p>Bleu</p>	
<p><u>Test des Anthraquinones</u></p>	<p>++</p>	<p>Orange</p>	

<u>Alcaloïdes (test de Mayer)</u>	+++	Orange + Précipitation	
Test des Saponosides	----	Absence Totale De Mousse	

Les résultats sont interprétés comme suit : (+) présence, (++) présence moyenne, (+++) présence fort, (-) absence.

II. L'extraction

La présente étude a pris la plante *Lotus Corniculatus* comme matériel végétal, après une macération, extraction, évaporation, les macéras sont soumis à une décantation à froid pour les partitions entre solvants. Les fractions aqueuses sont soumises à des affrontements par l'éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, et le n-butanol. Après évaporation à sec on a obtenu les phases suivantes :

Tableau 6 Résultats de l'extraction

<u>Matière végétale</u>	<u>Phase</u>	<u>Masse (g)</u>	<u>Rendement (%)</u>
Lotus Corniculatus 100 g	Chloroforme (CH)	0,910	0,45
	Acétate d'éthyle (AC)	1,55	0,775
	n-Butanol (BN)	2,70	1,35

III. Dosage des polyphénols :

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en mg EAG/g d'extrait et déterminées à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 5)

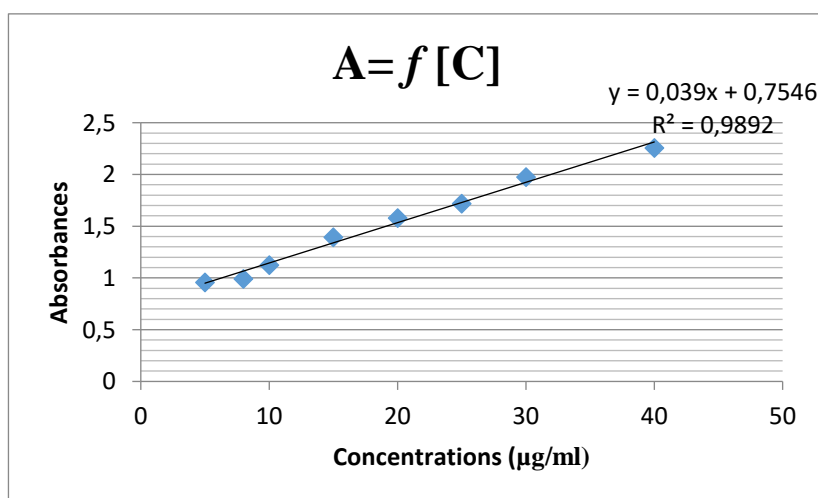


Figure 5 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le **tableau (7)** montre le taux des polyphénols totaux présents dans les trois extraits. Nous remarquons que l'extrait n-BuOH présente la teneur la plus élevée (24,575 mg EAG /g) suivi par l'extrait AcOEt (15.819 mg EAG/g). L'extrait CHCl₃ renferme le plus faible taux (8,866mg EAG/g).

Tableau 7 Résultats du dosage des polyphénols

Les extraits	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3	Moyenne	Mg EAG / g PS
CHCl ₃	0.207	0.202	0.204	0.204	8.866
AcOEt	0.363	0.374	0.362	0.366	15.819
n-BuOH	0.565	0.575	0.569	0.570	24.575

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

Les résultats sont résumés dans la figure suivante (**Figure 6**)

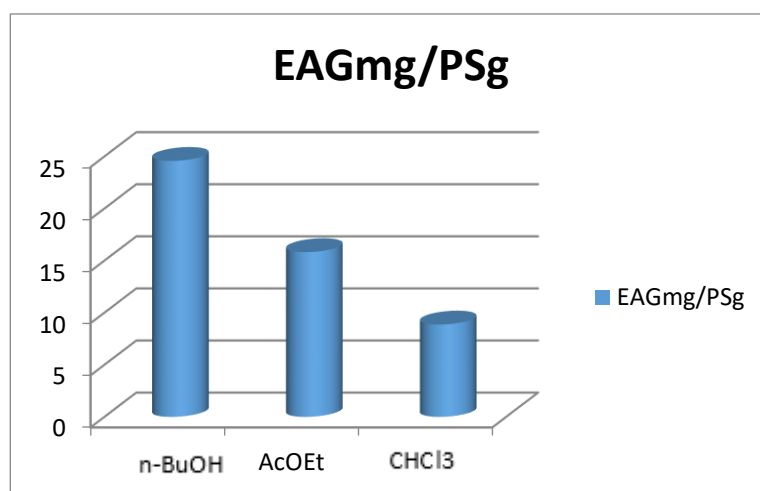
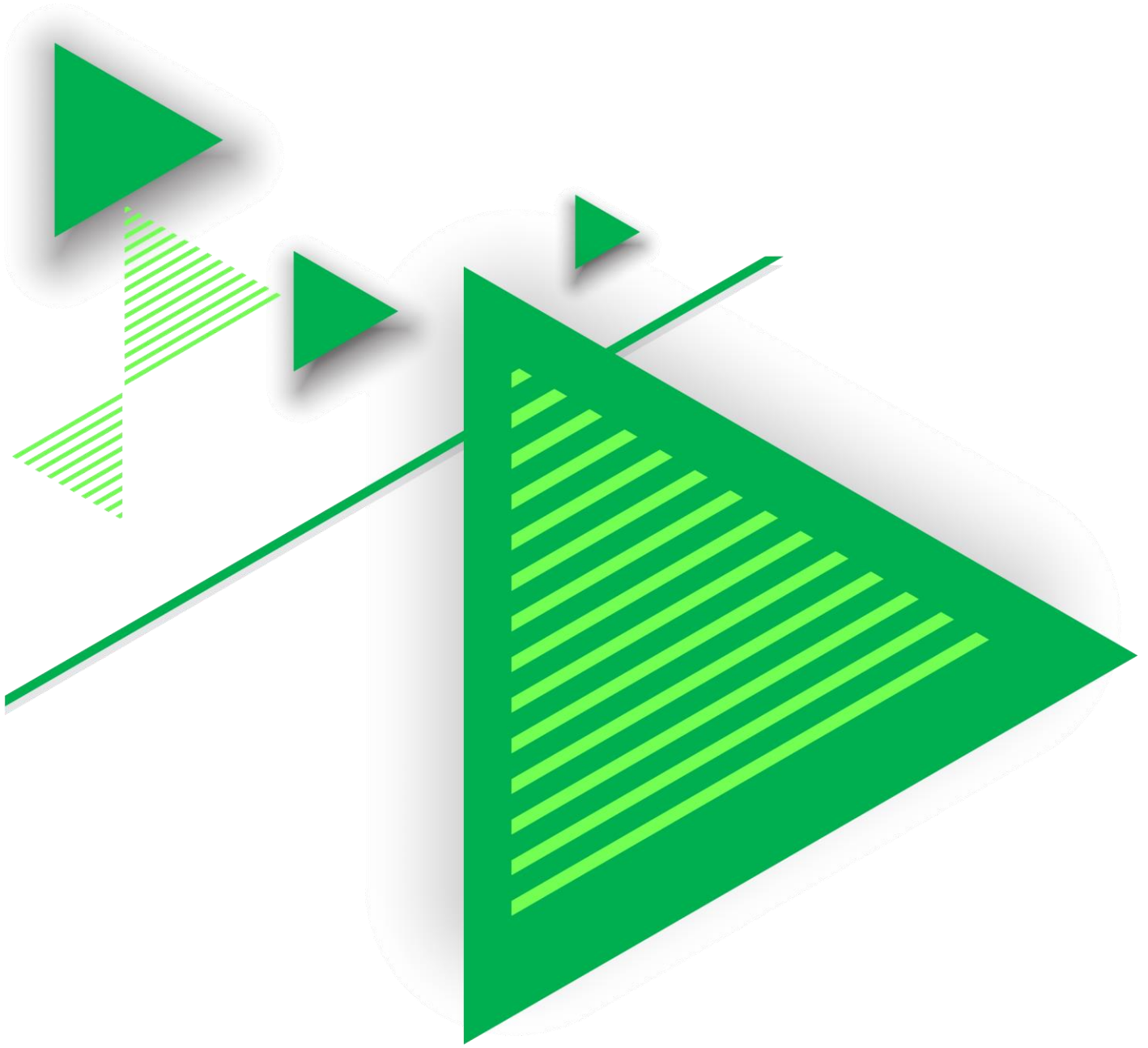
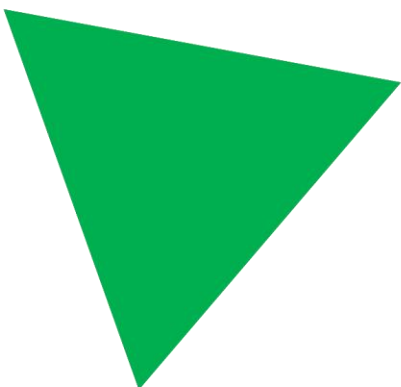


Figure 6 Le contenu total en polyphénols des extraits de l'espèce Lotus Coniculatus (mg EAG/g PS)



Conclusion Générale



Conclusion générale

De nombreux chercheurs sont intéressés par des composés biologiquement actifs, isolés des extraits de plantes car cette matière végétale contient un grand nombre de métabolites secondaires ayant des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie pharmaceutique, en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie.

Ce travail a pour but principal, d'une part l'étude phytochimique et d'autre part l'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu d'une plante du genre lotus (fabacea) qui a été récoltée dans la région de constantine.

Après la collecte du matériel végétal au stade de floraison, les travaux ont débuté par une macération des feuilles et les tiges (100 g) dans une solution hydro-méthanolique. L'extrait obtenu après concentration à pression réduite (35°C) est dilué avec de l'eau distillée (160 mL) puis successivement épuisé au chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Nos investigations sont basées sur l'étude des 3 extraits : chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol alors que nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Le screening phytochimique des extraits bruts de notre plante par réactions de précipitation qui nous a permis de mettre en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes, Quinones, les tanins, les Coumarines, les saponosides, les alcaloïdes et les anthraquinones.
- La quantification des taux de polyphénols a été estimée par les méthodes colorimétriques appropriées et a montré un taux élevé de polyphénols dans les extraits AcOEt et n-ButOH .



Références bibliographiques



- [1] **Baba Aissa F.** 2000. Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.
- [2] **Marc T., Gerard W., Denis L.** 2001. Classification des anti-inflammatoire sin. Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4e Ed, 426.
- [3] **Morl S.** 2011. Etude Phytochimique et Evaluation biologique de *Derris ferruginea Benth.*
- [4] **Benkhigue O., Zidane L., Fadli1 M., Elyacoubi M., Rochdi A., Douira A.** 2010-2011. *Acta Botanica Barcinonensia*, 53, 191-216.
- [5] **Gausсен H., Leroy H.F.** 1982. Précis de botanique végétaux supérieurs, 426, 2ème éd.
- [6] **Ozenda P.** 1977. Flore du Sahara, 250-259, éd CNRS, Paris. France.
- [7] **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.,** 2002. Botanique Systématique Une perspective phylogénétique. 1ère édition. De Boeck Université, Paris, 282-288, 292-299.
- [8] **Guignard J.I.,** 1994. Abrégé de botanique.9ème édition Ed Masson, 276.
- [9] **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 sub clades with in the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846-1862.
- [10] **Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat M., Jeanmonod D.,** 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs : Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 202-211.
- [11] **Engler A., Prantl K.,** 1889. Die natür lichen Pflanzenfamilien. 1st edition, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- [12] **Cronquist A.,** 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2nd edition, The New York Botanical Garden, New York

- [13] **Thorne R.F.**, 1992. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*, (13), 365-389.
- [14] **Thorne R.F.**, 1992. Classification and geography of the flowering plants. *Bot. Rev.*, (58), 225-348.
- [15] **Heywood V.H.**, 1996. *Flowering Plants of the World*. 3th edition, Oxford University Press, Oxford. 141-145, 149-152.
- [16] **Quezel, P., Santa, S.**, 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [17] **Bruneton J.**, 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* 3ème. Édition éditeur Technique et Documentation, Paris.
- [18] **Pistelli.L, Bertoli.A, Giach.I, Manumata.A a.** 1998. Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Product*, 61 1404-1406.
- [19] **Li.F, Zhu.Y.F, Chen.J.Y, Zhou.J, He.Y.Q, Yu.X.P.** 2016. Geinsten inhibits the proliferation of VCaP castration-resistant prostate cancer cells. *Zhonghua Nan KeXue*, 22, 1065-1070.
- [20] **Agrawal.K.P.** 1992. Nmr-Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, 31, 3307-3330.
- [21] **Khatun.M, Billah.M, Quader.M.A.** 2012. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka University Journal of Science*, 60, 5-10.
- [22] **Haruna.K, Mina.K, Shun.S, Masaya.I, Manabu.K, Yoko.Y, Isao.M, Kazuoshi.S.** 2016. Biological activities of unique isoflavones prepared from *Apios Americana Medik.* *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1347-6947.
- [23] **Garritano.S, Pinto.B, Giachi.I.** 2005. Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an in vitro short-term test *Phytomedicine*, 12, 143-147.
- [24] **Utkina.N.K, Kulesh.N.** 2012. Antioxidant activity of polyphenols and polyphenol complex from the far-eastern tree *Maackiaamuren-sis*. *Pharmaceutical chemistry journal*, 46, 488-491
- [25] **Eleni.K, Alexandra.P, Pantelis.C, Maria.K, Ioannis.P.G, Haralambos.S, Andreas.G.T.** 2012. Unexpected Enzyme-Catalyzed Regioselective Acylation of Flavonoid Aglycones. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2-25
- [26] **Lopez.L.M, Martin-Cordero.C, Iglesias-Guerra.F, González.M.J A.** 1998. An isoflavone glucoside from *Retamasphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry*, 48, 401- 402.
- [27] **Feliciano.A.S. Barrero. A. F.** 1983. *Phytochemistry* 22(9):2031-2033 ·

- [28] **Bellakhdar, J.**, 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- [29] **Strittmatter, C.D., Wagner, M.L., Kade, M., Curni, A.A.**, 1992, Identification of *Lotus tenuis* Flavonoids parts III. Biochemical Systematics and Ecology. 20, 685-687
- [30] **Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.**, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- [31] **Abdel-kader, M.S., Amer, M. E, Tang, S., Kingston, D.G.I.** Two new isoflavone derivatives from the roots of an Egyptian collection of *Lotus polyphyllus*. *Nat. Prod.* 20, 922- 926.
- [32] **Ingham, J. L., Dewick, P. M**, 1979. A new isoflavan phytoalexin from leaflets of *Lotus hispidus*. *Phytochemistry*.18, 1711-1714.
- [33] **Golea L., Haba H., Lavaud C., Long C., Benkhaled M.**, 2012 Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik .2012. *Biochemical Systematics and Ecology* ,45, 12–15.
- [34] **John Shaw, G., Ellingham, P.J., Nixon, L.N.**, 1981. 2,4-Diamino-3 Methylbutanoic Acid, A Novel Amino Acid in Root Nodule Hydrolysates from *Lotus tenuis*. *Phytochemistry*.20, 1853-1855.
- [35] **Shaiq ALI, M., Ahmad, F., Ahmad, V. U.**, 2001. Unusual Chemical Constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turk J Chem.* 25, 107-112.
- [36] **El Youssef, H.M., Murphy, B.T., Amer, M.E., Abdel-kader, M.S., Kingston, D.J.I.**, 2008. Two New Flavonol Glycosides from the Aerial Parts of *Lotus lalambensis* Growing in Saudi Arabia Saudi. *Natural Product Sciences*.16, 86-89.
- [37] **Mahmoud, Z. F, Amer, M. E, Abdel Kader, M. S. and Abdel-Salam, N. A**, A coumestan from *Lotus creticus*. *Phytochemistry*. 29, 355.
- [38] Guide illustré de la nature en France, Sélection du Reader's digest, 1995, p. 259.
- [39] **Jauzein, P. Nawrot, O. Aymonin, G.** 2011. Flore d'Ile-de-France, éditions Quæ, , p. 419
- [40] *Lotus corniculatus* L. sur Plants of the World Online (consulté le 8 septembre 2020).
- [41] **Larivière, R.** 2016. Plantes sauvages de la forêt boréale, Éditions la Caboché, p. 194
- [42] Plantes sauvages des villes et des champs, Fleurbec, 1977, page 124
- [43] **Reynaud, J., Lussignol, M.**, 2005. The Flavonoids of *Lotus corniculatus*. *News letter*.35, 78-82
- [44] **Koelzer, J., Pereira, D.A., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M.G., Frode, T.S.**, 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*. 117, 444-450.

- [45] **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
- [46] **Mentha Spicata, L.,** Screening phytochimique d'une plante medicinale: Mentha SpicataL.
- [47] **Matenga, M.,** Screening phytochimique de" Achillea Millefolium L." et" Bridelia Brideliifolia" et tests d'activité biologique sur" Escherichia Coli", ". Salmonella Polyvalento" et" Shigella Flexneri" par la méthode de tests antibiogrammes, 1996.
- [48] **Usman, H., F.I. Abdulrahman, A. U,** 2009 .Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* African Journal of Traditional, *Complementary and Alternative Medicines*,.6(3).
- [49] **Bruneton. J.,** 1993. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2éme edition Tec et Doc (Ed) Paris. p 914
- [50] **Bouزيد. W.,** 2009. Etude de l'activité Biologique des extraits du fruit de Crataegus monogyna jacq. Mémoire de Magister. Université Elhadj Lakhder -Batna.
- [51] **Ribérreau. GP.,** 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris. p 254.
- [52] **Boussaha, S.,** 2015. Thèse doctorat, Chemical Constituents, in vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Perralderia coronopifolia Coss. subsp. eu-coronopifolia M. var. typica M. extract 9.
- [53] **Rizk. AM.,** 1986. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*. 52 (2), 35-42.
- [54] **Bate-Smith E.C.,** 1954. Astringency in foods. *Food*, 23, 419-429.
- [55] **Bruneton, J.,** 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions TEC& DOC, 3ème édition, 783- 785.
- [56] **Chenni. M.,** 2010. Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *bryonia dioica jacq.* mémoire de magister . Université essen-oran.
- [57] **Vincken, j.-p., heng, I. De groot, a., gruppen, h.,** 2007. *Phytochemistry*, 68, 275–297.
- [58] **Hostettmann, k. Et marston, a.,** 1995. Cambridge university press,
- [59] **Singleton, V.L., Orthofer, R.Lamuella-Raventos, R.M.** 1999 Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [60] **Stalikas, C.D.,** 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*. 30(18): p.3268-3295.