

## Table des matières

<b>Résumé Français.</b>	
<b>Résumé Anglais.</b>	
<b>Résumé Arabe.</b>	
<b>Liste des tableaux.</b>	
<b>Liste des figures.</b>	
<b>Liste des abréviations.</b>	
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
Chapitre I : Généralités sur <i>Medicago sativa.L</i>	
1. Présentation de la famille des Fabacées.....	2
2. Origine et distribution géographique de la luzerne.....	3
3. Caractères botaniques et position systématique de <i>Medicago sativa.L</i> .....	4
3.1. Caractères botaniques.....	4
3.2. Position systématique.....	6
4. Superficies consacrées à la culture de la luzerne.....	6
5. Exigences environnementales de <i>Medicago sativa.L</i> .....	7
5.1. Le sol.....	7
5.2. La température.....	7
5.3. L'hydratation.....	7
5.4. La luminosité.....	7
6. Composition chimique de <i>Medicago sativa.L</i> .....	8
6.1. Composition nutritionnelle.....	8
6.1.1. Composition en protéines et acides aminés.....	8
6.1.2. Les lipides.....	8
6.1.3. Les hydrates de carbone.....	8
6.1.4. Les fibres.....	8
6.1.5. Les vitamines.....	8
6.1.6. Les éléments minéraux.....	8
6.2. Les substances du métabolisme secondaire.....	9
6.2.1. Les flavonoïdes.....	9
6.2.2. Les saponines.....	10
7. Intérêt de <i>Medicago sativa.L</i> .....	11
7.1. Intérêt écologique.....	11
7.2. Intérêt alimentaire.....	11
7.3. Intérêt thérapeutique.....	11
7.4. Intérêt fourrager.....	12
8. Toxicité et effets secondaires.....	12
Chapitre II : Les composés phénoliques	
1. Activités biologiques des composés phénoliques.....	13
2. Classification des composés phénolique.....	13
2.1. Les flavonoïdes.....	14
2.1.1. Structure chimique des flavonoïdes.....	15
2.1.2. Classification des flavonoïdes.....	15
2.1.2.1. Les flavonols.....	15

2.1.2.2. Les isoflavanones.....	16
2.1.2.3. Les flavanones.....	17
2.1.2.4. Les anthocyanes .....	17
2.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	17
2.1.4. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes.....	18
2.1.4.1. Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire.....	18
2.1.4.2. Propriétés antimicrobiennes et antivirales.....	19
2.1.4.3. Propriété antioxydante.....	22
2.1.4.4. Propriétés anti-carcinogènes.....	25
2.2. Les saponines.....	25
2.2.1. Propriétés physicochimiques des saponines.....	25
2.2.2. Les saponines triterpéniques.....	25
2.2.3. Les saponines stéroïdiques.....	26
2.2.4. Propriétés pharmacologiques des saponines.....	27
2.2.4.1. La Dioscine.....	27
2.2.4.2. L'acide medicagéniques et l'acide luzernique.....	27
3. Quelques composés phénoliques utilisés en phytothérapie.....	28
3.1. Les tanins.....	28
3.2. Les coumarines.....	28
<b>Partie expérimentale</b>	
1. Origine et récolte de la plante étudiée.....	29
2. Etude histologique de l'espèce <i>Medicago sativa.L</i> (Technique de la double coloration : Rouge Congo et vert de méthyle).....	30
3. Screening phytochimique de l'espèce <i>Medicago sativa.L</i> .....	31
3.1. Recherche des anthocyanes.....	31
3.2. Recherche des leuco-anthocyanes.....	31
3.3. Recherche des flavonoïdes.....	31
3.4. Recherche des saponines.....	31
4. Analyse qualitative et quantitative des polyphénols et recherche d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de <i>Medicago sativa.L</i> .....	31
4.1. Préparation des extraits méthanoliques.....	32
4.2. Analyse de la composition chimique de l'extrait méthanolique par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	32
4.3. Dosage des phénols totaux.....	33
4.4. Évaluation de l'activité antioxydante.....	33
5. Effet de la composition physicochimique du sol de prélèvement sur le rendement des principes actifs de la luzerne.....	34
5.1. Analyse du sol de prélèvement.....	34
5.1.1. Texture.....	34
5.1.2. Matière organique.....	36
5.1.3. pH eau.....	37
5.1.4. pH KCl.....	37
5.1.5. Conductivité électrique.....	38
5.1.6. Dosage du calcaire total par titrimétrie.....	38
5.2. Extractions.....	39
5.2.1. Procédé d'extraction des flavonoïdes.....	39
5.2.2. Extraction des saponines.....	41
6. Analyse qualitatives des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance HPLC et étude microbiologique des deux principes actifs de <i>Medicago sativa.L</i> .....	44

6.1. Etude détaillée des éléments d'un appareil d'HPLC.....	46
6.1.1. La colonne.....	46
6.1.2. L'éluant.....	46
6.1.3. Les pompes.....	46
6.1.4. L'injecteur.....	46
6.1.5. Le détecteur.....	46
6.1.6. Le calculateur-enregistreur.....	47
6.2. Test d'activité antibactérienne.....	47
6.2.1. Réactivation.....	47
6.2.2. Ensemencement.....	47
6.2.3. Disposition des disques.....	47
6.2.4. Lecture.....	48
<b>Résultats et discussions</b>	
1. Etude histologique de l'espèce <i>Medicago sativa.L.</i> .....	49
2. Tests préliminaires de <i>Medicago sativa.L.</i> .....	50
3. Analyse qualitative et quantitative des polyphénols et recherche d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de <i>Medicago sativa.L.</i> .....	50
3.1. L'analyse de la composition chimique de l'extrait méthanolique par CCM.....	50
3. 2. Dosage des polyphénols.....	52
3. 3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	52
4. Effet de la composition physicochimique du sol de prélèvement sur le rendement des principes actifs de la luzerne.....	55
4. 1. Analyse du sol de prélèvement .....	55
4. 2. Calcul du rendement.....	56
4.2.1. Les flavonoïdes.....	56
4.2.2. Les saponines.....	58
5. Analyse qualitatives des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance HPLC et étude microbiologique des deux principes actifs de <i>Medicago sativa.L.</i> .....	59
5.1. Caractérisation des flavonoïdes de <i>Medicago sativa.L.</i> par HPLC.....	59
5.2. Etude de l'effet antimicrobien des extraits.....	60
Conclusion générale.....	70
Perspectives.....	71
Références bibliographiques.....	72
Annexes.....	81

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Superficies occupées par la luzerne <i>Medicago sativa.L</i> à travers le monde.....	7
<b>Tableau 02:</b> Composition nutritionnelle de <i>Medicago sativa.L</i> .....	9
<b>Tableau 03:</b> Les différentes génines des saponines de luzerne.....	10
<b>Tableau 04:</b> Les différentes activités des polyphénols.....	13
<b>Tableau 05:</b> Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.....	21
<b>Tableau 06:</b> Effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes.....	24
<b>Tableau 07:</b> Echelle de la texture.....	35
<b>Tableau 08:</b> Classification des sols d'après leur teneur en matière organique.....	37
<b>Tableau 09:</b> La gamme de pH des sols.....	38
<b>Tableau 10:</b> Echelle de salinité du sol.....	38
<b>Tableau 11:</b> Echelle internationale d'évaluation du calcaire dans les sols.....	39
<b>Tableau 12:</b> Les différentes souches testées et leurs principaux caractéristiques.....	45
<b>Tableau 13:</b> Tests préliminaires de <i>Medicago sativa.L</i> .....	50
<b>Tableau 14:</b> Flavonoïdes d'extrait méthanolique identifiés par CCM.....	51
<b>Tableau 15:</b> Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Medicago sativa.L</i> .....	53
<b>Tableau 16:</b> Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Medicago sativa.L</i> .....	53
<b>Tableau 17:</b> Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des feuilles/tiges de <i>Medicago sativa.L</i> .....	54
<b>Tableau 18:</b> Caractéristiques physico-chimiques du sol .....	56
<b>Tableau 19:</b> Les flavonoïdes présents dans l'extrait flavonoïque (FFTPB) selon leurs temps de rétention.....	60
<b>Tableau 20:</b> Diamètres des zones d'inhibitions du premier essai.....	61
<b>Tableau 21:</b> Diamètres des zones d'inhibitions des flavonoïdes du deuxième essai....	62
<b>Tableau 22:</b> Diamètres des zones d'inhibitions des saponines du deuxième essai...	66

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Le diagramme floral de la famille des Fabacées.....	3
<b>Figure 02:</b> La luzerne <i>Medicago sativa.L</i> .....	4
<b>Figure 03:</b> Morphologie de la fleur de <i>Medicago sativa.L</i> .....	5
<b>Figure 04:</b> Les différents organes de <i>Medicago sativa.L</i> .....	6
<b>Figure 05:</b> Les produits actifs des isoflavones.....	10
<b>Figure 06:</b> Les différentes classes des composés phénoliques.....	14
<b>Figure 07:</b> Structure de noyau flavone.....	15
<b>Figure 08:</b> Structures chimiques de quelques flavonols.....	16
<b>Figure 09:</b> Structure des isoflavones.....	16
<b>Figure 10:</b> La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	18
<b>Figure 11:</b> Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	19
<b>Figure 12:</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	23
<b>Figure 13:</b> Structures chimiques des saponines triterpéniques.....	26
<b>Figure 14:</b> Structures chimiques des saponines stéroïdiques.....	26
<b>Figure 15:</b> Les saponines de certaines variétés de la luzerne.....	27
<b>Figure 16:</b> Localisation géographique du site de prélèvement.....	29
<b>Figure 17:</b> Photo présentant un champ de la luzerne cultivée.....	30
<b>Figure 18:</b> Forme libre et réduite du DDPH.....	34
<b>Figure 19:</b> Photo présentant l'appareil de soxhlet.....	40
<b>Figure 20:</b> Présentation schématique de la méthode d'extraction des flavonoïdes.....	42
<b>Figure 21:</b> Présentation schématique de la méthode d'extraction des saponines.....	43
<b>Figure 22:</b> Schéma représentant une chaîne d'HPLC.....	47
<b>Figure 23:</b> Photo montrant une portion transversale de la tige de la luzerne cultivée Gx10.....	49
<b>Figure 24:</b> Photo montrant une coupe transversale de la feuille de la luzerne cultivée Gx10.....	49
<b>Figure 25:</b> Photo montrant une coupe transversale de la tige de la luzerne cultivée Gx40.....	50
<b>Figure 26:</b> Photo présentant la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de mélange tige et feuille de <i>Medicago sativa</i> observés à la lampe de Wood (365 nm).....	51
<b>Figure 27:</b> Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique des différents Organes de <i>Medicago sativa.L</i> .....	52
<b>Figure 28:</b> Activité antioxydante des trois extraits + BHT.....	53
<b>Figure 29:</b> Concentration efficace (CE50) en mg/ml des extraits méthanolique de <i>Medicago sativa.L</i> .....	54
<b>Figure 30:</b> Corrélation entre la teneur en phénols et son activité antioxydante.....	55
<b>Figure 31:</b> Teneur (richesse) des feuilles de <i>Medicago sativa.L</i> en flavonoïdes.....	57
<b>Figure 32:</b> Teneur (richesse) des tiges de <i>Medicago sativa.L</i> en flavonoïdes.....	57
<b>Figure 33:</b> Teneur (richesse) de mélange (tige +feuilles) de <i>Medicago sativa.L</i> en flavonoïdes.....	58
<b>Figure 34:</b> Données quantitatives des saponines de <i>Medicago sativa.L</i> .....	58
<b>Figure 35:</b> Photos montrant l'activité de l'extrait flavonoïque de <i>Medicago sativa. L</i> FFTPB sur les différentes souches du premier essai.....	63

<b>Figure 36:</b> Photos montrant l'activité des différents extraits de <i>Medicago sativa. L</i> sur <i>C.albicans</i> .....	63
<b>Figure 37:</b> Photos montrant l'activité des extraits flavonoïques de <i>Medicago sativa.L</i> sur les différentes souches du deuxième essai.....	64
<b>Figure 38:</b> Photos montrant l'activité des saponines de <i>Medicago sativa.L</i> sur les différentes souches testées.....	65
<b>Figure 39:</b> Photo montrant l'antibiogramme de <i>S.aureus</i> 240.....	65
<b>Figure 40:</b> Spectre d'activité des flavonoïdes des feuilles de <i>Medicago sativa. L</i> sur les souches étudiées.....	67
<b>Figure 41:</b> Spectre d'activité des flavonoïdes des tiges de <i>Medicago sativa. L</i> sur les souches étudiées.....	67
<b>Figure 42:</b> Spectre d'activité des flavonoïdes du mélange feuilles/tiges de <i>Medicago sativa. L</i> sur les souches étudiées.....	68
<b>Figure 43:</b> Spectre d'activité des saponines de <i>Medicago sativa.L</i> sur les souches étudiées.....	69

## Liste des abréviations

**A. baumannii:** *Acinetobacter baumannii*.  
**ABTS**·+: 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique.  
**ATCC:** American Type Culture Collection.  
**BGNE:** Bactéries Gram – Entérobactéries.  
**BGNNE:** Bactéries Gram – Non Entérobactéries.  
**BHT:** Butylated hydroxytoluen.  
**C. albicans:** *Candida albicans*.  
**CCM:** Chromatographie sur Couche Mince.  
**CFU:** Colony-Forming Unit.  
**Da:** Dalton.  
**DMBA:** 7,12 diméthylbenz(a)anthracène ou la NMU (N-nitrosométhylurée).  
**DMSO:** Diméthylsulfoxyde.  
**DPPH:** 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.  
**E. cloacae19:** *Enterobacter cloacae19*.  
**E. coli:** *Escherichia coli*.  
**EMeOH F:** Extrait méthanolique des feuilles.  
**EMeOH T:** Extrait méthanolique des tiges.  
**EMeOH FT:** Extrait méthanolique du mélange (feuilles/tiges).  
**FFPA:** Flavonoïdes des feuilles phase d'acétate d'éthyle.  
**FFPB:** Flavonoïdes des feuilles phase butanolique.  
**FFPE:** Flavonoïdes des feuilles phase étheré.  
**FFTPA:** Flavonoïdes de mélange (feuilles/tiges) phase d'acétate d'éthyle.  
**FFTPB:** Flavonoïdes de mélange (feuilles/tiges) phase butanolique.  
**FFTPE:** Flavonoïdes de mélange (feuilles/tiges) phase d'étheré.  
**FTPA:** Flavonoïdes des tiges phase d'acétate d'éthyle.  
**FTPB:** Flavonoïdes des tiges phase butanolique.  
**FTPE:** Flavonoïdes des tiges phase étheré.  
**HCl:** Acide chlorhydrique.  
**HPLC:** Chromatographie liquide à haute performance.  
**I% :** Taux d'inhibition.  
**IC50 :** Concentration à 50% de DPPH perdu.  
**KCl:** Chlorure de potassium.  
**K. oxytoca:** *Klebsiella oxytoca*.  
**K. pneumoniae :** *Klebsiella pneumoniae*.  
**MAT:** Matière Azotée Totale.  
**MS:** Matière Sèche.  
**NAF:** Fluorure de sodium  
**NaOH:** Hydroxyde de sodium.  
**P. mirabilis:** *Proteus mirabilis*.  
**ODC:** Ornitine Décarboxylase  
**NH4OH:** Hydroxyde d'ammonium.  
**Rf:** Rapport Frontal.  
**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*.  
**SF:** Saponines des feuilles

**SFT:** Saponines de mélange (feuilles/tiges).  
***S. hominis*:** *Staphylococcus hominis*.  
**SM:** Solution mère.  
***S. marcescens*:** *Serratia marcescens*.  
***S. saprophyticus*:** *Staphylococcus saprophyticus*.  
**ST:** Saponines des tiges.  
***S. warneri*:** *Staphylococcus warneri*.  
**TEAC:** Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.  
**TPA:** 12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate.  
**Trolox:** acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique.  
**UV:** Ultraviolet.



# Résumés

## Résumé

Le présent travail consiste à comparer les résultats des analyses phytochimiques des principes actifs isolés de la luzerne récoltée de la région d'El Tarf (Est Algérien).

L'autre objectif est de déterminer l'effet antimicrobien des douze extraits des flavonoïdes et des saponines obtenus à partir de différentes parties de *Medicago sativa.L* testés sur seize souches bactériennes du groupe Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> et une souche de champignon, ainsi que l'identification de l'influence du solvant d'extraction sur l'activité microbiologique des flavonoïdes de la plante étudiée.

L'étude phytochimique de *Medicago sativa.L* démontre sa richesse en plusieurs principes actifs tels que: les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanes et les leuco-anthocyanes.

La chromatographie sur couche mince (CCM) a permis d'identifier dans l'extrait méthanolique de la luzerne des composés phénoliques tels que : les flavones, les flavonols et les anthocyanes.

Les résultats des analyses effectuées montrent que les rendements des polyphénols influencent l'activité antioxydante des extraits méthanolique de *Medicago sativa.L*.

Les caractéristiques physicochimiques du sol de prélèvement a permis de déterminer l'effet de la nature du sol sur le rendement en flavonoïdes et en saponines de la luzerne.

L'analyse chromatographique et microbiologique des flavonoïdes et des saponines de la luzerne montre que la quantité et la qualité de ces substances varient d'une plante à une autre dans la même espèce et d'une partie à une autre dans la même plante, ces différences dépendent du solvant d'extraction utilisé et du milieu de développement de la plante.

Les résultats de l'étude microbiologique et comparativement aux autres études réalisées dans le même domaine montrent qu'il existe une sensibilité importante de la majorité des souches à nos produits, on peut dire que l'extrait butanolique des flavonoïdes isolés du mélange de la partie aérienne de *Medicago sativa.L* présente une meilleure activité antibactérienne et antifongique.

### Mots clés :

*Medicago sativa L*, flavonoïdes, saponines, polyphénols, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique, sol, HPLC.

## ملخص

العمل الحالي هو مقارنة نتائج التحليل الكيميونباتي للمكونات النشطة المعزولة من الفصفصة المحصودة من منطقة الطارف شرق الجزائر.

الهدف الآخر هو تحديد تأثير مضادات الميكروبات لاثني عشر مستخلص للفلافونويد والصابونين تم الحصول عليها من اماكن مختلفة من *Medicago sativa.L* مختبرة على ستة عشر سلالات بكتيرية من مجموعة غرام + و غرام - وسلالة فطرية، وتحديد تأثير مذيب الاستخلاص على النشاط الميكروبيولوجي لفلافونويد النبات المدروس.

الدراسة الكيميونباتية لـ *Medicago sativa.L* توضح غناها بالعديد من المكونات النشطة مثل الفلافونويد , الصابونين, الانتوسيان و اللوكوانتوسيان.

الكروماتوغرافيا على طبقة رقيقة (CCM) تسمح لنا بايجاد في المستخلص الميثانوليكي للفصفصة مركبات فينولية مثل: فلافون، الفلافونون والانتوسيانين.

نتائج التحليلات تشير إلى أن العائدات من مادة البوليفينول تؤثر على النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الميثانولية لـ *Medicago sativa*.

الخصائص الفيزيوكيميائية لعينة التربة تحدد تأثير نوعية التربة على العائدات من الفلافونويد والصابونين للفصفصة. التحليل الكروماتوغرافي و الميكروبيولوجي لفلافونويد والصابونين الفصفصة يظهر أن كمية ونوعية هذه المواد تختلف من نبتة الى اخرى لنفس النوع و من عضو الى اخر لنفس النبتة، هذه الاختلافات تعتمد على المذيبات المستخدمة في الاستخراج وبيئة نمو النبتة.

نتائج الدراسة الميكروبيولوجية وبالمقارنة مع دراسات أخرى في نفس المجال تبين أن هناك حساسية كبيرة لغالبية السلالات تجاه مستخلصاتنا

نستطيع أن نقول أن مستخلص البيوتانول من الفلافونويد معزول من خليط الجزء الهوائي لـ *Medicago sativa.L*

يعتبر أفضل مضاد للجراثيم والفطريات.

## الكلمات المفتاحية :

*Medicago sativa.L*, الفلافونويد, الصابونين, البوليفينول, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للبكتيريا, النشاط المضاد للفطريات, HPLC, التربة.

## Abstract

The present work is to compare the results of phytochemical analysis of alfalfa isolated active ingredients harvested from the area of El Tarf (eastern Algeria).

The other objective is to determine the antimicrobial effect of the twelve extracts flavonoïds and saponins obtained from different parts of *Medicago sativa.L* tested sixteen bacterial strains of Gram + and Gram-group and fungus strain and the identification of the influence of the extraction solvent to the microbiological activity of flavonoïds of the plant studied.

The phytochemical study of *Medicago sativa.L* demonstrates its wealth more active ingredients such as: flavonoïds, saponins, anthocyanins and leuco-anthocyanins.

The thin layer chromatography (TLC) identified in the methanol extract phenolic compounds such as: flavones, flavonols and anthocyanins.

The results of the analyzes show that the yields of polyphenols affect the antioxidant activity of methanol extracts of *Medicago sativa.L*.

The physico chemical characteristics of the soil sample was used to determine the effect of the soil on the yield of flavonoïds and saponins in alfalfa.

Chromatographic and microbiological analysis of flavonoids and saponins alfalfa shows that the quantity and quality of these substances varies from one plant to another in the same species and from one part to another in the same plant, the differences depend on the solvent used and the extraction medium development of the plant.

The results of the microbiological study and comparison with other studies in the same field show that there is a high sensitivity of the majority of the strains to our products, we can say that the butanol extract of flavonoïds isolated from the aerial part of *Medicago sativa.L* has better antibacterial and antifungal activity.

### **Keywords:**

*Medicago sativa L*, flavonoïds, saponins, polyphenols, antioxydant activity, antibacterial activity, antifungal activity, HPLC, soil.

# Introduction générale

## Introduction

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Chevallier , 2008**). Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise la phytothérapie qui sur la base des molécules naturelles souvent associées aux traitements classiques propose des remèdes bien acceptés par l'organisme. En Algérie, pays avec plus de 3000 espèces dont 15% endémiques (**Quezel, 1963 ; Gaussen, 1982; Boutaghane, 2013**).

Notre travail constitue dans ce cadre une modeste contribution à la valorisation des plantes médicinales. La luzerne cultivée *Medicago sativa.L* a fait l'objet de plusieurs travaux publiés particulièrement sur son utilisation comme plante fourragère et sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. Elle est cultivée aussi, surtout pour les besoins agricoles. Néanmoins, ses applications thérapeutiques demeurent rares ou même inconnues. L'objectif de cette étude est de valoriser *Medicago sativa.L* en tant que plante médicinale. Notre intérêt s'est porté sur la richesse en composés chimiques de cette espèce végétale lui donnant des propriétés exceptionnelles qui lui permettent d'être classée parmi les plantes à effets thérapeutiques (**Faid et al., 1995; Hsieh, 2000** ).

L'organisme humain possède des molécules antioxydants. Certains de ces molécules sont endogènes d'autres sont exogènes qu'on peut obtenir à partir des substances apportées par l'alimentation, notamment le cas des polyphénols végétaux. Les composés phénoliques représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages thérapeutiques. Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (**Falleh et al., 2008**). L'étude réalisée sur cette espèce portera aussi bien sur l'aspect quantitatif et qualitatif d'un groupe de substances actives : les polyphénols tels que les saponines et les flavonoïdes extraits respectivement de feuilles, des tiges et du mélange de la partie aérienne de *Medicago sativa.L* ainsi que leur activité microbiologique. Le calcul du rendement et l'activité microbiologique des différents extraits, ont permis de déterminer l'influence de la partie utilisée de la plante et du solvant d'extraction sur ces derniers (**Jokić et al., 2010; Bonnaillie et al., 2012**).

Dans cette étude nos objectifs fixés sont les suivant :

Dans un premier temps, nous avons réalisés une étude bibliographique impliquant la description botanique et la composition chimique de la plante étudiée *Medicago sativa.L* et également la structure, la classification, la biosynthèse et activité biologique des deux métabolites secondaires étudiés : les flavonoïdes et les saponines.

La deuxième partie sera consacrée à la partie expérimentale portant sur la présentation des techniques d'isolement et d'analyse utilisées dans ce présent travail.

Dans un troisième temps nous présenterons les résultats obtenus : après la séparation des molécules par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) nous essayerons d'évaluer le pouvoir piègeur (scavenger) des différents extraits méthanoliques (feuilles, tiges et mélange :

feuilles/tiges) vis-à-vis au radicaux libres (DPPH), ainsi que l'identification quantitatifs des polyphénols.

Une étude physico-chimique des sols est également réalisée afin de déterminer l'impact de la nature de ce facteur édaphique sur le rendement en flavonoïdes et en saponines avec l'analyse qualitatif des flavonoïdes de *Medicago sativa. L* par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Enfin, les tests microbiologiques réalisés, nous permettront d'évaluer et de comparer l'activité antibactérienne de douze extraits obtenus à partir des feuilles, des tiges et du mélange de *Medicago sativa .L.* sur seize souches bactériennes de type Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> responsables de l'infection chez l'homme ainsi qu'une souche de champignon.

# Synthèse bibliographique



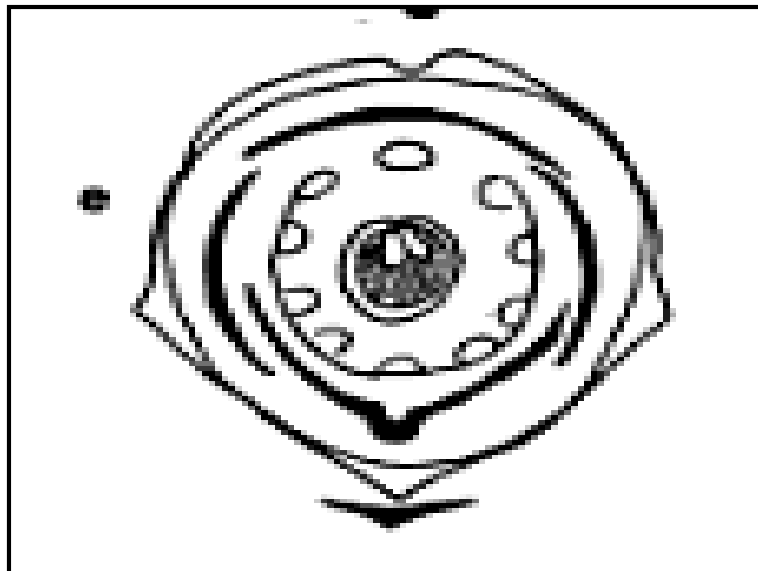
Chapitre I

Généralités sur  
*Medicago sativa.L*

## 1. Présentation de la famille des Fabacées

La luzerne cultivée ou *Medicago sativa*.L appartient à la famille des Fabacées qui constituent la troisième famille la plus importante du monde végétal (environ 12000 espèces) après les Astéracées et les Orchidacées.

Les Fabacées, au sens large, sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales. Leurs feuilles sont alternes, composées, pennées ou palmées et en général pourvues de stipules formées d'un calice gamosépale souvent bilabié et d'une corolle dite papilionacée parce que sa forme rappelle celle d'un papillon, leurs fleurs hermaphrodites, sont surtout zygomorphes et en général pentamères. La corolle qui du reste ne présente pas ce type de structure dans l'ensemble de la famille est formée d'un grand pétale supérieur, l'étendard de deux pétales latéraux parallèles, les ailes et de deux pétales inférieurs recourbés vers le bas libres ou réunis par le bord inférieur de manière à former la carène qui renferme les étamines et le pistil. Les étamines sont au nombre de 10 (figure n°01). Le fruit issu d'un seul carpelle, est un fruit sec typique (Gilbert et al., 1952 ; 1953; 1954).



**Figure 01** : Le diagramme floral de la famille des Fabacées (Boullard, 2002).

Les trois sous-familles des Fabacées sont :

- Sous-famille Caesalpinioideae avec une fleur pseudo-papilionacée ;
- Sous-famille Mimosoideae avec une fleur régulière ;
- Sous-famille Faboideae ou Papilionoideae avec une fleur typique en papillon.

On observe normalement la présence de nodules fixateurs de l'azote atmosphérique sur les racines chez les Papilionoideae et les Mimosoideae alors qu'ils sont absents chez la plupart des Caesalpinioideae (Raven et al., 2000).

Ces nodosités sont le résultat d'une symbiose entre des bactéries fixatrices d'azote, les Rhizobiums et ces différentes espèces de légumineuses. C'est pourquoi elles peuvent se développer sur des sols pauvres en azote et l'enrichir en engrais vert.

Une particularité métabolique des Fabacées est la présence d'une hémoprotéine fixatrice de dioxygène, la leghémoglobine (ou LegHb), très proche de l'hémoglobine. Cette protéine se trouve dans les nodules des racines et permet de fixer l'oxygène pour former un milieu anaérobie favorable au développement de *Rhizobium*. Dans les applications pharmaceutiques, de très nombreuses préparations (baumes, gommes, sirops, insecticides) sont faits à partir de fabacées papilionacées (Harrier et *al.*, 1995).

## 2. Origine et distribution géographique de la luzerne

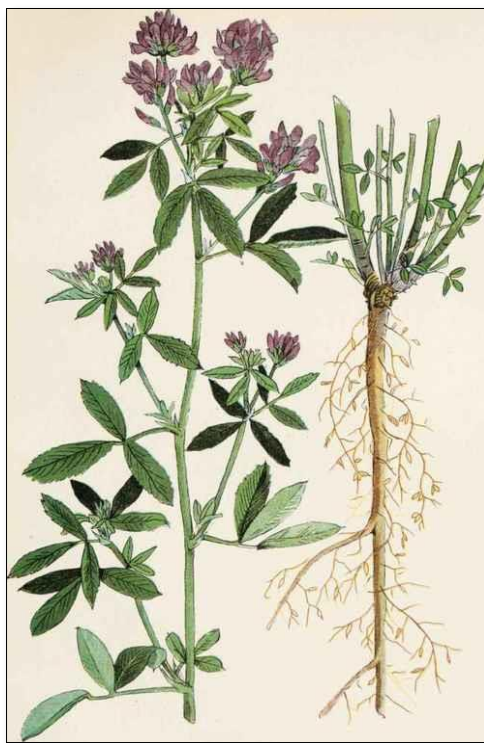
La luzerne fut introduite en Europe vers 470 avant J.C avant les guerres médiques. Elle portait alors le nom de *Medica herbà* « l'herbe de Médie », devenu plus tard le nom de genre : *Medicago*. Toutefois, les tablettes Hittites mentionnent déjà son utilisation, comme nourriture hivernale pour les animaux, 1400 à 1200 ans av.J.C.

La luzerne proviendrait des hauts plateaux du Caucase de l'Iran et de Turquie où elle était appelée Alfalfa « le meilleur des fourrages ». A l'heure actuelle, la luzerne est la plante fourragère la plus cultivée dans le monde en raison de ses propriétés nutritives et médicinales (Brooker, 2007). Elle est notamment très répandue dans les zones tempérées chaudes subtropicales et en altitude (Mauries, 2003).

## 3. Caractères botaniques et position systématique de *Medicago sativa*.L

### 3.1. Caractères botaniques

C'est une plante herbacée vivace à tige dressée dès la base puis rameuse et anguleuse. Sa hauteur varie de 30 à 90 cm (figure n° 02). Elle présente des nodules racinaires qui témoignent de son association symbiotique avec les bactéries *Rhizobium*.



**Figure 02** : La luzerne *Medicago sativa*.L (Clark et *al.*, 1913).

La première feuille est unifoliée. Les feuilles suivantes alternes, sont composées de trois folioles égales, glabres, obtuses, un peu échancrées et denticulées.

Les fleurs violettes ou bleuâtres (figure n° 03), sont réunies en grappes allongées avec un fruit sous forme d'une gousse plus ou moins enroulée et spiralée de 1 à 4 spires (figure n° 04). La floraison se déroule entre juin et octobre.



**Figure 03** La morphologie de la fleur de *Medicago sativa*.L (Perron, 2015).

Les parties aériennes sont les parties de la plante utilisées en médecine (**Malinow, 1981; Gray, 1997; Hwang, 2001**). La luzerne est une plante pérenne qui dure 2 à 10 ans selon son mode d'exploitation.

C'est une plante qui résiste très bien au gel. Durant la période de froid, elle entre en dormance. Au printemps, elle crée de nouvelles tiges à partir de son pivot central. Elle repousse après l'hiver ou après chaque coupe grâce aux réserves constituées dans ses racines durant les périodes de végétation. Ces réserves durent jusqu'à 10 mois. Elle pousse de Mars à Octobre avec en moyenne de quatre coupes par an espacées de 35 à 45 jours selon la température (**Mauries, 2003**).



**Figure 04** : Les différents organes de *Medicago sativa.L* (Papleux, 2015).

### 3.2. Position systématique

Elle est établie selon **Cronquist (1981)** :

Règne :        Plantae  
 Classe :       Magnoliopsida  
 Sous-classe : Rosidae  
 Ordre :        Fabales  
 Famille :       Fabaceae  
 Sous-famille: Faboideae  
 Genre:        *Medicago*  
 Espèce:       *sativa*

### 4. Superficies consacrées à la culture de la luzerne

Grâce à sa capacité d'assurer sa nutrition azotée par la fonction symbiotique et également par la voie de l'absorption racinaire de l'azote minéral du sol, au cours des années 80, la luzerne était cultivée sur 32 millions d'hectares à travers le monde (tableau n° 01).

En Algérie, pour la période 1995 à 1997, la superficie consacrée à la luzerne pérenne *Medicago sativa. L* se situe entre 0.37 et 0.71% de la superficie réservée aux cultures fourragères. Par rapport aux cultures herbacées sa superficie représente entre 1.86 et 3.03% pour la même période (**Chaabena, 2001**).

**Tableau 01:** Superficies occupées par la luzerne *Medicago sativa.L* à travers le monde (Maurie, 2003).

Continents et pays	Années	Hectares
<b>Total Afrique</b>		<b>434 970</b>
Algérie	1981	10 000
Egypte	1983	81 000
Afrique du Sud	1985	300 000
<b>Total Europe</b>		<b>7 494 310</b>
France	1983	566 000
Italie	2000	800 000
Suisse	1983	25 000
<b>Total Amérique du Sud</b>		<b>6 264 500</b>
Brésil	1983	26 000
Equateur	1969	30 000
<b>Total Amérique du Nord</b>		<b>14 462 042</b>
Etat Unis	2000	9 713 000
Mexique	1982	245 000

## 5. Exigences environnementales de *Medicago sativa.L*

### 5.1. Le sol

La luzerne c'est une plante exigeant beaucoup de calcium. Pour un développement optimum, elle doit donc être implantée dans un sol sain de calcaire, argileux à pH variant de 6 à 7. Dans un sol normalement équilibré, seuls les apports de potassium sont nécessaires, l'apport en azote est inutile du fait de la capacité de la luzerne à utiliser l'azote atmosphérique et l'azote minéral contenu dans le sol. Son système racinaire est suffisamment important pour puiser et valoriser les éléments nutritifs présents dans le sol (Zanin, 1998).

### 5.2. La température

La croissance optimale des plantes se situe à des températures comprises entre 15 et 30° C (Zanin, 1998).

### 5.3. L'hydratation

La luzerne pousse dans des zones à pluviométrie équilibrée, le manque d'eau freine fortement le développement des plantes ; un excès d'eau favorise le développement des maladies fongiques et prive les racines d'oxygène (Zanin, 1998).

### 5.4. La luminosité

En conditions non limitantes (bonne température et hygrométrie) la croissance dépend aussi directement du rayonnement visible intercepté au cours de la pousse (Zanin, 1998).

## **6. Composition chimique de *Medicago sativa*.L**

### **6.1. Composition nutritionnelle**

Le concentré de la luzerne est un aliment intéressant du point de vue nutritionnel par sa forte teneur en protéines et la diversité des éléments nutritionnels (tableau n° 02).

#### **6.1.1. Composition en protéines et acides aminés**

Les extraits de la luzerne contiennent entre 50 et 60% de la matière azotée totale. La protéine la plus abondante est une protéine chloroplastique soluble de 500 K Da : la rubisco (rubulose-1,5 biphosphate carboxylase-oxygénase). De nombreuses autres protéines solubles à fonction enzymatique sont également présentes mais en moindre proportion. Enfin l'extrait contient aussi des protéines membranaires et des polypeptides issus de l'hydrolyse des protéines lourdes (**Bertin, 2002**).

#### **6.1.2. Les lipides**

L'extrait de la luzerne contient en moyenne 8 à 12% de lipides sous forme d'acides gras, de glycérides, de pigments de stérols et de quinones liposolubles essentiellement des lamelles chloroplastiques. Les lipides sont très importants pour l'organisme puisqu'ils participent à l'élaboration d'hormones de prostaglandines et sont aussi indispensables à l'absorption de certaines vitamines liposolubles (**Bertin, 2002**).

#### **6.1.3. Les hydrates de carbone**

Les sucres constituent la principale et la plus économique source d'énergie pour l'organisme. Cette consommation d'énergie sous forme de glucose est quasi constante et nécessite un apport régulier de glucides par l'alimentation. Dans la luzerne, les glucides existent sous ces deux formes :

- Sucres simples : glucose (0.8%).
- Sucres complexes : saccharose (0.3%) et stachyose (0.1%), glucosanes (3.2%), pentosanes (2%), galactanes (2.7%) et mananes (0.1%) (**Bertin, 2002**).

#### **6.1.4. Les fibres**

L'extrait de luzerne contient moins de 2% de fibres sous forme de cellulose, d'hémicelluloses, d'oses polymérisés et de lignine. Ce faible taux de fibres permet la concentration des composants utiles (vitamines et minéraux) et améliore leur assimilation dans le tube digestif (**Bertin, 2002**).

#### **6.1.5. Les vitamines**

La luzerne constitue une source importante de  $\beta$  carotène (précurseur de la vitamine A) mais aussi d'autres vitamines telles que les vitamines E, K, et B9, chacun de ces éléments assurent des fonctions spécifiques très importantes au sein de l'organisme. On trouve également dans la luzerne de la choline chlorhydrate à un taux de 6.4 mg pour 10g de concentré (**Bertin, 2002**).

#### **6.1.6. Les éléments minéraux**

Les matières minérales contenues dans l'extrait de la luzerne représentent en moyenne 13 à 14% de la matière sèche (tableau n° 02). Elles sont en grande partie solubles dans l'eau et

peuvent être partiellement éliminées par lavage acide (pH 3-4). Elles participent activement à de nombreux métabolismes et à la formation des tissus. Les uns sont uniquement catalytiques, d'autres ont un rôle mixte, plastique (structure des tissus) et catalytique. Tous ces éléments présentent des propriétés fonctionnelles importantes (**Bertin, 2002**).

**Tableau 02:** Composition nutritionnelle de *Medicago sativa.L* (1mg =167µg ER) (Bertin, 2002).

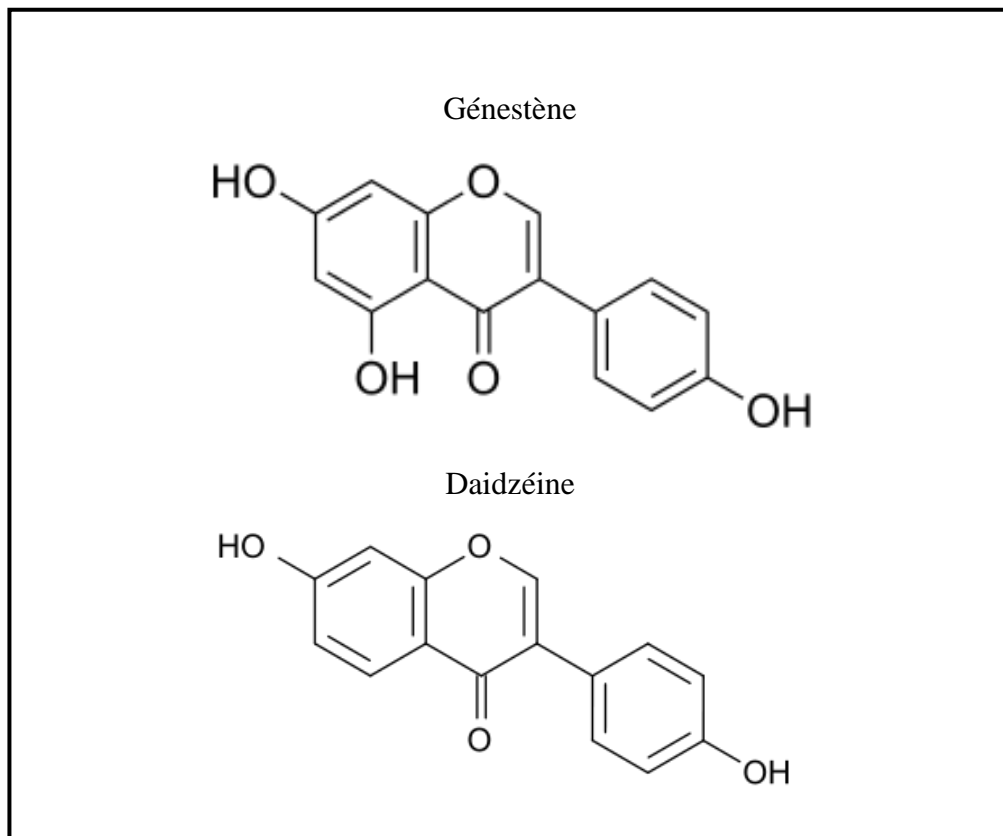
Acides Aminés	mg/g de protéines	Vitamines	Valeur pour 10g de la Luzerne
Histidine	24	A (β carotène)	750 µg ER
Isoleucine	55	B1	0.03 mg
Leucine	95	B2	0.05 mg
Lysine	65	B3 (PP)	0.06 mg
Méthionine et cystéine	31	B5	~ 0 mg
Phénylalanine et tyrosine	88	B6	0.84 mg
Thréonine	52	B8	2 µg
Tryptophane	25	B9	7.5 µg
valine	62	B12	0.14 µg
		C	6mg
		D	~ 0 µg
		E	9 mg
		K	1 mg
Oligo-éléments		Minéraux	
cuivre	0.08 mg	calcium	320 mg
iode	3 µg	magnésium	14 mg
fer	5 mg	phosphore	78 mg
zinc	0.2 mg	potassium	78 mg

## 6.2. Les substances du métabolisme secondaire

### 6.2.1. Les flavonoïdes

Flavones (apigénine, lutéoline, tricine), flavonols (quercétine, kaempférol), anthocyanes et les isoflavones qui sont des phyto-estrogènes (composés naturels et actifs jouent le même rôle des hormones dans l'organisme humain). Les produits actifs des phyto-estrogènes sont la génestène et la daidzéine (**Malinow, 1981; Gray, 1997; Hwang, 2001**) (figure n° 05).





**Figure 05 :** Les produits actifs des isoflavones (Roussel, 2006).

### 6.2.2. Les saponines

Les saponines de la luzerne présentent une variété de génines et sont réparties régulièrement à travers les différentes parties de la plante (**Massiot et al., 1986**) (tableau n° 03).

**Tableau 03:** Les différentes génines des saponines de luzerne (Massiot et *al.*, 1986).

Génines	Racine	Feuilles	Graines
Soyasapogénol C	x		x
Soyasapogénol E	x		
Soyasapogénol B		x	x
Soyasapogénol A	x	x	
Hédérangine	x	x	
Bayogénine	x	x	
Acide Médicagénique	x	x	
Acide Lucernique		x	
Acide Zanhique		x	

## 7. Intérêt de *Medicago sativa*.L

### 7.1. Intérêt écologique

La luzerne est caractérisée par une teneur en Matière Azotée Totale (MAT) importante qui peut varier de 14 à 29 % de la Matière Sèche (MS) selon le stade, les époques et les modes de récolte. La luzerne fixe l'azote atmosphérique mais elle utilise préférentiellement l'azote nitrique présent dans le sol, la concentration en azote nitrique du sol diminue d'année en année lors d'une culture de luzerne. La luzerne permet donc de récupérer et de soustraire au lessivage les surplus de nitrates présents dans le sol, protégeant ainsi les nappes phréatiques (Zanin, 1998).

### 7.2. Intérêt alimentaire

La luzerne a une remarquable composition en acides aminés qui la rend supérieure, sur ce critère, au tourteau de soja, en plus, la Rubisco est une protéine blanche extraite des feuilles de la luzerne utilisée comme diététique en pharmacie.

La luzerne comporte une combinaison particulièrement intéressante de minéraux et d'oligo-éléments. Elle est riche en vitamines du groupe B, C, D, E et A (Schoutteten, 2004).

### 7.3. Intérêt thérapeutique

1- Le noyau phénolique des phyto-estrogènes qui sont des flavonoïdes, présente des groupements OH (hydroxyles), il est en fait très semblable à celui de l'œstradiol. De plus la distance entre les groupements hydroxyles des deux extrémités de la molécule est identique, cette propriété est très importante car elle permet de rendre plus assimilatrice aux récepteurs que les œstrogènes stéroïdiens.

2- Les saponines de la luzerne ont comme effets : La diminution significative de l'absorption intestinale du cholestérol, la diminution de la progression de cellules cancéreuses et l'effet anti-oxydant.

3- La luzerne est utilisée traditionnellement dans le traitement du diabète. Cette action a été mise en évidence in vivo sur des modèles de souris diabétiques. La luzerne stimulerait notamment l'incorporation du glucose sous forme de glycogène dans le muscle abdominal et posséderait des propriétés similaires à celles de l'insuline (Malinow, 1981; Gray, 1997; Hwang, 2001).

#### 4- Autres propriétés

- anti-bactérienne et anti-fongique
- Anti-hémorragique
- Régulateur métabolique
- Hémostatique
- *Medicago sativa*.L pourrait contrer l'action anticoagulante des médicaments à action similaire. Ses effets sur la régulation du métabolisme du cholestérol pourraient s'ajouter à ceux des médicaments hypolipémiants (Malinow, 1981; Gray, 1997 ; Hwang, 2001).

#### **7.4. Intérêt fourrager**

Parmi les nombreuses utilités de la luzerne, la plus importante est celle liée à l'alimentation du bétail . La luzerne est une plante fourragère par excellence car elle est une véritable source de protéines et de carotène (**Zanin, 1998**).

#### **8. Toxicité et effets secondaires**

La luzerne ne présente pas de danger aux doses recommandées à l'exception de quelques cas d'allergie (**Malinow, 1981; Gray, 1997 ; Hwang, 2001**) et des rares cas de troubles gastro-intestinaux (diarrhées...), dermatites et arthralgies.

# Chapitre II

## Les composés phénoliques

## 1. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. La relation entre le métabolisme phénolique et le programme général de développement de l'organisme végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances.

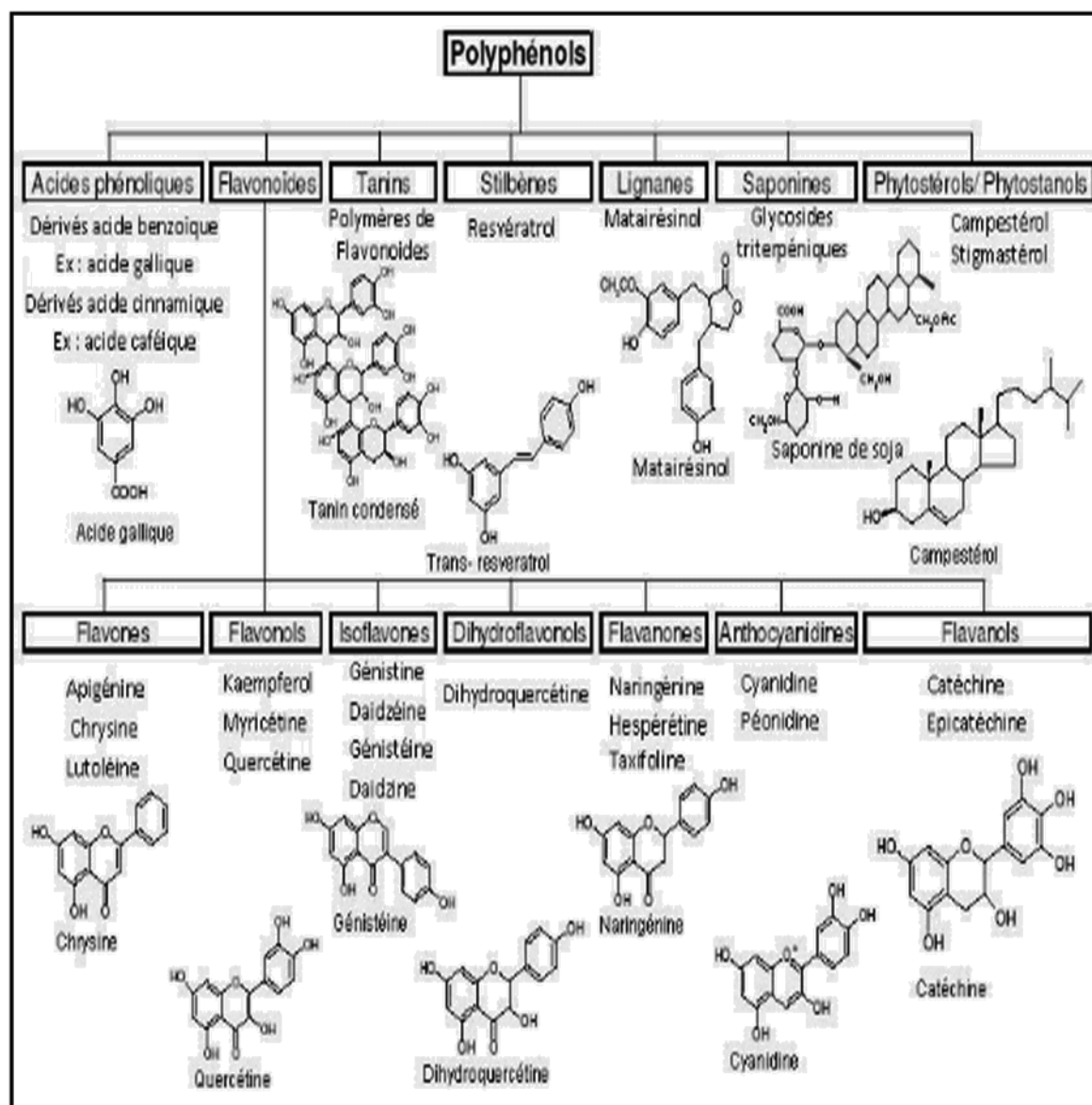
Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à des nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité et c'est pour cela, ils ont plusieurs activités selon leur voie métabolique (**Bahorun, 1997**) (tableau n° 04).

**Tableau 04 :** Les différentes activités des polyphénols (Bahorun, 1997).

Polyphénols	Activités
Acide phénols (cinnamique et benzoïque)	Anti-bactériennes, anti-fongiques et anti-oxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et anti-oedemateuses
Flavonoïdes	Anti-tumorale, anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques et anti-oxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineuses
Pranthocyanidines	Effets stabilisants sur le calogène, anti-oxydantes, anti-tumorales, anti-fongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiques	Anti-oxydantes

## 2. Classification des composés phénolique

Les polyphénols naturels sont des molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols (Figure n° 06). Les plus importants sont les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (**Yvon Gervaise, 2004**).



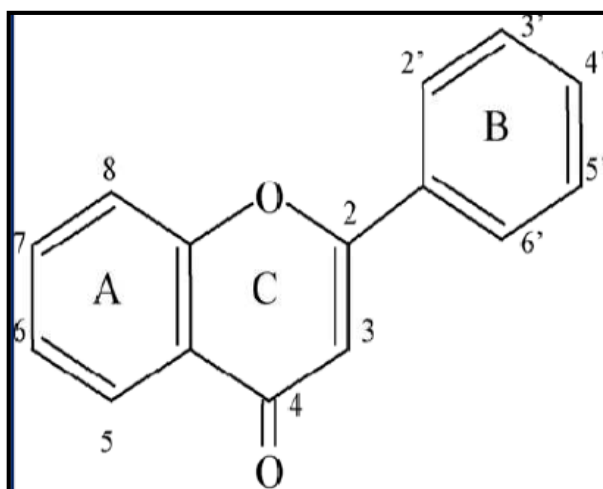
**Figure 06:** Les différentes classes des composés phénoliques (Yvon Gervaise, 2004).

## 2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances naturelles généralement colorées répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants des chromoplastes. Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes) (**Chevallier , 2008**).

Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles. Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (**Riberau–Gayon, 1968**).

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-Phenyl Chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Heller et al., 1998**) (figure n° 07).



**Figure 07 :** Structure de noyau flavone (Giulia et *al.*, 1999).

### 2.1.1. Structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés de génines, sur lesquelles sont greffés un ou plusieurs oses : D-glucose, L-rahmnose, glucorhamnose, galactose, arabinose, etc.... La liaison génine-ose existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du génine ou des ose(s) (**Macheix et al., 2005**).

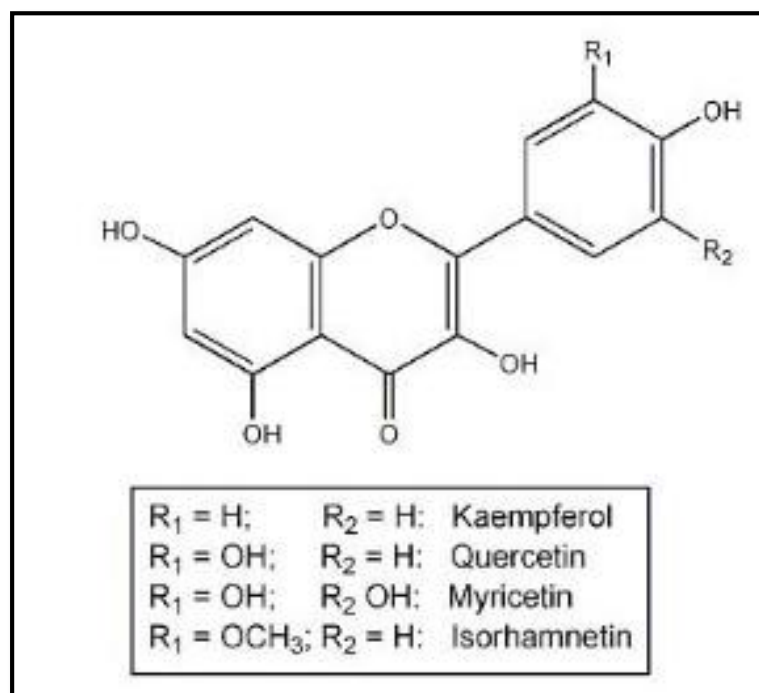
Les positions des substituants hydroxylés et méthoxylés des génines peuvent être très diverses. On obtient ainsi des O-hétérosides et des C-hétérosides ayant chacun des structures qui leur sont propres. Les C-hétérosides semblent intéressants en thérapeutique. La rupture de la liaison Génine-Ose est plus difficile dans le cas des C-hétérosides que dans celui des O-hétérosides (**Macheix et al., 2005**).

### 2.1.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont classés en plusieurs classes différentes :

#### 2.1.2.1. Les flavonols

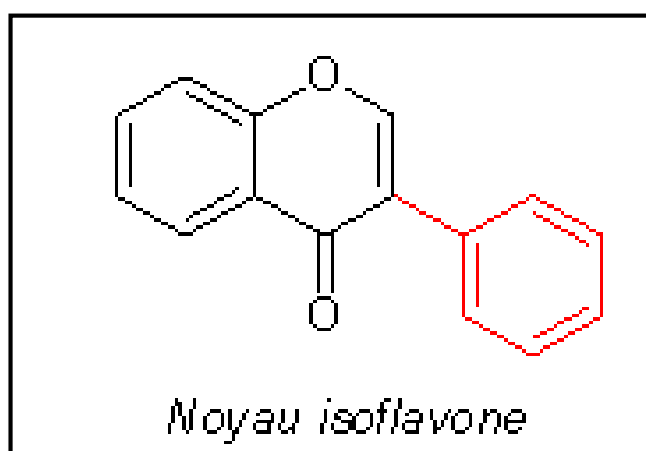
Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune. Parmi les flavonols les plus répandus, on trouve le kaempférol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7) ces deux flavonols sont incolores; le myricétol et l'isorhamétol (**Higdon, 2004**) (figure n° 08).



**Figure 08:** Structures chimiques de quelques flavonols (Higdon, 2004).

#### 2.1.2.2. Les isoflavanones

Les isoflavones font partie de la famille des flavonoïdes (génistéine-5-7-4-trihydroxyisoflavone, biochanine A, daidzéine-7-4-dihydro-isoflavone, formononétine), ils sont formés par l'oxydation et l'élimination d'une molécule d'eau d'une flavone. Selon leur formule chimique, il existe une douzaine de types structuraux, mais le squelette principal reste la même (les 3 phenylchromane). Ils se présentent presque exclusivement dans la famille des Fabacées (**Braden et al., 1967**) (figure n° 09).



**Figure 09 :** Structure des isoflavones (Giulia et al., 1999).



### **2.1.2.3. Les flavanones**

Ces composés ne comportent pas de groupements OH en position 3 et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citrons, oranges et qui sont la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose) et l'hespéridine (**Higdon, 2004**).

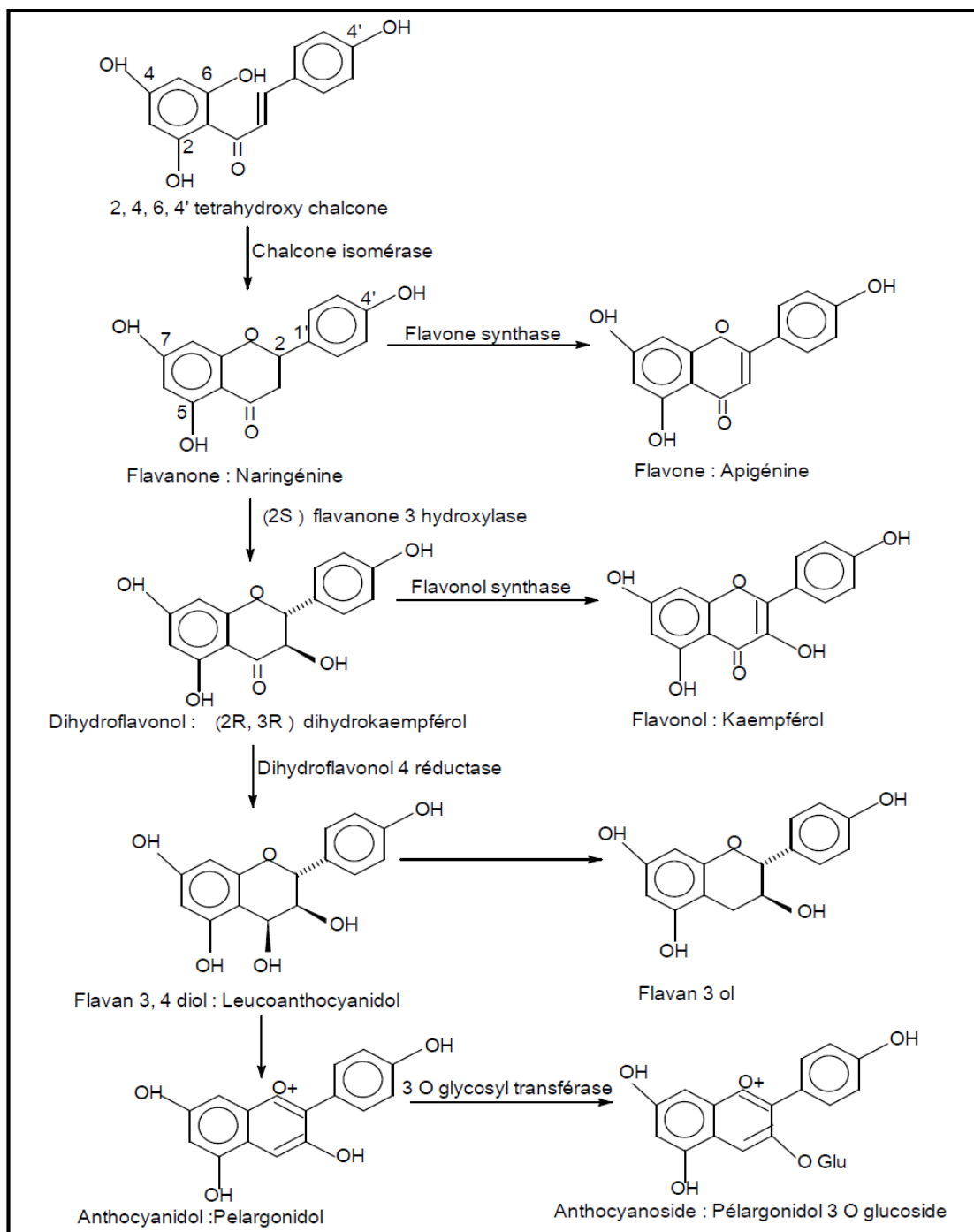
### **2.1.2.4. Les anthocyanes**

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Chevallier, 2008**).

### **2.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes**

Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (figure n° 10). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en naringénine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner l'apigénine ou le dihydroflavonol.

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase se métabolise en flavonol ou en anthocyanes, en présence de dihydroflavonol réductase se métabolise en tanins condensés (**Ono et al., 2006 ; Seeram et al., 2006**).



**Figure 10:** La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Subsamanian et *al.*, 2007).

## 2.1.4. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

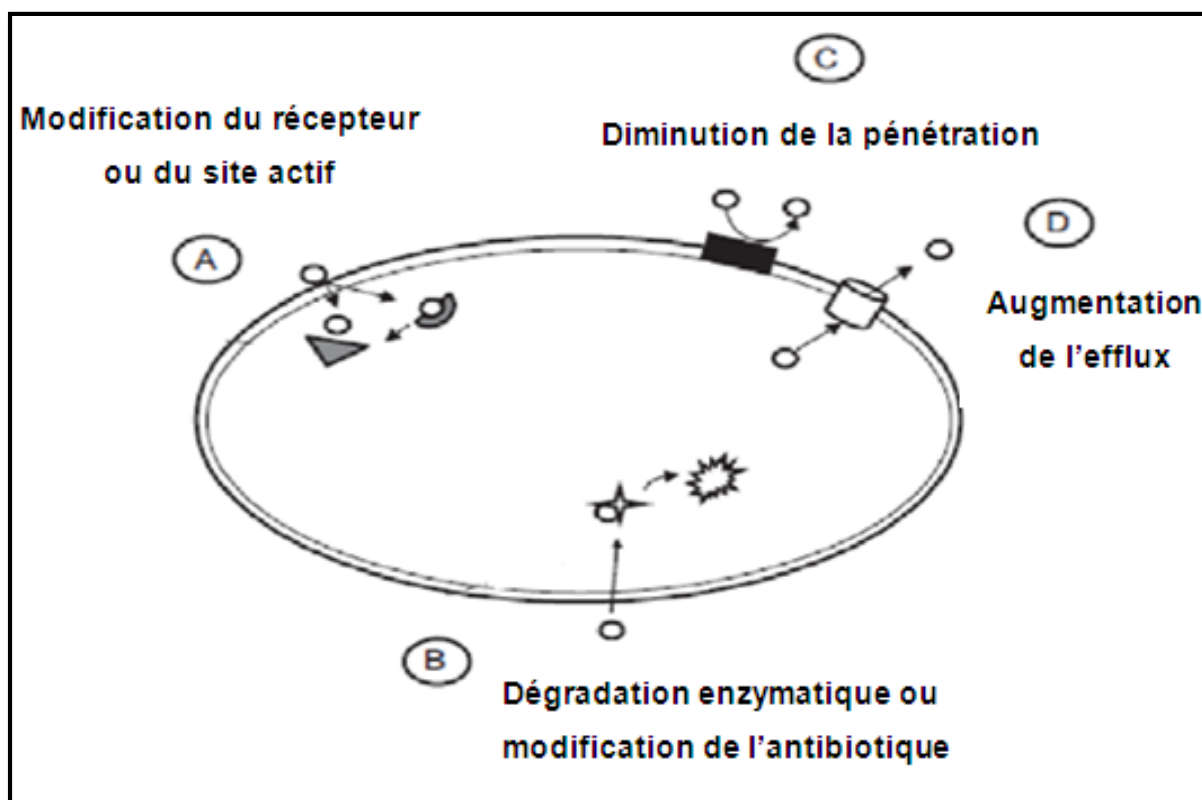
### 2.1.4.1. Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire.

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes "B" et "T". Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes "B" ou "T" peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes "T" alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes "B". L'explication est encore inconnue. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourrait s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase "C" ou protéine tyrosine kinase). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine, des basophiles et des mastocytes (Mookerjee *et al.*, 1986; Middleton *et al.*, 1994; Namgoong *et al.*, 1994).

#### 2.1.4.2. Propriétés antimicrobiennes et antivirales

Les produits antibactériens sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Figure n°11). Ces produits peuvent être synthétisés (pharmaceutiques) ou naturels (végétale).



**Figure 11:** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. ○ : La substance antibiotique, ☾ : Récepteur, ▼ : Récepteur modifié, □ : Pompe d'efflux, ☆ : Enzyme, ✦ : Dégradation de l'antibiotique (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- l'inhibition du métabolisme microbien (**Akroum, 2011**).

- **Activité antibactérienne des flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (**Babayi et al., 2004**), *Escherichia coli* (**Ulanowska et al., 2006**), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. (**Didrak, 1999 ; Modak, 2001 ; Okigbo et al., 2005**) (Tableau n° 05).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule (**Basile et al., 1999 ; Cushnie et al., 2003 ; Martini et al., 2004**).

Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (**Slavica et al., 2004**). La diffusion radiale souvent demeure utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne *in vitro*, même si la mesure par le biais de cette méthode est parfois difficile à cause des zones diffusionnelles (**Ilic et al., 2004**).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (**Dadi et al., 2009**).

En effet, selon les travaux de Dadi et ses collaborateurs, la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes : Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité. Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

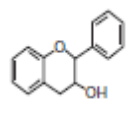
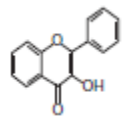
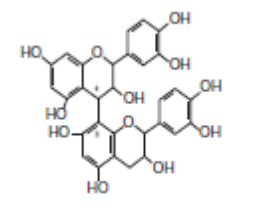
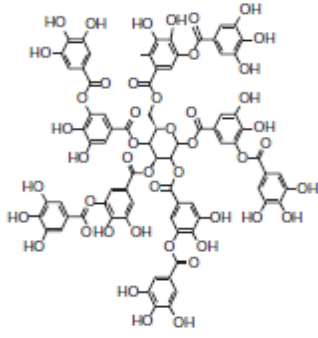
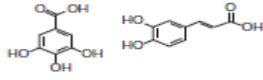
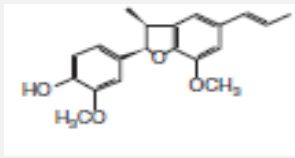
Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement (**Dadi et al., 2009**).

- **Activité antifongique des flavonoïdes**

Aussi, comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. **Batawita et ses collaborateurs (2002)**, dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.*, ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (**Kuster et al., 2009**).

Néanmoins, les études portées sur l'activité antifongique des flavonoïdes restent encore insuffisantes du fait de la grande hétérogénéité des moisissures et des levures.

**Tableau 05 :** Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2011).

Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p><b>Flavane-3-ol</b></p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 <p><b>Flavonol</b></p>	Virus Champignons	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus. <i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p><b>Tannins condensés</b></p>	Bactéries Virus	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
 <p><b>Tannins hydrolysables</b></p>	Bactéries Virus Champignons	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Listeria</i> . Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2. <i>Candida parapsilosis</i>
 <p><b>Acides phénoliques</b></p>	Bactéries	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> .
 <p><b>Néolignane</b></p>	Bactéries	Différentes souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .

- **Propriétés antivirales**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral. Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Ce mécanisme semble être impliqué dans la protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours (**Dadi et al., 2009**).

#### **2.1.4.3. Propriété antioxydante**

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (**Rice-Evans et al., 1996**), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène.

L'activité anti-radicalaire peut être évaluée par radiolyse pulsée, par l'étude spectrométrique du piégeage de radicaux colorés tel que le 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS<sup>•+</sup>).

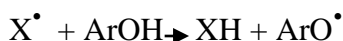
L'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Une méthode alternative consiste aussi à déterminer leur aptitude à diminuer la réaction de peroxydation des lipides (**Burda et al., 2001**).

- **Mécanismes d'action**

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont été décrits :

- **Le piégeage direct des radicaux libres**

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés (X) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène :



Le radical aryloxyde formé est stabilisé par résonance. L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique. Mais, il peut continuer à évoluer selon plusieurs processus (dimérisation, dismutation, recombinaison avec d'autres radicaux, réduction en molécule parent, oxydation en quinone) soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules.

L'activité antiradicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes (**Van Acker et al., 1996**).

- **Chélation des ions métalliques (Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>+</sup>)**

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives.

Par ailleurs, la complexation des flavonoïdes par des métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation (**Afanas et al., 2001**).

### - Inhibition d'enzyme

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase...).

Le régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' $\alpha$ -tocopherol (**Rice-Evans et al., 1996**).

### • Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (**Aliaga, 2004; Sroka, 2005**) (figure n° 12). Il s'agit de :

#### - La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B

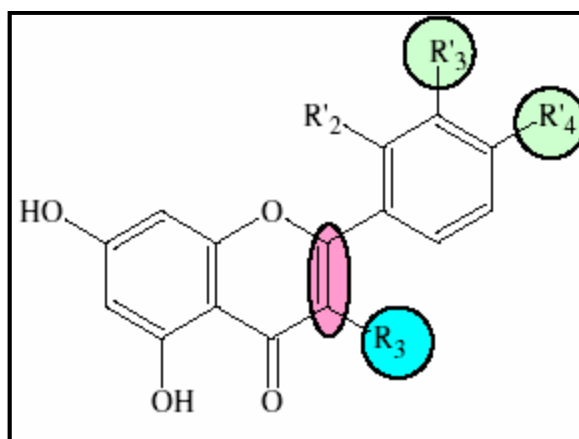
La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

#### - La présence d'un motif énone dans le cycle C

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

#### - La présence de groupement hydroxyle en position 3

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones (**Heim, 2002**).



**Figure 12 :** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Marfak, 2003).

D'autre part, plus le degré d'hydroxylation du flavonoïde est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé (Cao, 1997). De même, la polymérisation de flavonoïde peut améliorer, comme dans le cas des polymères de rutine (Kurisawa, 2003) ou des procyanidines (Lotito, 2000), ou conserver les activités antiradicalaires.

En ce qui concerne l'effet de l'acylation sur les propriétés antioxydantes, il a été principalement rapporté pour les esters galliques de la famille des flavanes (Miller, 1996) ainsi que pour les esters de rutine et d'acide succinique (Alluis, 2000).

Dans ce dernier cas, l'auteur a montré que les modifications de la partie osidique de la rutine n'altéraient pas le pouvoir antioxydant sauf dans les cas d'une succinylation élevée. Perrier et al., (1998) et Boumendjel et al., (2003) ont revendiqué la conservation de l'activité antioxydante des esters d'héspérutine et d'acide dodécandioïque.

De même, Saija et al., (2003) ont observé que l'acylation de la quercétine sur le groupe hydroxyle en position 3 avec différentes chaînes aliphatiques (acétate, propionate, palmitate) ne masque pas l'activité de piégeage de radicaux libres de la molécule parent.

Récemment, Mellou et al., (2005) ont observé que les dérivés acylés de la chrysoeriol-7-O- $\beta$ -D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside et de la chrysoeriol-7-[6'''-Oacetyl- $\beta$ -D-allosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glycopyranoside] ont une activité antimicrobienne et antioxydante plus importante que les molécules parents.

De même, Katsoura et al., (2006) ont constaté une augmentation de l'activité antioxydante avec la rutine-4'''-O-oléate. En fonction du mécanisme de l'activité antiradicalaire étudiée, quelques différences dans les relations structure-activité ont été observées.

Le tableau n° 06 résume l'effet des éléments structuraux des flavonoïdes sur les activités antiradicalaires, de complexation des métaux et d'inhibition de la peroxydation des lipides (Chebil, 2006).

**Tableau 06 :** Effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes (Chebil, 2006).

Activités	Facteurs améliorant le pouvoir antioxydant
anti-radicalaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>-le nombre de groupements OH disponibles</li> <li>-la méthylation a des effets variables et son effet est difficile à quantifier.</li> <li>-les structures possédant une double liaison C2-C3 et un seul OH en position 4'</li> <li>-une fonction catéchol sur le cycle B.</li> <li>- la présence du C4'-OH.</li> </ul>
Complexation métallique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-la présence d'une fonction carbonyle en C4 et de groupe hydroxyle en C5 et/ou C3</li> <li>- la présence d'une partie catéchol</li> <li>-la présence d'un sucre a peu d'effet</li> </ul>
inhibition de la peroxydation des lipides	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la présence d'une fonction catéchol</li> <li>-le groupement carbonyle en position 4 du cycle C</li> <li>-La présence de groupement hydroxyle en position C5, C7, C3', C4', C3</li> </ul>



#### **2.1.4.4. Propriétés anti-carcinogènes**

La quercétine, par exemple, est capable de diminuer chez le rat l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracène) ou la NMU (N-nitrosométhylurée).

Les études réalisées chez la souris abondent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs.

L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le complexe calcium-calmoduline qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur. C'est ainsi qu'un antagoniste de la calmoduline inhiberait l'induction de l'ODC (Ornitine Décarboxylase) par le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques, notamment en stimulant les systèmes de détoxification (Brusselmans et *al.*, 2005).

### **2.2. Les saponines**

Ce sont des composés naturels dont la structure est d'hétérosides (glucides), de stérols ou de triterpènes, très abondants dans les végétaux. Les saponines sont des substances tensio-actifs, qui forment des solutions colloïdales et font apparaître de la mousse comme le savon (en latin: *sapo* signifie savon) (Cheeke et *al.*, 2005) .

#### **2.2.1. Propriétés physicochimiques des saponines**

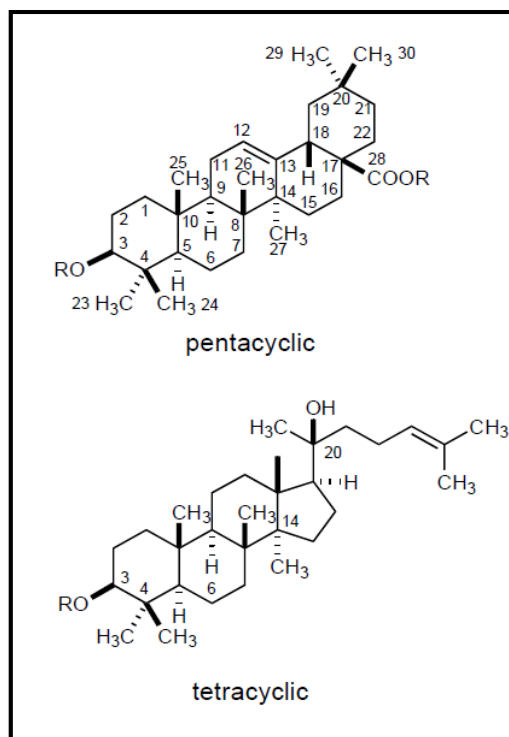
Les saponines sont formées par deux parties:

- Une partie osidique comprenant une, deux à trois chaînes de sucres ; parmi les sucres les plus connus et qui sont attachés aux génines des saponines on cite, le D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-ribose, D-rhamnose et l'acide uronique, l'acide D-glucuronique.
- Une partie aglycone dont on distingue deux classes, les saponines triterpéniques et les saponines stéroïdiques (Cheeke et *al.*, 2005).

#### **2.2.2. Les saponines triterpéniques**

La plupart des saponines végétales appartiennent à cette classe. Elles sont très abondantes chez les dicotylédones.

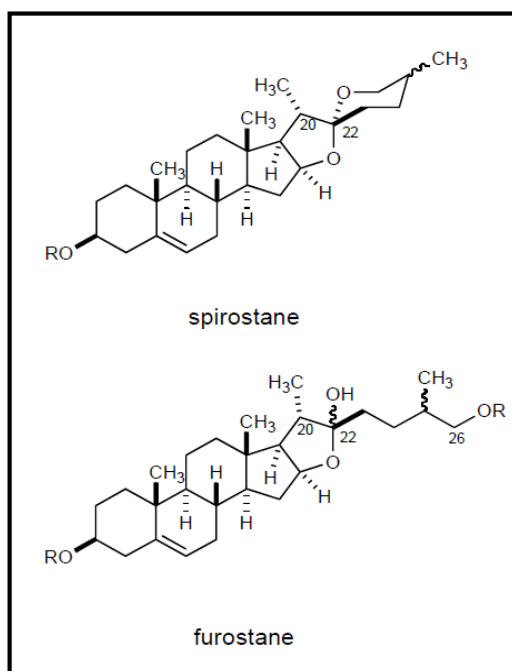
La majorité des génines triterpéniques sont des molécules pentacycliques : oleanane, ursane, hopane et plus rarement tétracyclique : lanostane (Figure n° 13) (Güclü-Ustundag et *al.*, 2007).



**Figure 13** : Structures chimiques des saponines triterpéniques (Alexander, 2009).

### 2.2.3. Les saponines stéroïdiques

Les composés de cette classe sont principalement présents chez les monocotylédones. Ils sont classés en hétérosides de spirostanales, hétérosides de furostanols et hétérosides d'amines stéroïdiques (pseudo-alcaloïdes) (Figure n° 14).



**Figure 14** : Structures chimiques des saponines stéroïdiques (Alexander, 2009).

#### 2.2.4. Propriétés pharmacologiques des saponines

Les saponines jouent un rôle pharmacologique très important. Elles sont caractérisées par leur fort pouvoir hémolytique lié à la nature de la génine et du nombre des unités osidiques. Elles sont connues par leur action anti-fongique qui est plus efficace chez les saponines à génine stéroïdiques que les saponines à génine triterpéniques.

La majorité des saponines possèdent des propriétés cytotoxiques et anti-tumorales. Elles sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, surtout les poissons.

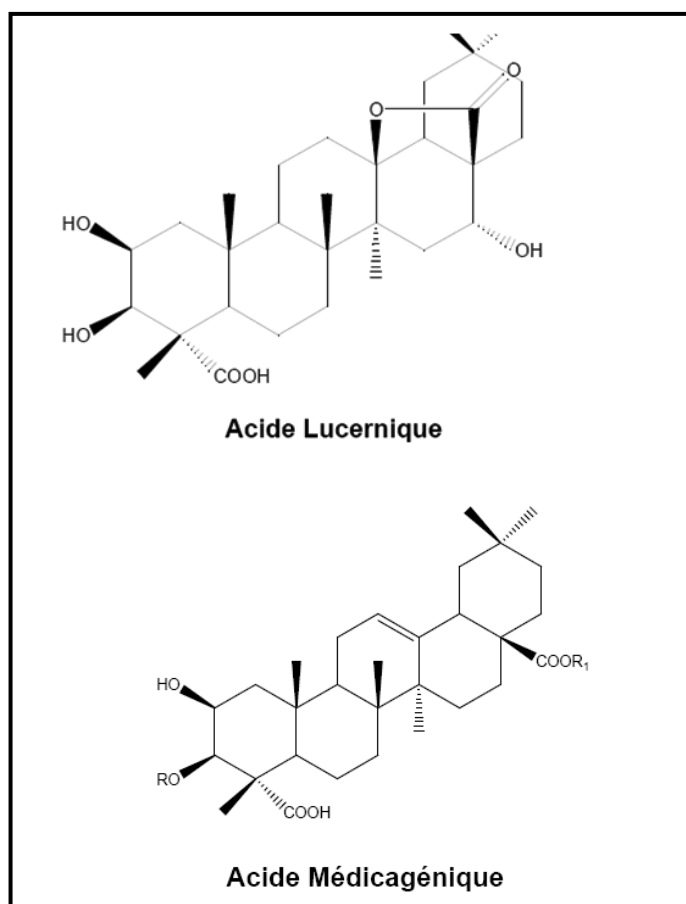
Parmi les saponines connues pour leurs propriétés médicinales importantes on peut citer:

##### 2.2.4.1. La Dioscine (saponine à génine stéroïdiques)

Trouvée dans certains légumes. Elle est connue pour son activité anti-fongique et anti-tumorale.

##### 2.2.4.2. L'acide medicagéniques et l'acide luzernique

Trouvés dans certaines variétés de la luzerne (Figure n° 15) (Massiot et *al.*, 1986).



**Figure 15 :** Les saponines de certaines variétés de la luzerne (Massiot et *al.*, 1986).

### **3. Quelques composés phénoliques utilisés en phytothérapie**

#### **3.1. Les tanins**

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail. Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour «tanner» les peaux.

Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour rendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (**Chevallier , 2008**).

#### **3.2. Les coumarines**

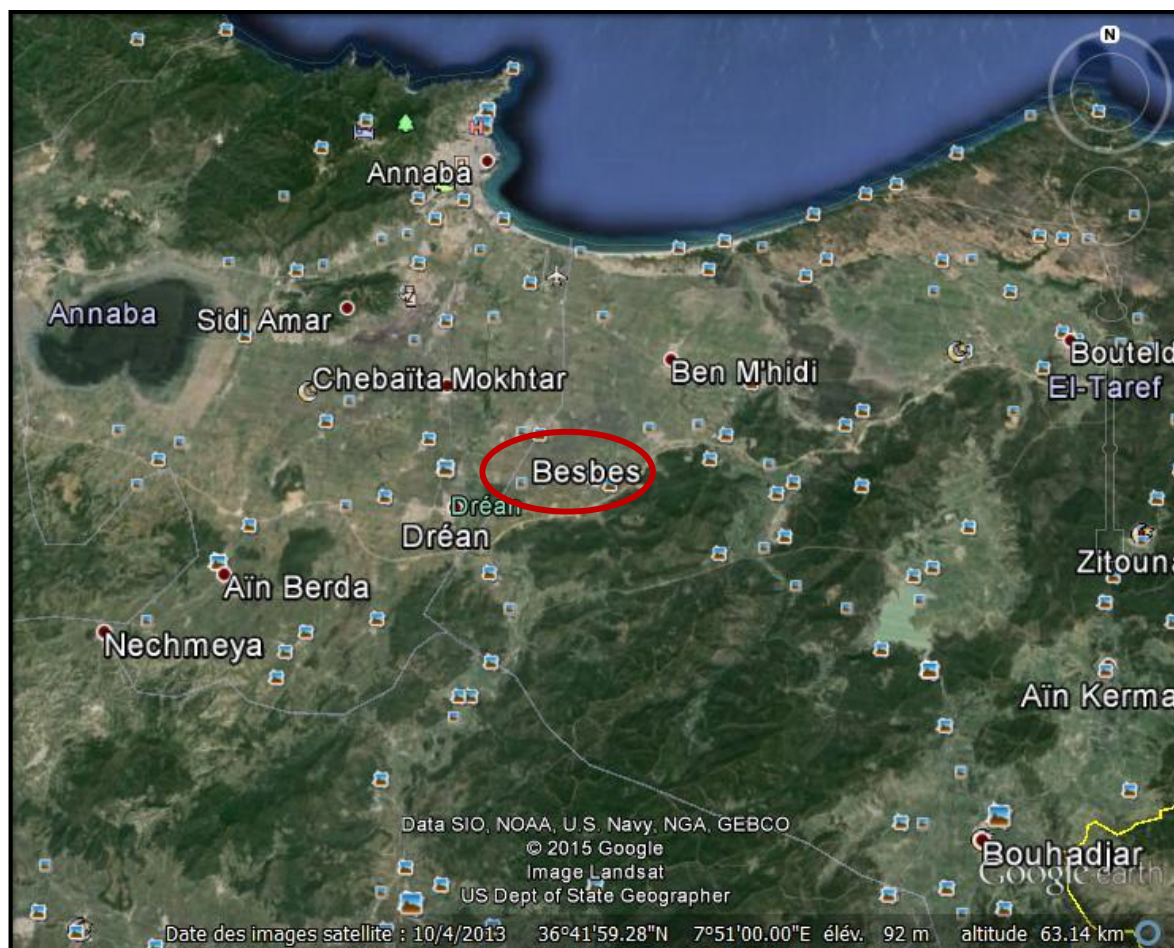
Les coumarines se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du mélilot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang alors que les furano-coumarines comme le bergaptène, contenu dans le céleri (*Apium graveolens*), soignent les affections cutanées et que la khelline de la khella (*Ammi visnaga*) est un puissant vasodilatateur coronarien (**Chevallier , 2008**).

# Partie expérimentale

## 1. Origine et récolte de la plante étudiée

La drogue est constituée par les tiges et les feuilles de la luzerne cultivée *Medicago sativa.L* qui sont ensuite soumis aux études phytochimique et microbiologique.

La récolte des parties aériennes de *Medicago sativa.L* a été réalisée au mois d'Octobre 2010 dans la région de Besbes wilaya d'El Taref Algérie (Figure n° 16). Région d'un étage bioclimatique subhumide, située entre 36° 46 Nord et 7° 54 Est à une longitude de 0 à 50 m.



**Figure 16 :** Localisation géographique du site de prélèvement (Google Earth, 2015).

Les plantes fraîchement récoltées ont été séchées à température ambiante et à l'obscurité pendant dix jours (figure n° 17).





**Figure 17** : Photo présentant un champ de la luzerne cultivée (Messioughi, 2010).

## **2. Etude histologique de l'espèce *Medicago sativa.L* (Technique de la double coloration: Rouge Congo et Vert de Méthyle)**

### **Objectif**

Identification des différents tissus de l'espèce étudiée au niveau des feuilles et des tiges.

### **Principe**

La plante a été analysée par la technique de la double coloration (vert de méthyle-rouge Congo) (Prat, 2007).

Nous avons réalisés des coupes transversales très fines au niveau des feuilles et des tiges de la luzerne, les coupes ont été mises pendant 15 à 20mn dans l'eau de javel pour vider les cellules de leurs contenus cytoplasmiques. Après un lavage des coupes avec l'eau distillée, nous avons trempé les coupes dans un bain d'acide acétique 3mn pour la fixation des colorants.

Un traitement des coupes au vert de méthyle est nécessaire pendant 5 mn pour colorer les parois lignifiées ou tubérisées en vert, bleu ou violet selon le degré de lignification de la paroi et au rouge Congo pendant 10 mn pour colorer les parois cellulodiques en rose (Les coupes pourront être conservées dans l'eau distillée, pour une courte période). Finalement nous avons déposé les coupes sur des lames (les coupes sont couvertes par une goutte d'eau puis observer les coupes à l'aide d'un microscope optique).

### **3. Screening phytochimique de l'espèce *Medicago sativa.L***

#### **Objectif**

Tester les types des métabolites secondaires présents dans l'espèce étudiée.

#### **Principe**

Certains principes actifs de *Medicago sativa.L* tel que: les flavonoïdes, les saponines; les anthocyanes et les leuco-anthocyanes ont été recherchés selon les méthodes décrites par Bruneton (2009).

#### **3.1. Recherche des anthocyanes**

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de couleur de l'infusé à 10% avec le changement du pH : Nous avons ajouté quelques gouttes d'HCl pur et nous avons observé le changement de couleur. Ensuite nous avons rajouté quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH, le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

#### **3.2. Recherche des leuco-anthocyanes**

Se fait sur prise de 5ml d'infusé, mêlé de 4ml d'alcool chlorhydrique (éthanol / HCl pur 3/1 vv). Après un chauffage au bain-marie à 50°C pendant quelques minutes il y a apparition d'une couleur rouge cerise indiquant la présence des leuco-anthocyanes.

#### **3.3. Recherche des flavonoïdes**

5g de la drogue pulvérisée sont macérés dans 150ml d'HCl à 1% pendant 24h. Après filtration 10 ml du mélange sont rendu basique par l'addition de NH<sub>4</sub>OH, la présence des flavonoïdes, s'exprime après 3h par l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube.

#### **3.4. Recherche des saponines**

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

### **4. Analyse qualitative et quantitative des polyphénols et recherche d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Medicago sativa.L*.**

#### **Objectifs**

- Identifier les principaux composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique de *Medicago sativa.L*
- déterminer la meilleure activité antioxydante (feuilles, tiges et mélange)
- Rechercher une relation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénolique.



#### 4.1. Préparation des extraits méthanoliques

##### Principe

2,5g de poudre de la drogue a été mise à macérer dans 25ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30 minutes. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 heures, filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au Rotavapor (**Falleh et al., 2008; Bougandoura et al., 2012**).

On a répété l'extraction trois fois avec les feuilles, les tiges et le mélange feuilles/ tiges.

#### 4.2. Analyse de la composition chimique de l'extrait méthanolique par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel. La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tel que :

##### ➤ Une cuve chromatographique

C'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle maintenu étanche.

##### ➤ Une phase stationnaire

C'est une couche d'adsorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm. L'adsorbant que nous avons utilisé est le gel de silice qui permet la séparation de substances lipophiles et hydrophiles d'un mélange.

##### ➤ La phase mobile

C'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.

##### ➤ Les échantillons

Ils sont le plus souvent solubilisés dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant.

##### Principe

10µl de l'extrait méthanolique du mélange (feuilles/tiges) ont été spotées sur une plaque de 10 cm déposée verticalement dans la phase mobile constituée par un éluant typique des flavonoïdes (chloroforme, acétone, ac formique (75,16.5, 8.5)) (**Wagner et al., 1996**). Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV (longueurs d'ondes  $\lambda = 254$  nm et 365 nm).

Le rapport frontal (Rf) est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support (phase stationnaire) donné, il est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.

Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (Neffar et al., 2013).

On détermine pour chaque constituant, le Rapport frontal :

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

### 4.3. Dosage des phénols totaux

#### Principe

Les teneurs en phénols totaux de la plante étudiée ont été déterminées par la méthode de Folin ciocalteu (Donald et al., 2001; Alain et al., 2011) . Un volume de 1 ml de chaque extrait méthanolique des feuilles, des tiges, et de mélange feuilles/tiges ou d'acide gallique (mg/ml) est mélangé à 1ml du réactif de Folin-ciocalteu après 5 min le mélange est diluée avec 25 de l'eau distillée et 10 ml de carbonate de sodium (7%). L'acide gallique est l'antioxydant de référence.

Après 10h d'incubation à la température ambiante (25°C), l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 760 nm. La courbe étalon est obtenue dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant une gamme de concentrations (0- 250 mg/ml) de solution d'acide gallique préparée dans le méthanol. Les teneurs en phénols totaux des extraits méthanoliques sont déterminées graphiquement et exprimées en termes d'équivalent d'acide gallique (mg/g de matière sèche).

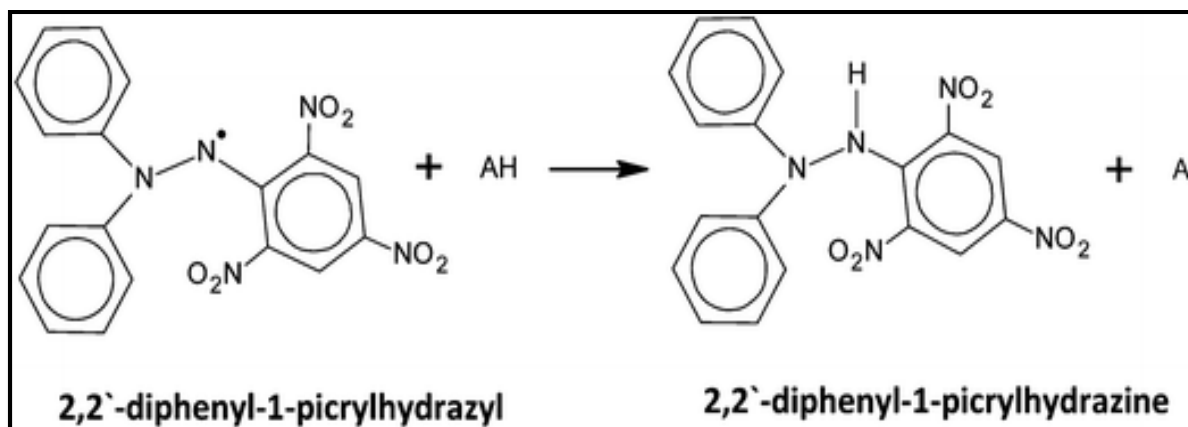
### 4.4. Évaluation de l'activité antioxydante

La mesure de l'activité antiradicalaire est effectuée conformément à la méthode décrite par Brand-Williams et al., (1995).

#### Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) en solution dans le méthanol (Markowicz Bastos et al., 2007). L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté (figure n°18). Cette décoloration peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm (Bourkhiss et al., 2010).

Dans ce test les antioxydants réduisent le DDPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).



**Figure 18** : Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

2.4mg DPPH est solubilisé dans 100 ml de méthanol. Dans des tubes on introduit 100µl de chaque extrait méthanolique des feuilles, des tiges et de mélange feuilles/tiges de *Medicago sativa.L* (1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.1mg/ml, 0.05mg/ml) et on ajoute 2ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un Vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 2 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 100 µl de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHT (Lopes-Lutz et al., 2008).

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

## 5. Effet de la composition physicochimique du sol de prélèvement sur le rendement des principes actifs de la luzerne

### Objectif

Déterminer l'impact des facteurs édaphiques sur le rendement en flavonoïdes et en saponines de la luzerne cultivée.

### 5.1. Analyse du sol de prélèvement

#### 5.1.1. Texture

Pour déterminer la texture du sol, nous avons utilisé la méthode de saturation à l'eau qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (Y) et à le comparer à une échelle qui détermine la texture correspondante à la teneur d'eau (tableau n° 07).

La technique est la suivante :

Nous avons pris 50g de sol et nous les avons imbibé d'eau, goutte à goutte tout en mélangeant jusqu'au point où la pâte devienne luisante et glisse doucement lorsqu'on incline le mortier.

Ensuite, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Peser une capsule vide (P1)
- Prendre une petite quantité de pâte (sol humide) et la mettre dans la capsule puis repeser (P2)
- Mettre à l'étuve à 105°C pendant 24h
- Peser une troisième fois la capsule à la sortie de l'étuve (P3), le poids correspond donc au poids de la capsule vide+ le poids du sol sec
- Pour calculer:

$X1 = P2 - P3$  (poids de l'humidité).

$X2 = P3 - P1$  (poids du sol).

Ensuite appliquer la règle de trois pour calculer le pourcentage d'humidité :

$X1 \rightarrow X2$  g de sol sec

$Y \rightarrow 100$ g de sol sec

Enfin comparer Y au tableau suivant pour déterminer la texture :

**Tableau 07 : Echelle de la texture (Soltner, 1981).**

Pourcentage d'humidité (%)	Textures
< 12	Sableuse
12-24	Sablo-limoneuse
24-37.5	Limono-sableuse
37.5-45	Limono-argileuse
45-75	Argilo-limoneuse
>75	Argileuse

### 5.1.2. Matière organique

Déterminée à partir du carbone selon la méthode de **Anne (1945)**

On met 1 g de sol dans un erlen Mayer, on ajoute 10ml de bichromate de potassium (8%) avec 15ml d'acide sulfurique concentré. On laisse bouillir pendant 5mn sur une plaque chauffante, puis refroidir, transvaser le contenu dans une fiole de 100ml et ajouter de l'eau jusqu'au trait de jauge.

On prend 20ml de la solution, on ajoute 200ml d'eau distillée puis on ajoute 2 à 3 gouttes de diphénylamine et une pincée de NaF, on titre la solution avec le sel de Mohr (0.2N) jusqu'à virage de la solution qui passe de la couleur violette à la couleur verte.

La quantité du sel de Mohr utilisée est X.

Faire un témoin dans les mêmes conditions que l'échantillon, mais sans sol, soit Y la quantité de sel de Mohr utilisée pour le titrage du témoin.

On applique la relation suivante :

$$\%C = (Y - X) \times 0.615 \text{ mg} \times (100/20) \times (100/P) \times (1/1000)$$

**Y :** la quantité de sel de Mohr utilisée pour titrer le témoin

**X :** la quantité de sel de Mohr utilisée pour l'échantillon à doser

**0.615 :** facteur d'équivalence entre le sel de Mohr et le carbone (en mg)

**100/20 :** on a utilisé 20 ml à partir de 100 ml.

**P :** poids du sol (1g)

**1/1000 :** facteur de conversion du mg en g

On calcule le pourcentage de la matière organique par la formule suivante :

$$\% \text{matière organique} = \% C \times 1.72$$

Enfin on compare les résultats au tableau n° 08

**Tableau 08:** Classification des sols d'après leur teneur en matière organique (Soltner, 1981).

% de la MO	Appréciation
<1	Extrêmement faible
1 - 1.5	Très faible
1.5 – 2.5	Faible
2.5 – 3.5	Moyenne
3.5 – 4.5	Moyennement élevée
4.5 - 5	Elevée
>5	Très élevée

### 5.1.3. pH eau

Pour déterminer le pH eau :

- Tamiser le sol à analyser avec un tamis de 2mm de diamètre
- Peser 5g de sol dans un bécher et ajouter 25 ml d'eau distillée.
- Agiter et laisser reposer
- Mesurer le pH eau au moyen d'un pH mètre.

### 5.1.4. pH KCl

La détermination de l'acidité d'échange se fait de la même manière que pH eau mais à la place de l'eau distillée on met une solution KCl (1N), le pH KCl donne une idée exacte de la quantité d'ions H<sup>+</sup> fixés.

La classification du sol selon leur pH a été effectuée à partir du tableau n° 09

**Tableau 09:** la gamme de pH des sols (Soltner, 1981).

pH	Désignation des sols
3 – 4.5	Extrêmement acides
4.5 - 5	Très fortement acides
5 – 5.5	Très acides
5.5 - 6	Acides
6 – 6.75	Faiblement acides
6.75 – 7.25	Neutres
7.25 – 8.5	Alcalin
> 8.5	Très alcalin

#### 5.1.5. Conductivité électrique

La conductivité électrique est la mesure du degré de la salinité globale d'un sol.

La détermination de la conductivité électrique se fait sur extrait de sol (rapport sol/eau=1/5) à l'aide d'un conductimètre (tableau n° 10).

**Tableau 10:** Echelle de salinité du sol (USSSL ,1954).

Conductivité électrique (mS/cm)	Salure
0 – 0.6	Non salé
0.6 – 1.4	Peu salé
1.4 – 2.4	Salé
2.4 - 6	Très salé

#### 5.1.6. Dosage du calcaire total par titrimétrie

- Peser 5 à 25 g du sol déposés dans un Erlen Mayer, ajouter 50ml d'HCl à 0.5N
- Bouillir pendant 5 mn
- Laisser refroidir
- Filtrer le contenu avec un rinçage à l'eau distillée pour lessiver le HCl en excès
- Déterminer la quantité d'HCl qui n'a pas réagit avec le CaCO<sub>3</sub> en ajoutant deux gouttes de phénolphtaléine et titrer avec NaOH à 0.25 N

➤ Appliquer la formule suivante :

$$\% \text{CaCO}_3 = \frac{(50 \times N_1 \text{ HCl} - N_2 \text{ NaOH} \times X)}{P_0} \times 5$$

**X** : volume de NaOH titré par ml

**P<sub>0</sub>** : le poids du sol en g

**N<sub>1</sub>** : normalité HCl

**N<sub>2</sub>** : normalité NaOH

Les résultats obtenus ont été comparé avec le tableau n° 11

**Tableau 11:** Echelle internationale d'évaluation du calcaire dans les sols (Baize, 2000).

Taux du calcaire (%)	Appréciation
0 à 5%	Sols non calcaires
5 à 15%	Sols moyennement calcaires
15 à 30%	Sols calcaires
> 30%	Sols très calcaires

## 5.2. Extractions

Parmi l'ensemble des métabolites, deux uniquement ont fait l'objet de notre étude microbiologique : les saponines et les flavonoïdes qui sont les plus importants classes des polyphénols.

Nous avons effectués trois extractions pour chaque principe actif (saponines et flavonoïdes) : extraction des feuilles, extraction des tiges et une troisième extraction du mélange feuilles/tiges.

### 5.2.1. Procédé d'extraction des flavonoïdes

- **Présentation du système d'extraction au Soxhlet**

L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de solides (matériel végétal) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un



réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé (Figure n° 19). L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus foncé (**Houghton, 1998**).



**Figure 19** : photo présentant l'appareil de soxhlet (Messioughi, 2010).

### Principe

L'extraction a été effectuée par la méthode de **Paris (1954)**: ainsi 40 g de drogue sont macéré dans 800ml d'éthanol à 90% pendant une heure. Le résidu est macéré une seconde fois à chaud dans 800ml d'éthanol dans le Soxhlet pendant 4 heures, après une nuit de repos, évaporation sous pression réduite des deux solutions éthanolique, reprise par 80 ml d'eau bouillante du résidu sec (figure n° 20).

#### ➤ Extraction par l'éther

Après filtration, extraction de la solution aqueuse obtenue précédemment quatre fois par l'éther diéthylique (Ethoxyethane) (4x40 ml).

#### ➤ Extraction par l'acétate d'éthyle

Deuxième extraction de la solution aqueuse quatre fois par l'acétate d'éthyle (4x40 ml).

#### ➤ Extraction par le butanol

Troisième extraction de la solution aqueuse cinq fois par le butanol (butan-1-ol ou n-butanol) (5x40 ml).

A la fin on a obtenue neuf extraits :

**FFPE** : flavonoïdes des feuilles phase étheré,

**FFPA** : flavonoïdes des feuilles phase d'acétate d'éthyle,

**FFPB** : flavonoïdes des feuilles phase butanolique,

**FTPE** : flavonoïdes des tiges phase étheré,

**FTPA** : flavonoïdes des tiges phase d'acétate d'éthyle,

**FTPB** : flavonoïdes des tiges phase butanolique,

**FFTPE** : flavonoïdes de mélange feuilles et tiges phase d'étheré,

**FFTPA** : flavonoïdes de mélange feuilles et tiges phase d'acétate d'éthyle,

**FFTPB** : flavonoïdes de mélange feuilles et tiges phase butanolique.

Le rendement est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la drogue traitée. On a effectué trois répétitions pour chaque extraction.

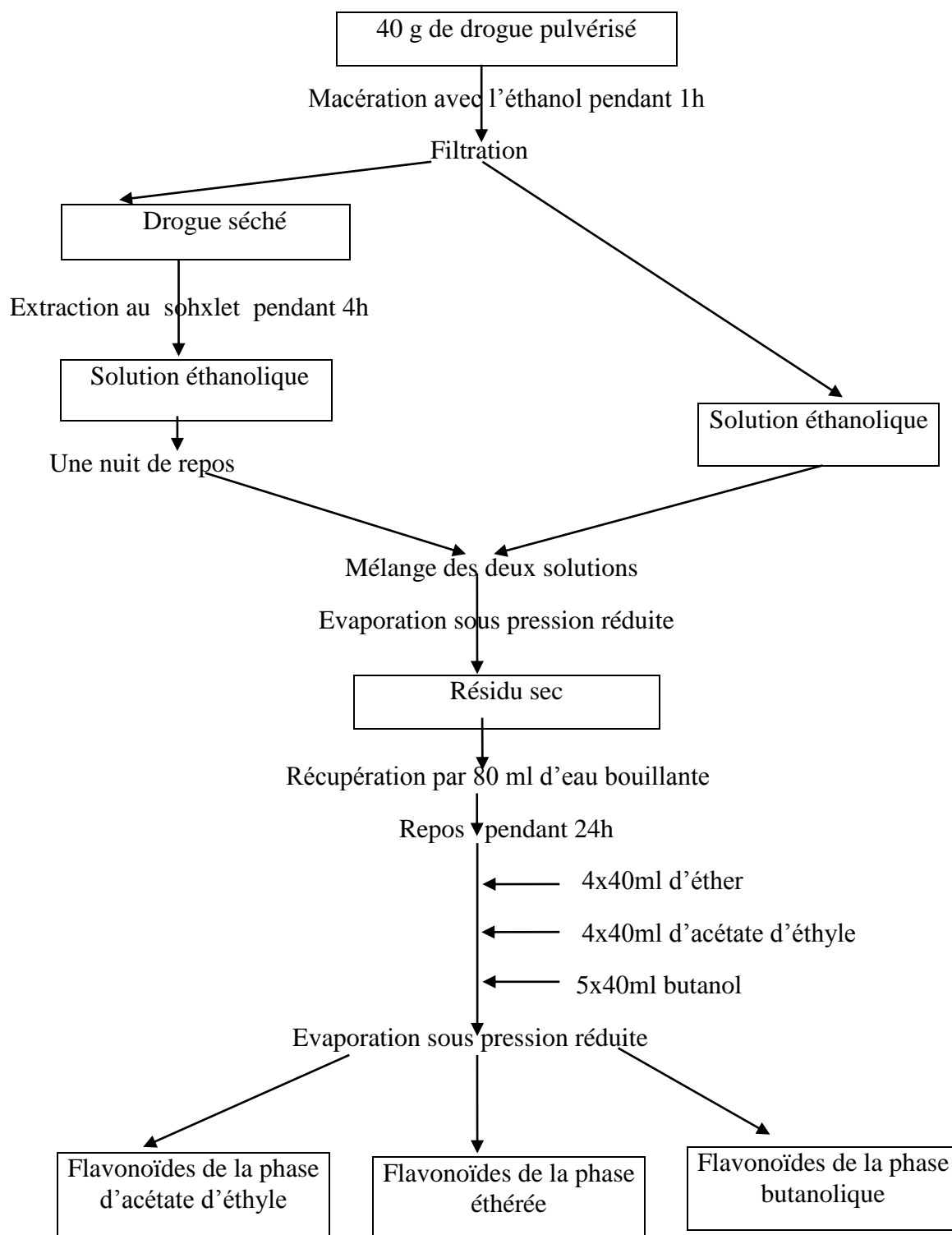
### **5.2.2. Extraction des saponines**

Les saponines ont été extraites selon la méthode élaborée par **Applebaum et al. , (1969)**.

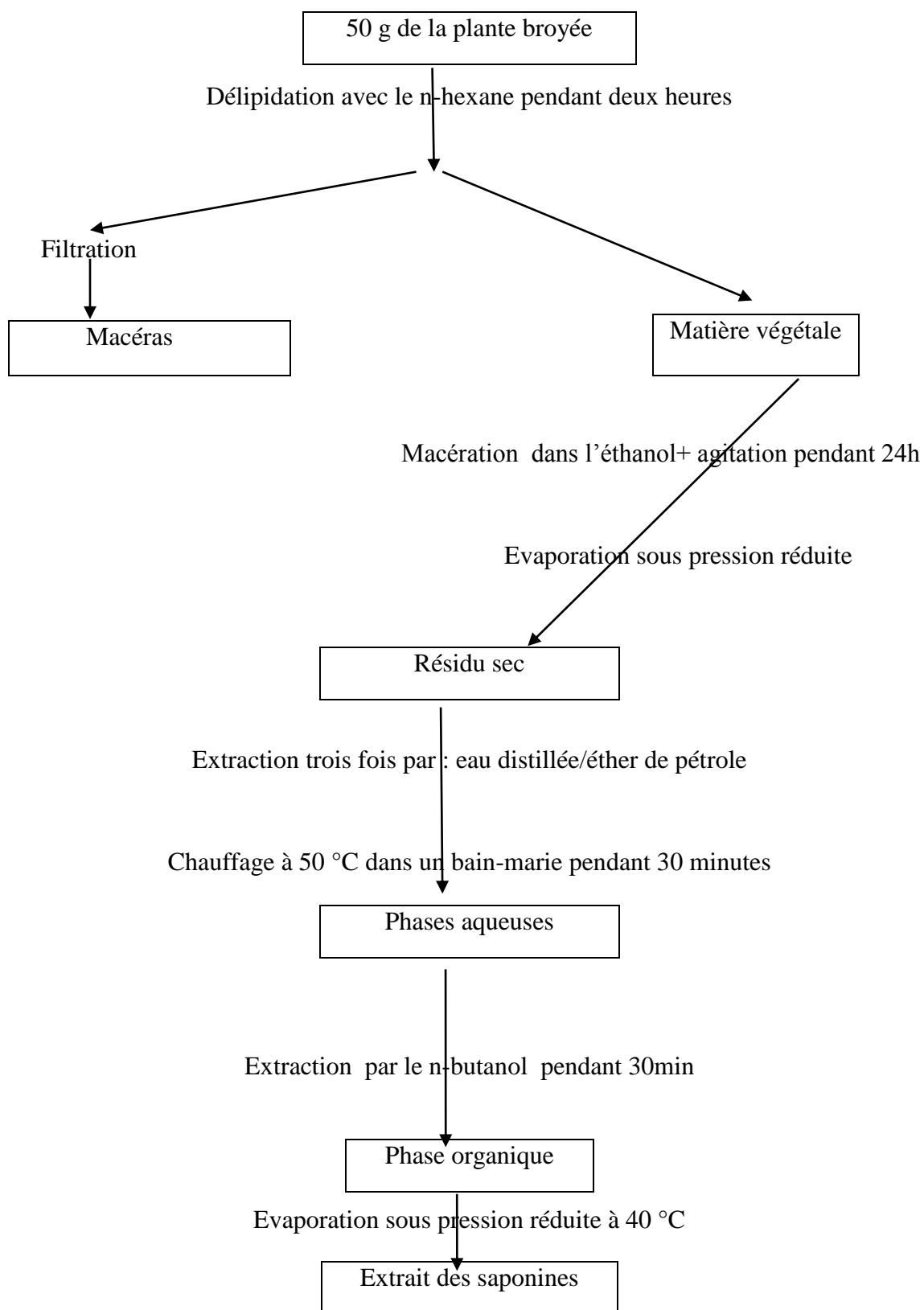
#### **Principe**

50 g de la plante broyée et délipidé durant deux heures par 250 ml du n-hexane, après filtration la matière végétale est macérée dans 300 ml d'éthanol sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 24 heures. Après l'évaporation de la phase éthanolique le résidu sec a été extrait trois fois par 100 ml du mélange eau distillée/ éther de pétrole (v:v) chauffé à 50 °C dans un bain-marie pendant 30 minutes. Les phases aqueuses sont extraites par 150 ml de n-butanol pendant 30 minutes. La phase organique, évaporée à sec à 40°C par le rotavapor.

On a obtenue trois extraits : **SF** : saponines des feuilles, **ST** : saponines des tiges et **SFT** : saponines de mélange feuilles et tiges (figure n° 21).



**Figure 20 :** Présentation schématique de la méthode d'extraction des flavonoïdes (Paris, 1954).



**Figure 21 :** Présentation schématique de la méthode d'extraction des saponines (Applebaum et *al.*, 1969).

## **6. Analyse qualitatives des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance HPLC et étude microbiologique des deux principes actifs de *Medicago sativa.L***

### **Objectifs**

- Déterminer les types de molécules présents dans les flavonoïdes de la luzerne cultivée par HPLC
- Confirmer le type de solvant (éther, acétate d'éthyle et le n-butanol) adéquat pour une meilleure activité microbiologique des flavonoïdes
- Identifier l'influence de la partie utilisée de la plante dans l'extraction des flavonoïdes et des saponines sur l'activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif, des bactéries à Gram-négatif et une souche de champignon.

### **Matériel microbiologique**

Seize souches bactériennes ont fait l'objet d'une étude microbienne: deux référenciées, quatorze souches isolées de produits pathogène et *Candida albicans* (tableau n° 12).

Dans l'étude d'antibiogramme on a utilisé cinq antibiotiques : Vancomycine (Vancocin), Teicoplanine (Targocid) et Benzylpénicilline (Pénicilline G), Céfixime (Oroken) et Doxycycline (Vibramycine). Les souches microbiennes et les antibiotiques issus de laboratoire de microbiologie, faculté de médecine Annaba, Algérie.

**Tableau 12:** Les différentes souches testées et leurs principaux caractéristiques (Ekoumou, 2003).

Souches	Pathologie	Groupes	
<i>Enterobacter cloacae</i> 19	Associées à des épidémies nosocomiales	Bacilles  groupe des Entérobactéries  (BGNE) <b>(Gram-)</b>	
<i>Escherichia coli</i>	Infection urinaire, infection des parties molles.		
<i>E. coli ATCC 23</i>			
<i>Klebsiella oxytoca</i>			Infections nosocomiales.
<i>K. pneumoniae</i>	Infections nosocomiales, infections des voies respiratoires.		Entérobactéries
<i>Proteus mirabilis</i>	infection des voies urinaires		
<i>Salmonella sp</i>	peuvent contracter la salmonellose (grippe intestinale)		
<i>Serratia marcescens</i>	Infections nosocomiales.		
<i>Shigella</i>	La shigellose (maladie diarrhéique)		Bacilles  groupe des non Entérobactéries (BGNNE) <b>(Gram-)</b>
<i>Pseudomonas</i>	Infections des voies respiratoires, infection des parties molles, infections nosocomiales.		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	infections nosocomiales		
<i>Staphylococcus aureus</i> 240	infections des voies respiratoires, infection urinaire, infection cutanée, infection des parties molles, infections nosocomiales.		
<i>S. aureus ATCC 12</i>			
<i>Staphylococcus hominis</i>	infections nosocomiales	Coccis  <b>(Gram<sup>+</sup>)</b>	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	infections urinaires		
<i>Staphylococcus warneri</i>	infections nosocomiales et bactériémie chez les prématurés		
<i>Candida albicans</i>	La Candidose buccale (la présence de plaques blanchâtres irrégulières sur les surfaces muqueuses buccales)	champignon polymorphe	

## **6.1. Etude détaillée des éléments d'un appareil d'HPLC**

L'HPLC est la technique séparative la plus fréquente qui nous a permis la caractérisation des composés polyphénoliques (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants (figure n° 22).

### **6.1.1. La colonne**

Elle est remplie d'une phase stationnaire greffée non polaire, il est possible d'effectuer des séparations à des températures variables (**Brière, 2011**).

### **6.1.2. L'éluant**

La colonne utilisée contenant une phase stationnaire non polaire (encore appelée phase inverse) on choisira un solvant soit polaire soit moyennement polaire, ce qui permet l'utilisation de l'eau, solvant polaire, associée à des solvants moins polaires tels que le méthanol, l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane (**Brière, 2011**).

L'utilisation de solvants en HPLC implique le respect de quelques règles essentielles :

- utilisation de solvants spécifiques pour l'HPLC
- utilisation d'eau déminéralisée exempte de toute trace de matière organique
- filtration nécessaire des solvants sur filtres spéciaux (0,4 à 0,5  $\mu\text{m}$ )
- dégazage des solvants aux ultrasons après filtration
- les solvants utilisés en HPLC sont fraîchement préparés chaque jour selon les règles énoncées ci-dessus.

### **6.1.3. Les pompes**

Les pompes utilisées en HPLC permettent de délivrer les solvants à débit constant sous de fortes pressions pouvant atteindre quelques centaines de bar (**Brière, 2011**).

### **6.1.4. L'injecteur**

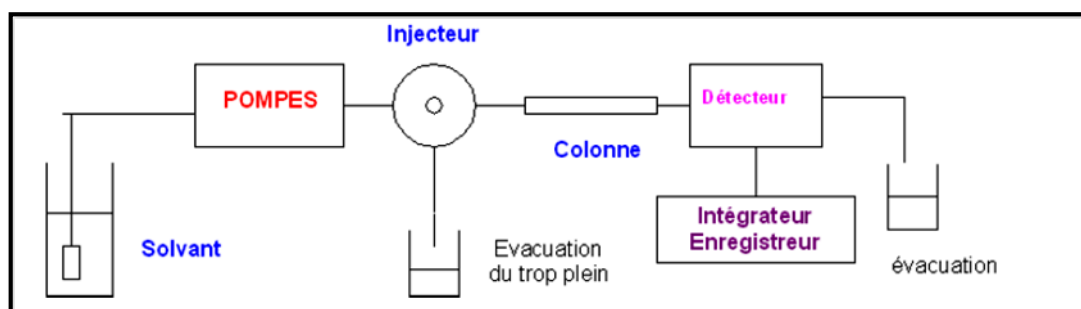
Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixée à 10, 20, 50, ...  $\mu\text{l}$ . Cette boucle calibrée, remplie de l'échantillon à étudier, peut être introduite, sans variation importante de la pression, dans le circuit allant des pompes vers l'entrée de la colonne pressions pouvant atteindre quelques centaines de bar (**Brière, 2011**).

### **6.1.5. Le détecteur**

Le type de détecteur le plus utilisé en HPLC est un détecteur à absorption U.V, travaillant à une longueur d'onde fixe mais réglable dans la gamme 190 - 800 nm. Il est constitué d'une cuve à circulation en quartz, d'une capacité d'environ 10  $\mu\text{l}$ , traversée en continu par le faisceau U.V (**Brière, 2011**).

### 6.1.6. Le calculateur-enregistreur

Le signal généré par le détecteur est transmis au calculateur muni d'une table traçante intégrée (Brière, 2011).



**Figure 22 :** Schéma représentant une chaîne d'HPLC (Brière, 2011).

### Principe

L'analyse est réalisée par un HPLC (VP SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH).

20 µl de l'extrait **FFTPB** récupéré dans 1 ml de méthanol (1mg/1ml) ont été injectés sur une colonne de type ODS 5µm, de dimensions égales à 250 mm x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de deux éluants : l'eau distillée et l'acétonitrile dont les pH sont ajustés à 3.1 par l'acide acétique. Le gradient d'élution appliqué est de type linéaire, étalé sur 30 min, en commençant par de l'eau distillée et en terminant par 100% d'acétonitrile. Le débit est de 1 ml / min. La détection a été effectuée par un détecteur UV visible à longueur d'ondes variables à 254 nm.

Les flavonoïdes analysés ont été identifiés par comparaison avec les temps de rétention obtenus pour des témoins, décrits dans la littérature (Galati et al., 2003 ; Maataoui et al., 2006) .

## 6.2. Test d'activité antibactérienne

### 6.2.1. Réactivation

Les souches ont été au préalable réactivées par ensemencement dans un milieu gélosés adaptés et à partir de 3 à 5 colonies isolées et similaires, on a préparé les suspensions bactériennes obtenues de l'eau physiologique stérile à une concentration de  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml (Colony-Forming Unit).

### 6.2.2. Ensemencement

La méthode de culture sur un milieu Müller-Hinton selon standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale utilisée est celle de Vincent (1992).

### 6.2.3. Disposition des disques

Des disques de papier buvard calibrés et stériles sont imprégnés par les solutions à tester à l'aide d'une micropipette (10µl pour chaque disque). La solution mère (SM) est préparée à partir d'un milligramme d'extrait et un millilitre de DMSO. Dans le premier essai on a effectué plusieurs dilutions de l'extrait **FFTPB** avec le DMSO (1/2, 1/4, 1/8, 1/16).



#### 6.2.4. Lecture

Les boîtes sont disposées dans l'étuve à 35°C pendant 24h. La lecture se fait par la mesure en millimètre du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (**Choi et al., 2006; Doughari et al., 2007; Bssaibis et al., 2009; Hambaba et al., 2012**).

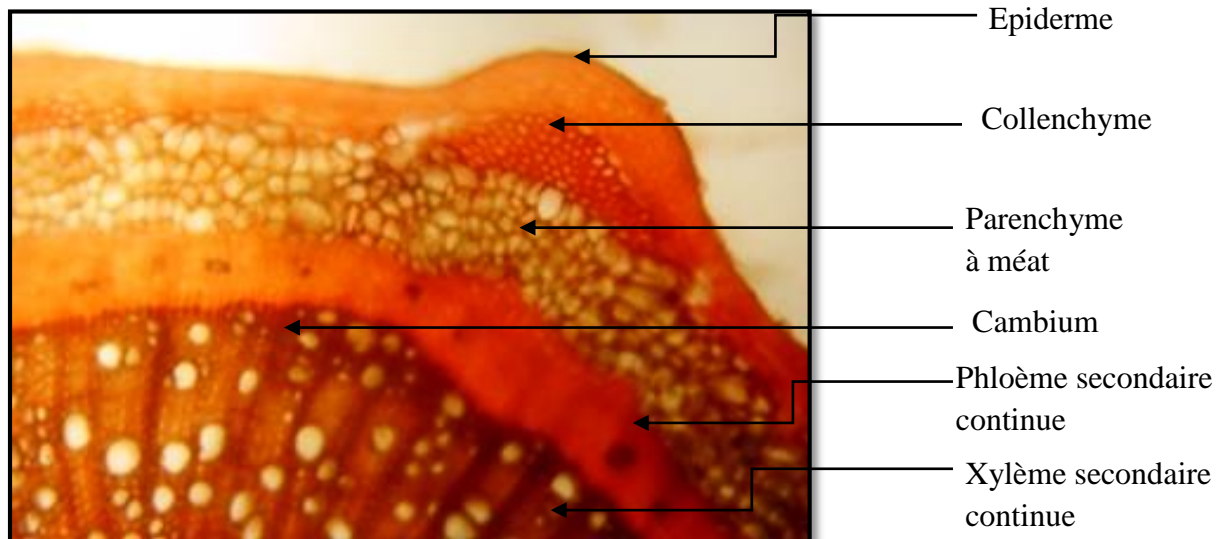
On a réalisé deux tests microbiologiques : dans le premier on a analysé un extrait des flavonoïdes (FFTPB) et un extrait des saponines (SFT) sur douze souches bactériennes et une souche fongique ; dans le deuxième on a testé les douze extraits obtenus précédemment sur sept souches bactériennes et la souche de *C. albicans*.

# Résultats et discussions

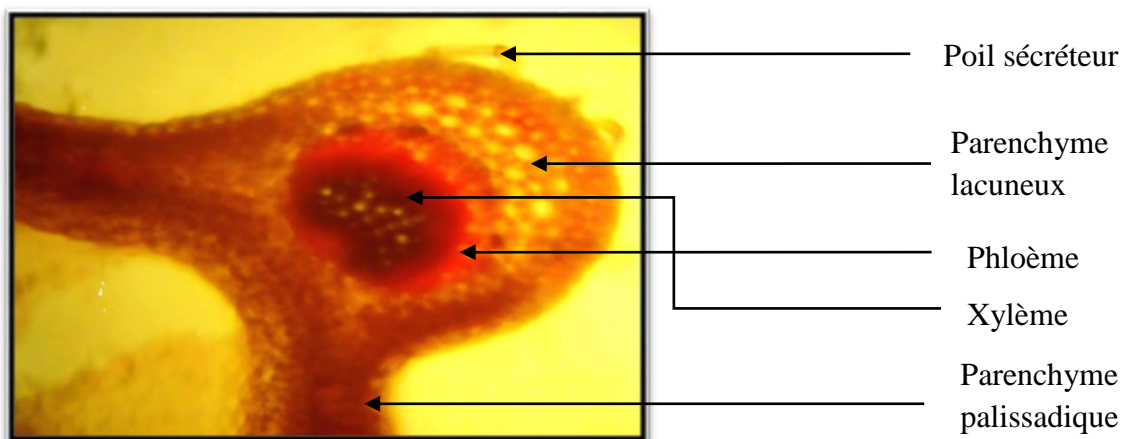
## 1. Etude histologique de l'espèce *Medicago sativa*.L

La double coloration a permis de localiser les différents tissus végétaux.

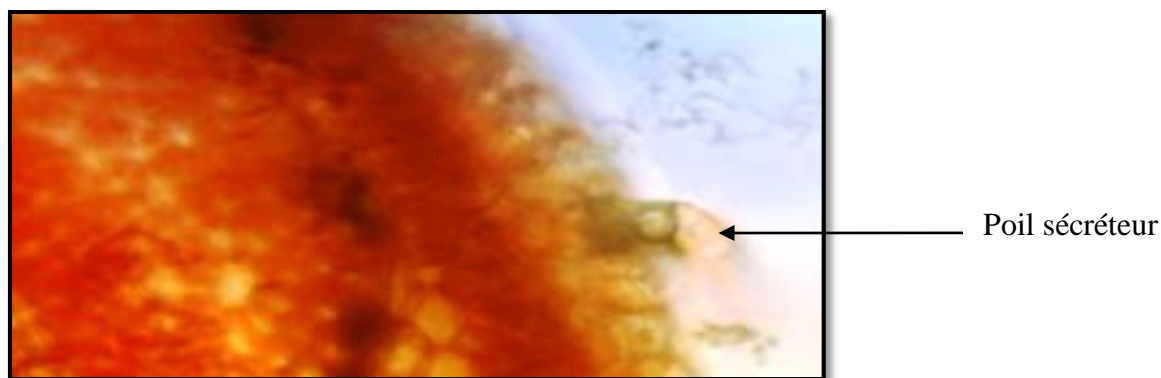
La disposition des différents tissus dans la tige est représentée dans la figure n° 23. L'observation microscopique des coupes colorées de la luzerne nous a permis l'identification des différents tissus de cette espèce. Les structures anatomiques retrouvées sont celles qui existent chez les autres espèces de la famille des Fabacées. Par contre on note la présence de quelques poils sécréteurs au niveau des tiges et des feuilles (figure n° 24, 25).



**Figure 23 :** Photo montrant une portion transversale de la tige de la luzerne cultivée Gx10.



**Figure 24 :** Photo montrant une coupe transversale de la feuille de la luzerne cultivée Gx10.



**Figure 25** : Photo montrant une coupe transversale de la tige de la luzerne cultivée Gx40.

## Discussion

On peut expliquer la présence des poils sécréteurs par l'existence d'une quantité négligeable des huiles essentielles.

### 2. Tests préliminaires de *Medicago sativa.L*

Les analyses phytochimiques des échantillons ont révélé la présence de toute la gamme des métabolites secondaires testés (flavonoïdes, Saponines, Anthocyanes et Leuco-Anthocyanes) (tableau n° 13).

**Tableau 13:** Tests préliminaires de *Medicago sativa.L*.

Composés	Flavonoïdes	Saponines	Anthocyanes	Leuco-anthocyane
Présence	+	+	+	+

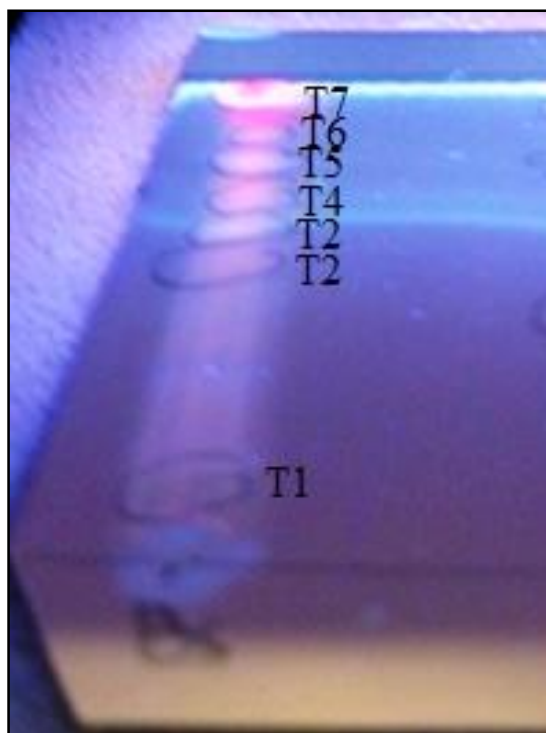
### 3. Analyse qualitative et quantitative des polyphénols et recherche d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Medicago sativa.L*.

#### 3.1. L'analyse de la composition chimique de l'extrait méthanolique par CCM

La figure n° 26 relative aux résultats de la C.C.M. observés à 365 nm à la lampe de Wood, indiquent la présence sept taches de différentes couleurs.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince sont illustrés dans le tableau n° 14

La révélation de ces taches nous a permis selon **Wagner et al., (1996)**, d'identifier des anthocyanes, des flavones et des flavonones. Qu'il est noté également que dans le même extrait un même composant peut se présenter avec des rapports frontaux différents. Les constituants majeurs de l'extrait méthanolique sont les flavones suivi par les anthocyanes.



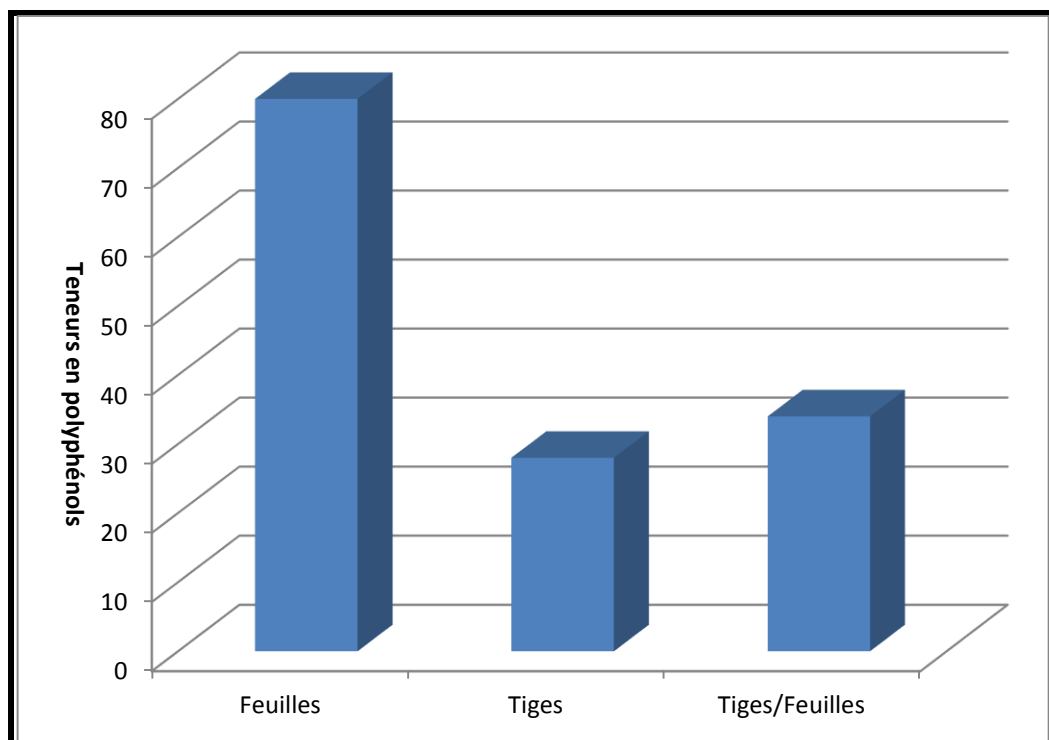
**Figure 26 :** Photo présentant la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de mélange tige et feuille de *Medicago sativa* observés à la lampe de Wood (365 nm).

**Tableau 14:** Flavonoïdes d'extrait méthanolique identifiés par CCM.

Taches observées	Couleurs sous UV (365 nm)	Rf	Types des flavonoïdes possibles
<b>T1</b>	Orange	0.104	Anthocyanes
<b>T2</b>	Rouge	0.477	Anthocyanes
<b>T3</b>	Violet	0.567	Flavones
<b>T4</b>	Violet	0.641	Flavones
<b>T5</b>	Orange	0.731	Anthocyanes
<b>T6</b>	Jaune verdâtre	0.791	Flavones-Flavonones
<b>T7</b>	Violet	0.895	Flavones

### 3. 2. Dosage des polyphénols

Le choix de ces substances basé principalement sur leurs propriétés antioxydantes très importantes. La lecture de la figure n° 27 montre que l'extrait méthanolique des feuilles de *Medicago sativa* .L est le plus riche en composé phénoliques (80 mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait méthanolique) (annexe n° 01).



**Figure 27 :** Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique des différents organes de *Medicago sativa*.L (mg d'acide gallique/g d'extrait).

### Discussion

Les résultats de dosage des phénols totaux montrent des différences significatives pour la quantité des polyphénols dans chaque partie de la plante.

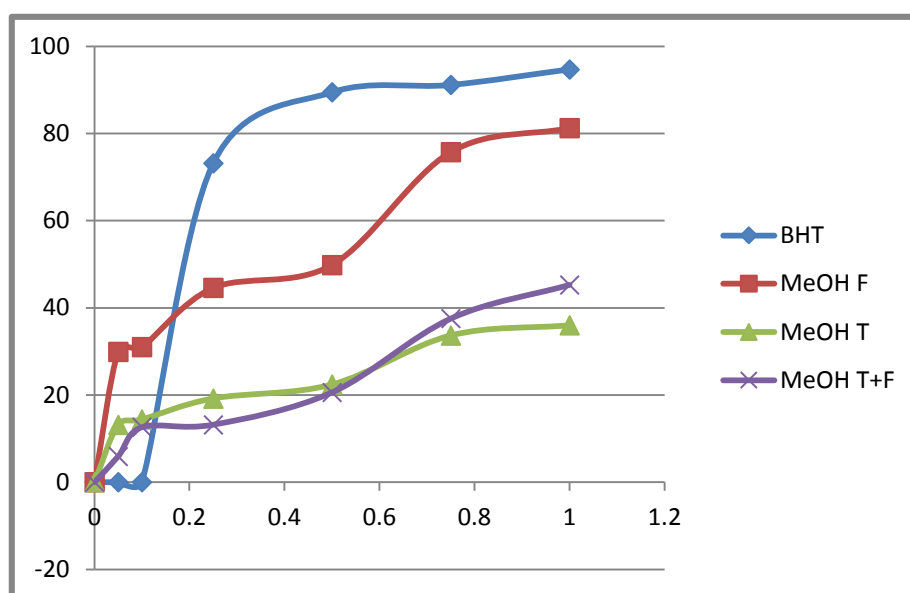
### 3. 3. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été mesuré par la méthode spectrophotométrique au DPPH. Il possède une coloration violette foncée qui va se transformer en jaune, ce qui diminue son absorbance, lorsqu'il est réduit par les composés antioxydants en lui donnant un proton ou un électron (**Cuendet et al., 1997**).

Les profils des activités antiradicalaires obtenus et en comparaison avec l'antioxydant synthétique (BHT) (annexe n° 02) pour l'ensemble de nos extraits réduisent la concentration du radical libre de DPPH (figure n° 28).

L'extrait méthanolique des feuilles présente la plus importante valeur d'inhibition avec 81,23 % (tableau n° 15) suivie par l'extrait méthanolique du mélange avec 45,56% (tableau n° 16) et l'extrait méthanolique des tiges révèle l'activité antioxydante la plus faible avec 36% (tableau n° 17).

On remarque que l'activité antioxydante augmente avec la concentration de nos extraits.



**Figure 28:** Activités antioxydantes des trois extraits + BHT.

**Tableau 15 :** Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des feuilles de *Medicago sativa.L.*

Concentrations	5%	10%	25%	50%	75%	100%
% Inhibition DPPH	29,925± 19,997	31,047± 20,346	44,575± 6,980	49,845± 2,142	75,734± 1,368	81,232± 1,531

**Tableau 16 :** Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des tiges de *Medicago sativa.L.*

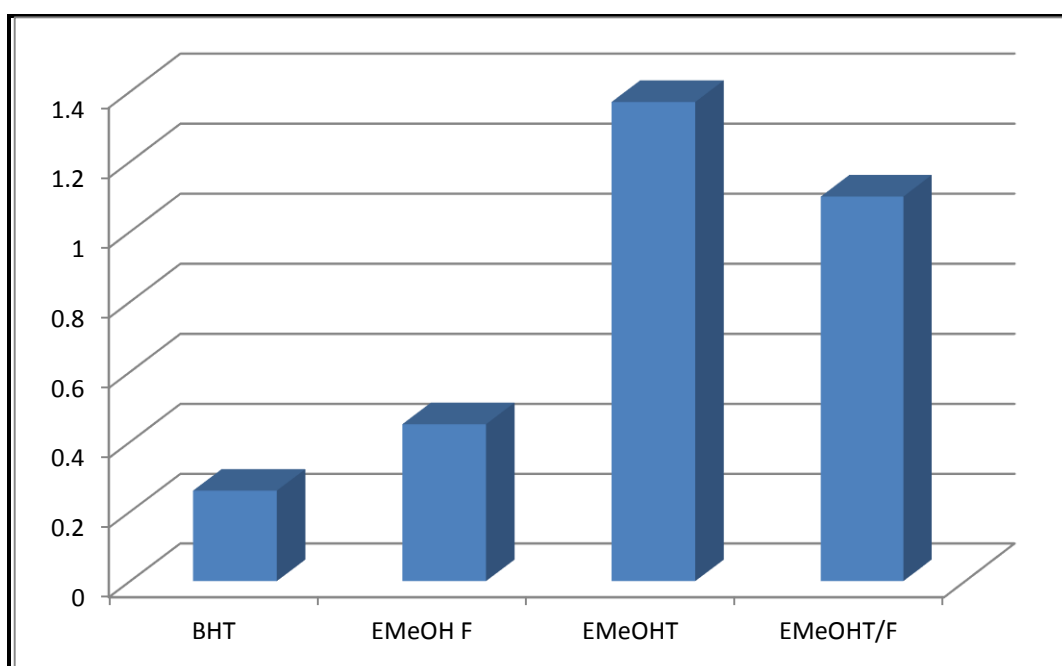
Concentrations	5%	10%	25%	50%	75%	100%
% Inhibition DPPH	13,196± 3,944	14,391± 3,414	19,226± 10,126	22,411± 1,717	33,674± 6,458	36,006± 6,933

**Tableau 17 :** Activité antioxydante relative de l'extrait méthanolique des feuilles/tiges de *Medicago sativa.L.*

Concentrations	5%	10%	25%	50%	75%	100%
% Inhibition DPPH	4,095± 0,482	13,993± 0,965	18,430± 0,482	18,430± 0,482	37,542± 2,896	45,563± 6,516

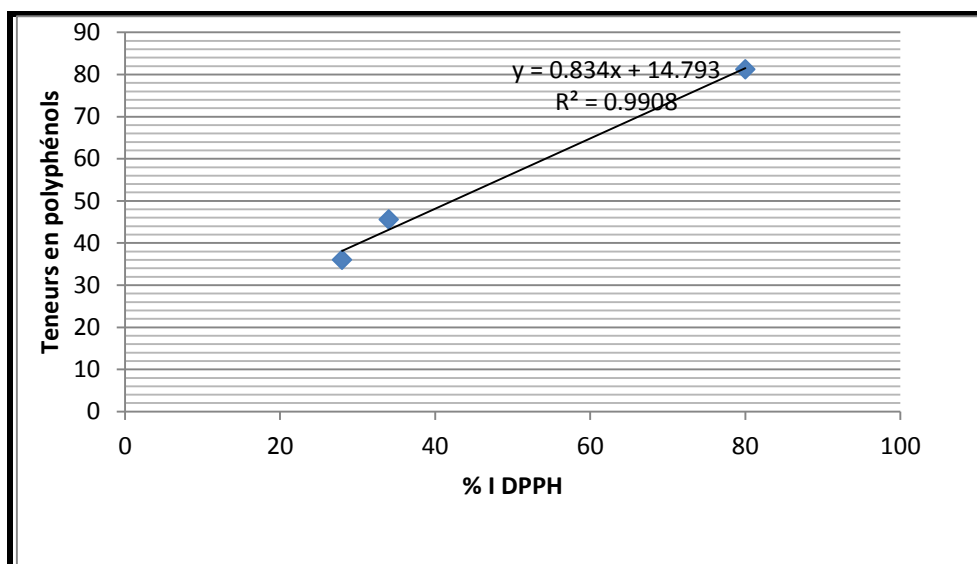
La détermination de la concentration efficace (CE50) a été effectuée par régression linéaire des inhibitions DPPH en fonction des concentrations des extraits étudiés (**Amezouar, 2013**). La plus faible CE50 est celle de BHT : 0.26 mg/ml qui est comparable à la CE50 de EMeOHF : 0.45mg/ml, EMeOHT présente la CE50 la plus élevée : 1.37 mg/ml (figure n° 29).

Ces résultats ont montré que la teneur des polyphénols totaux de nos extraits s'est corrélée significativement ( $R^2 = 0.990$ ) avec leurs activités anti-radicalaires (figure n° 30).



**Figure 29:** Concentration efficace (CE50) en mg/ml des extraits méthanolique de *Medicago sativa.L.*





**Figure 30** : Corrélation entre la teneur en phénols et son activité antioxydante.

## Discussion

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'effet antiradicalaire très important de l'extrait EMeOHF, cette activité pourrait être liée à sa richesse en polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes qui semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale (**Turkmen et al., 2007**).

Les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Beta et al., 2005; Mansouri et al., 2005; Samaniego Sánchez et al., 2007**), la configuration spatiale et le nombre de groupement OH des structures flavonoïdiques peuvent avoir une influence sur les différents mécanismes antioxydants (**Hein et al., 2002**).

L'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres ( $R\bullet$ ) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde ( $FLO\bullet$ ) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le  $FLO\bullet$  subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde (**Javanovic et al., 1994**).

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**). Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (**Kouri et al., 2007**). Quelque composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de DPPH égale à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (**Bondet et al., 1997**).

## Conclusion

Le test au DPPH est simple, très rapide, et indépendant de la polarité des échantillons (**Kartal et al., 2007**). Nous pouvons souligner que l'extrait méthanolique des feuilles de la luzerne cultivée a une teneur relativement élevée en phénols totaux. La concentration de ces constituants bioactifs dépend de leur emplacement dans la plante.

#### 4. Effet de la composition physicochimique du sol de prélèvement sur le rendement des principes actifs de la luzerne

##### 4. 1. Analyse du sol de prélèvement

Selon le tableau n° 18 on remarque que :

- Le pH est neutre à légèrement basique.
- le sol étudié est non salé.
- La teneur en matière organique est faible.
- La texture est argilo-limoneuse
- Le sol de prélèvement est calcaire.

**Tableau 18:** Caractéristiques physico-chimiques du sol.

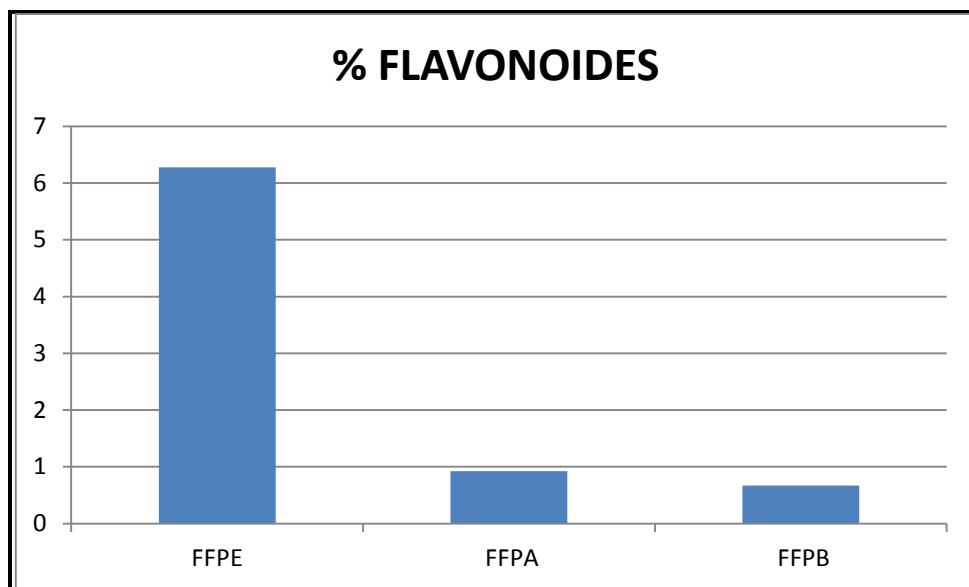
<b>pH eau</b>	7.61
<b>pH KCl</b>	6.92
<b>Salinité mS/cm à 25°C</b>	0.17
<b>Matière organique %</b>	1.8
<b>Calcaire %</b>	22.37
<b>Texture</b>	Argilo-limoneuse

##### 4. 2. Calcul du rendement

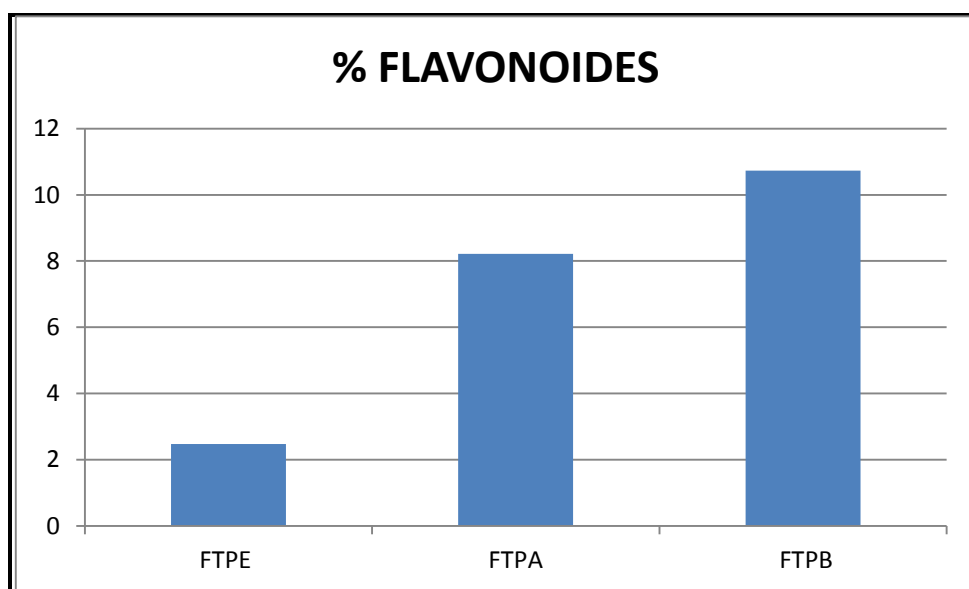
###### 4.2.1. Les flavonoïdes

Parmi les trois drogues étudiées (FF, FT et FFT), **FFT** présente le rendement le plus élevé (2.14 %) qui est plus important que celui des feuilles, alors que la **FFTPB** est la fraction la plus riche en flavonoïdes (1.073%).

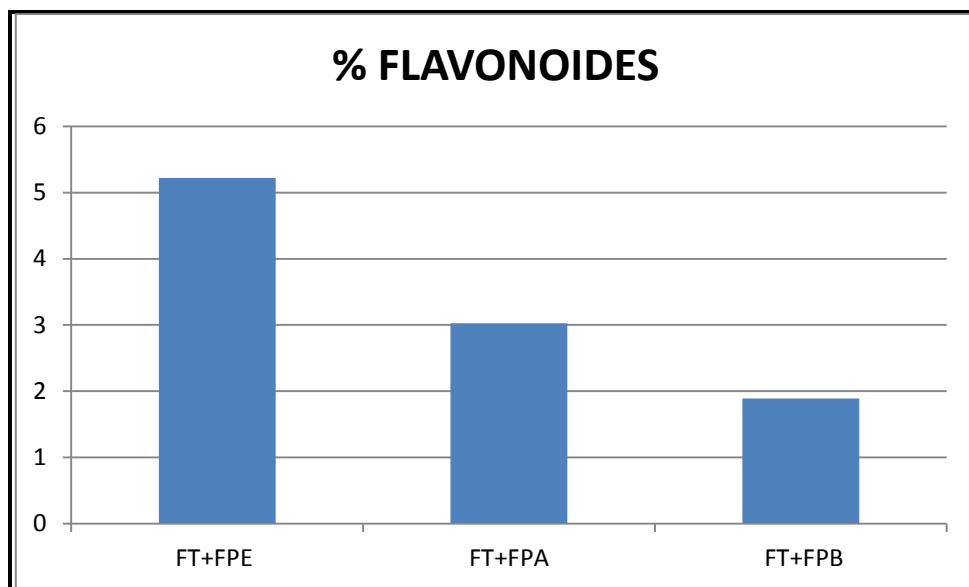
On a remarqué l'existence de différences significatives entre les taux des flavonoïdes de chaque phase d'extraction (figure n° 31, 32, 33).



**Figure 31 :** Teneur (richesse) des feuilles de *Medicago sativa.L* en flavonoïdes.



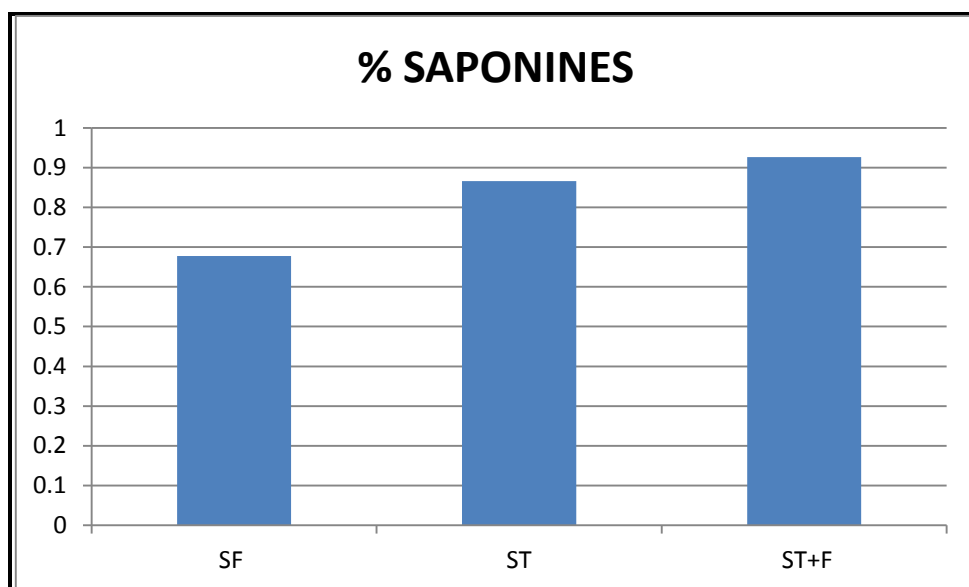
**Figure 32:** Teneur (richesse) des tiges de *Medicago sativa.L* en flavonoïdes.



**Figure 33:** Teneur (richesse) de mélange (feuilles/ tiges) de *Medicago sativa.L* en flavonoïdes.

#### 4.2.2. Les saponines

En ce qui concerne les saponines, l'extrait **SFT** est le plus riche en saponines (0,926%) par rapport aux autres produits obtenus, aussi cette valeur est inférieure à la somme de deux extraits **SF** et **ST** (1.544). On a remarqué aussi que les tiges sont plus riches en saponines que les feuilles (figure n° 34).



**Figure 34:** Données quantitatives des saponines de *Medicago sativa.L*.

## Discussion

On peut expliquer les différences entre les teneurs en flavonoïdes des différentes phases par la polarité des flavonoïdes vis-à-vis à leur solvant d'extraction (**Viollon et al., 1994; Kalemba et al., 2003 ; Suhr et al., 2003**). L'utilisation du mélange de la partie aérienne provoque une augmentation du taux des flavonoïdes notamment que les flavonoïdes sont plus abondants dans les tiges que les feuilles de la luzerne (**Rees, 1985**).

Le rendement en saponines est entre 0.6 à 1.6 % (**Fenwick, 1983**), on peut dire que nos résultats sont en accord avec les résultats de **Zanin (1998)** et **Bertin (2006)**. On a constaté que l'extraction des saponines à partir de chaque partie de la plante est plus efficace que l'extraction à partir du mélange, ainsi que le taux des saponines le plus élevé est dans les tiges.

## Conclusion

Pour un développement optimum de la luzerne doit être implantée dans un sol sain et calcaire, à pH variant de 6 à 7.5 (**Perrier, 1998; Zanin, 1998**). Donc notre sol du prélèvement est très favorable pour la culture de la luzerne, selon **Macheix et al ; (2005)** les conditions optimales de la nutrition stimulent l'augmentation de la teneur en composés phénoliques chez la luzerne tel que les flavonoïdes et les saponines.

## 5. Étude microbiologique et analyse qualitatives des flavonoïdes de *Medicago sativa.L* par chromatographie liquide à haute performance HPLC

### 1. Caractérisation des flavonoïdes de *Medicago sativa.L* par HPLC

Dans le but d'identifier qualitativement la composition chimique des flavonoïdes de *Medicago sativa.L* d'une façon précise, on a analysé l'échantillon le plus rentable en flavonoïdes (**FFTPB**) par la technique la plus efficace dans la détection et la quantification des composés phénoliques des extraits (**Belarbi et al., 2008**)

Les flavonoïdes contenus dans l'extrait analysé ont été identifiés probablement par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des étalons standards (**Merken & Beecher, 2000**).

Le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydée par des enzymes, telles que des phénoloxydases. La colonne utilisée pour séparer les composés phénoliques est exclusivement à phase inverse. Ce système est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation et la quantification simultanée des substances phénoliques (**Proestos et al., 2006; Athamena et al., 2010**).

Les résultats du chromatogramme d'HPLC de notre extrait sont représentés dans le tableau n°19.

**Tableau 19 :** Les flavonoïdes présents dans l'extrait flavonoïque (**FFTPB**) selon leurs temps de rétention.

Temps de rétention (min)	Flavonoïdes probables
2.204	Catéchine
2.362	Non identifié
3.334	Non identifié
3.443	Rutine
4.086	Non identifié
5.046	Non identifié
5.864	Non identifié
6.618	Non identifié
7.669	Non identifié
11.759	Non identifié
12.782	Non identifié

## Discussion

Les résultats de l'analyse par HPLC de l'extrait testé et en comparaison avec le chromatogramme des flavonoïdes standards ainsi que les principaux pics observés, permet de les différencier grâce à leur temps de rétention: la catéchine (2,2 min) et la rutine (3.4) sont les composés les plus abondants alors que de la quercétine (1.7min) est absent dans notre extrait (annexe n° 03). Les études réalisées sur les flavonoïdes de *Medicago sativa.L* sont très rares on peut citer les travaux de **Malinow (1981)** ; **Gray (1997)** et **Hwang (2001)** qui ont révélé la présence de la quercétine. Ceci démontre clairement que la quantité et la qualité des composés phénoliques dépend de plusieurs facteurs, parmi ces facteurs l'état des terroirs cultivés (**Pérez-Magariño & Gonzalez-San, 2006** ; **Le Moigne et al., 2008** ; **Ojeil et al., 2010**).

La présence de la catéchine dans l'extrait flavonoïque de *Medicago sativa.L* peut expliquer l'activité antibactérienne très importante de cet extrait (**Yun et al., 2004**).

## 5.2. Etude de l'effet antimicrobien des extraits

La solution mère (SM) est préparée à partir d'un milligramme d'extrait et un millilitre de DMSO. Dans le premier essai on a effectué plusieurs dilutions de l'extrait **FFTPB** avec le DMSO (1/2, 1/4, 1/8, 1/16), pour les saponines on a utilisé seulement la solution mère de **SFT**.

Les extraits ont été testés sur une gamme de douze souches bactériennes et une souche fongique. Selon le tableau n° 20, des zones d'inhibition remarquables que nous avons obtenu à partir de l'extrait **FFTPB** sur *K. oxytoca* (18.7mm) suivi par *S. aureus* ATCC (16.5mm) et légèrement active sur *K. pneumoniae* (11.5mm).

Pour l'extrait **SFT**, la zone d'inhibition la plus élevée est observée avec le germe *K. oxytoca* (10.9mm). La souche fongique *C. albicans* est sensible à **FFTPB** (14.2mm) et moins sensible à **SFT** (10.5mm). La plupart des autres souches sont résistantes à nos extraits. Ils existent quelques dilutions qui sont plus actives que la solution mère, mais dans la plus part des souches, elles sont inactives. On a remarqué que les extraits des flavonoïdes présentent une activité plus importante que l'extrait des saponines.

**Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibitions du premier essai.**

Souches	Diamètres des zones d'inhibitions en mm					SFT (SM)
	(SM)	1/2	1/4	1/8	1/16	
<i>E. coli</i> ATCC 23	9.5	6	6	6	6	6.5
<i>S. aureus</i> ATCC 12	16.5	12.2	8.5	11.5	11.1	9
<i>A. baumannii</i>	9.6	11.5	9.5	6	6	7
<i>E. cloacae</i> 19	10.9	8.3	7.9	6	6	7.5
<i>E. coli</i>	7	8.1	7.2	10.2	6	7.2
<i>K. oxytoca</i>	18.7	6	6	6	6	10.9
<i>K. pneumoniae</i>	11.5	6	6	6	6	9.1
<i>P. mirabilis</i>	7.2	6	6	6	6	6.7
<i>Pseudomonas</i>	7.9	8.9	8.1	7.5	6	6
<i>Salmonella</i>	9.5	9.6	7.5	7.2	6.2	6.7
<i>S. marcescens</i>	7.7	9.6	9.1	6	6	6
<i>Shigella</i>	10.2	10.5	9.6	6	6	7.2
<i>C. albican</i>	14.2	9.1	10.1	8.2	7.7	10.5

Après le choix des souches selon les zones d'inhibitions les plus importantes, on a réalisé un deuxième test sur les différents extraits étudiés (on a utilisé seulement la solution mère à cause des zones d'inhibition négligeables des dilutions sur la plupart des souches). Notre choix s'est limité à trois souches bactériennes (On a rajouté quelques espèces du genre *Staphylococcus* à cause des diamètres des zones d'inhibition remarquables sur cette souche).

Dans le deuxième test, l'extrait **FFTPB** est le plus active pour toutes les souches à l'exception de *S. aureus* ATCC, la plus importante zone d'inhibition est celle de *S. warneri* (42.3mm), les extraits des tiges sont les moins actives.

**FTPE** possède les zones d'inhibitions les moins faibles. Parmi les souches étudiées, *S. aureus* ATCC est la souche la plus résistante (tableau n° 21).selon les figures n° (35, 36, 37, 38, 39) on remarque que la fraction butanolique possède les meilleures zones d'inhibition sur la plupart des souches testées.

L'extrait **ST** possède la zone d'inhibition la plus importante (20.9 mm) sur *S. aureus* (tableau n° 22).

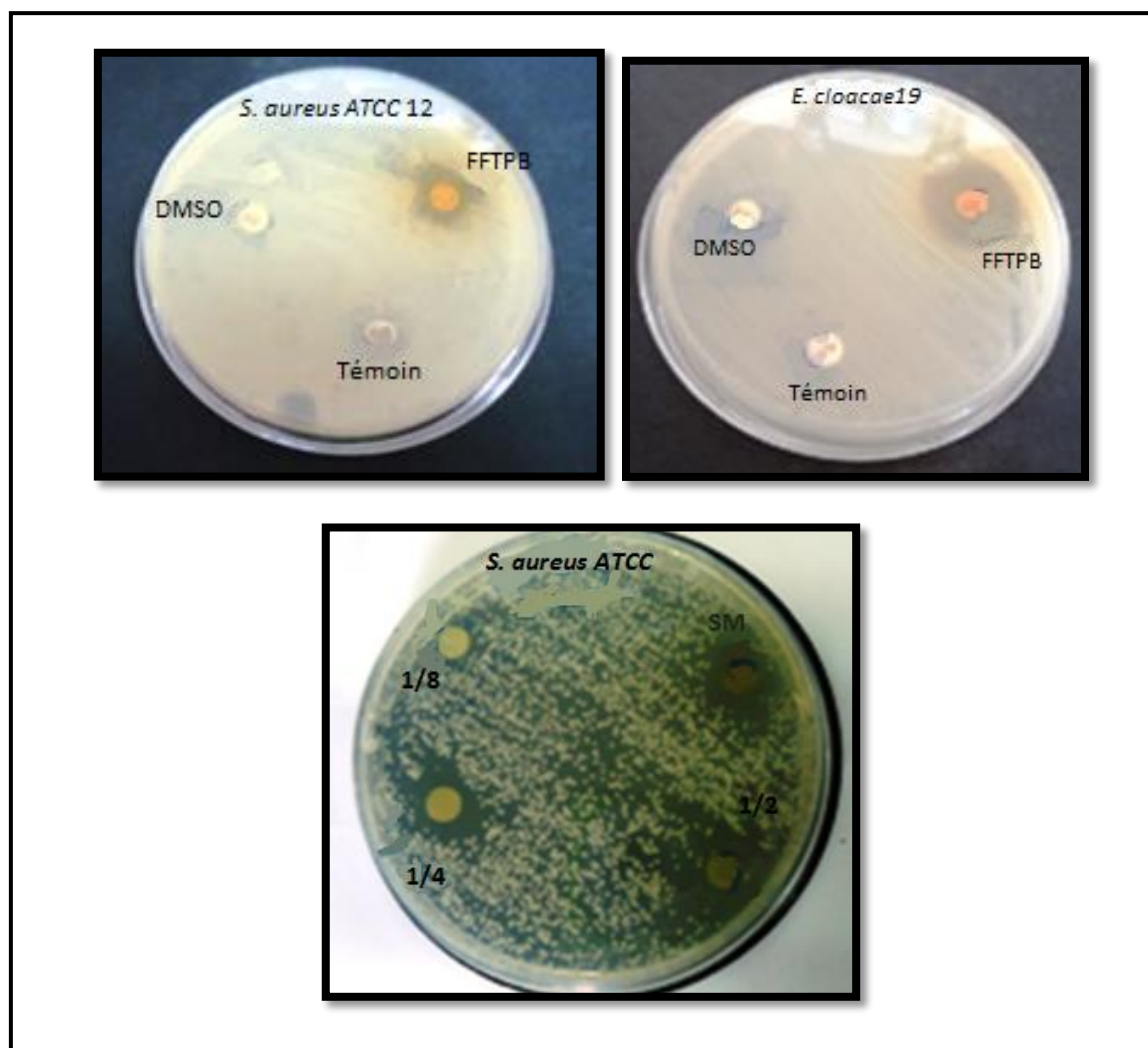
La souche fongique l'extrait **SF** présente la zone d'inhibition la plus élevé (9mm), *S. aureus* ATCC et *K. pneumoniae* sont résistantes pour tous les extraits.

Les solutions des saponines sont moins actives que les solutions des flavonoïdes. On a effectué un antibiogramme dont le but est de comparer l'effet des antibiotiques de références par l'effet de nos extraits sur la souche *S. aureus*. Vancomycine (19mm) présente la zone d'inhibition la plus importante, suivie par Teicoplanine (15.1), les autres antibiotiques sont inactifs sur *s.aureus* (annexe n° 04).

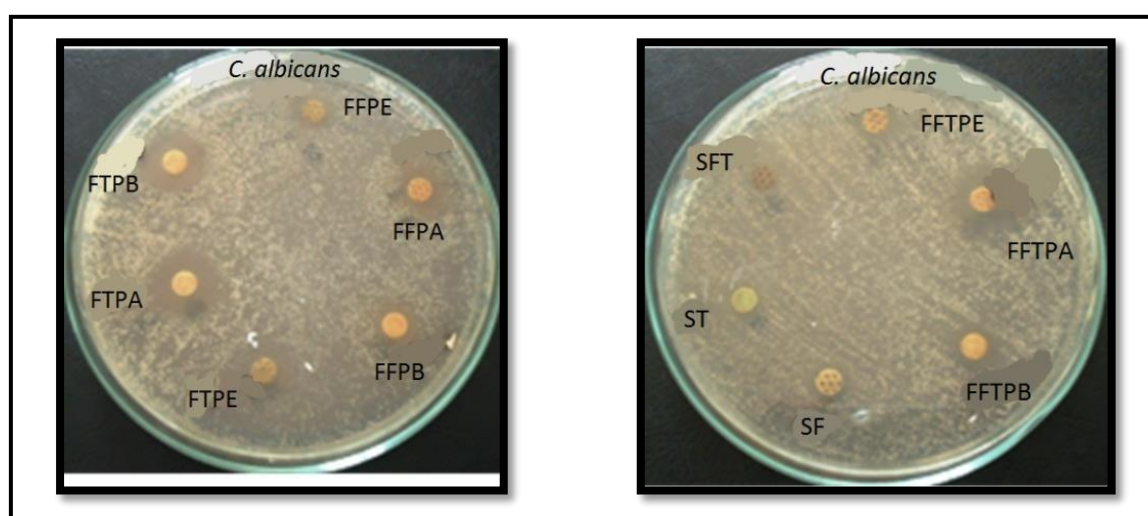
**Tableau 21 :** Diamètres des zones d'inhibitions des flavonoïdes du deuxième essai.

Souches	Extraits								
	FFPE	FFPA	FFPB	FTPE	FTPA	FTPB	FFTPE	FFTPA	FFTPB
<i>S. aureus</i> <i>ATCC 12</i>	22.5	6	16.5	6	14.1	6	6	6	6
<i>K. oxytoca</i>	13.4	12.1	12.5	6	6	6	10.5	23.9	33.1
<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	6	9.8	14.1	6	6	6	11.5	27.7	35.8
<i>S. aureus 240</i>	27.5	14.1	18.5	13.1	16.2	18.5	33.6	32.5	35.9
<i>S. hominis 88</i>	13.5	13.1	12.5	6	6	9.8	26.7	28.2	32.5
<i>S.</i> <i>saprophyticus</i> <b>66</b>	11.8	10.2	13.1	6	16.4	12.5	18.3	22.5	30.7
<i>S. warneri</i> <i>176</i>	6	6	6	6	6	8.1	21.5	34.7	42.3
<i>C. albicans</i>	9	10.3	10.1	9.4	16	15.3	10.7	15.5	16.2

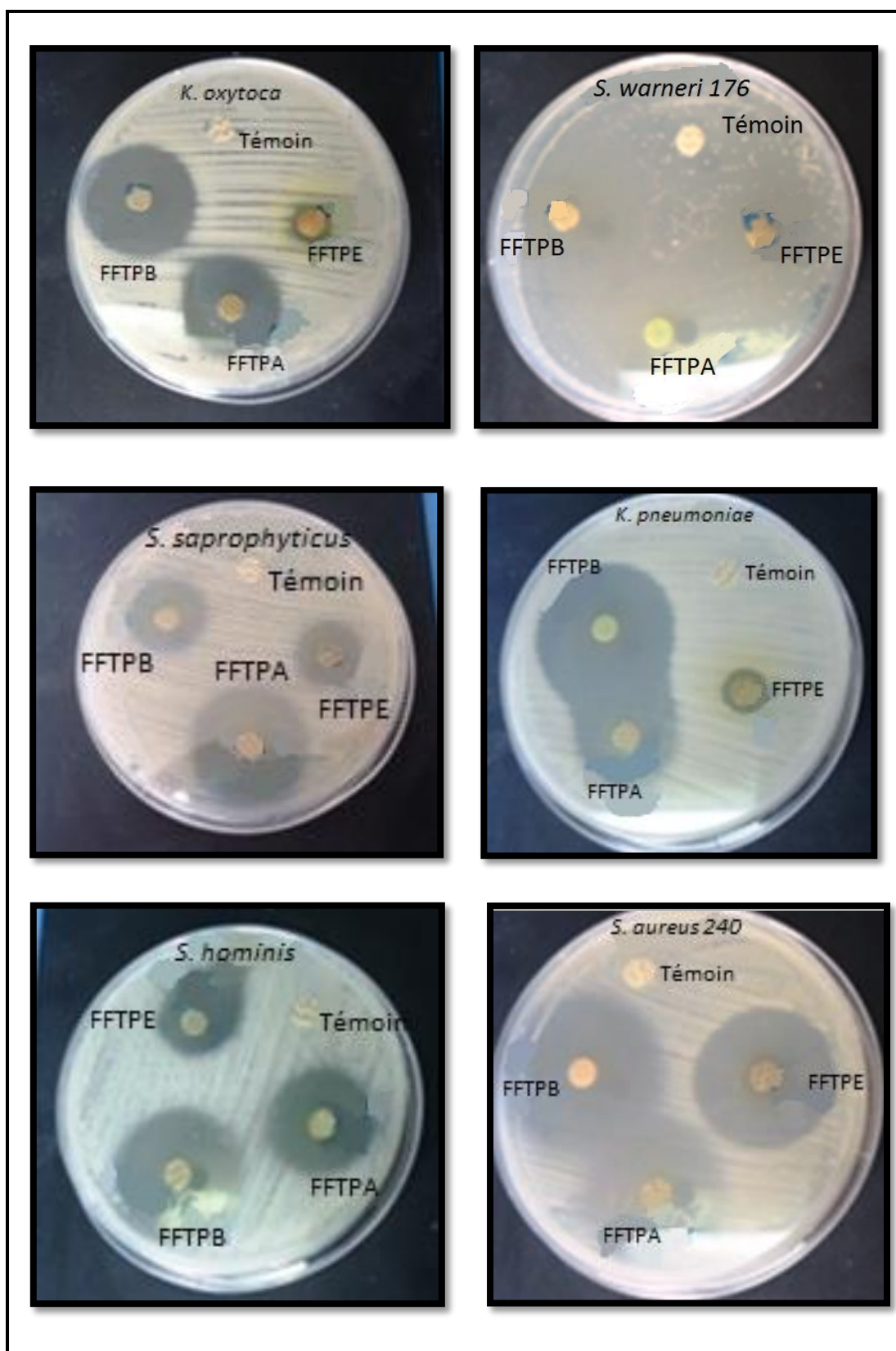




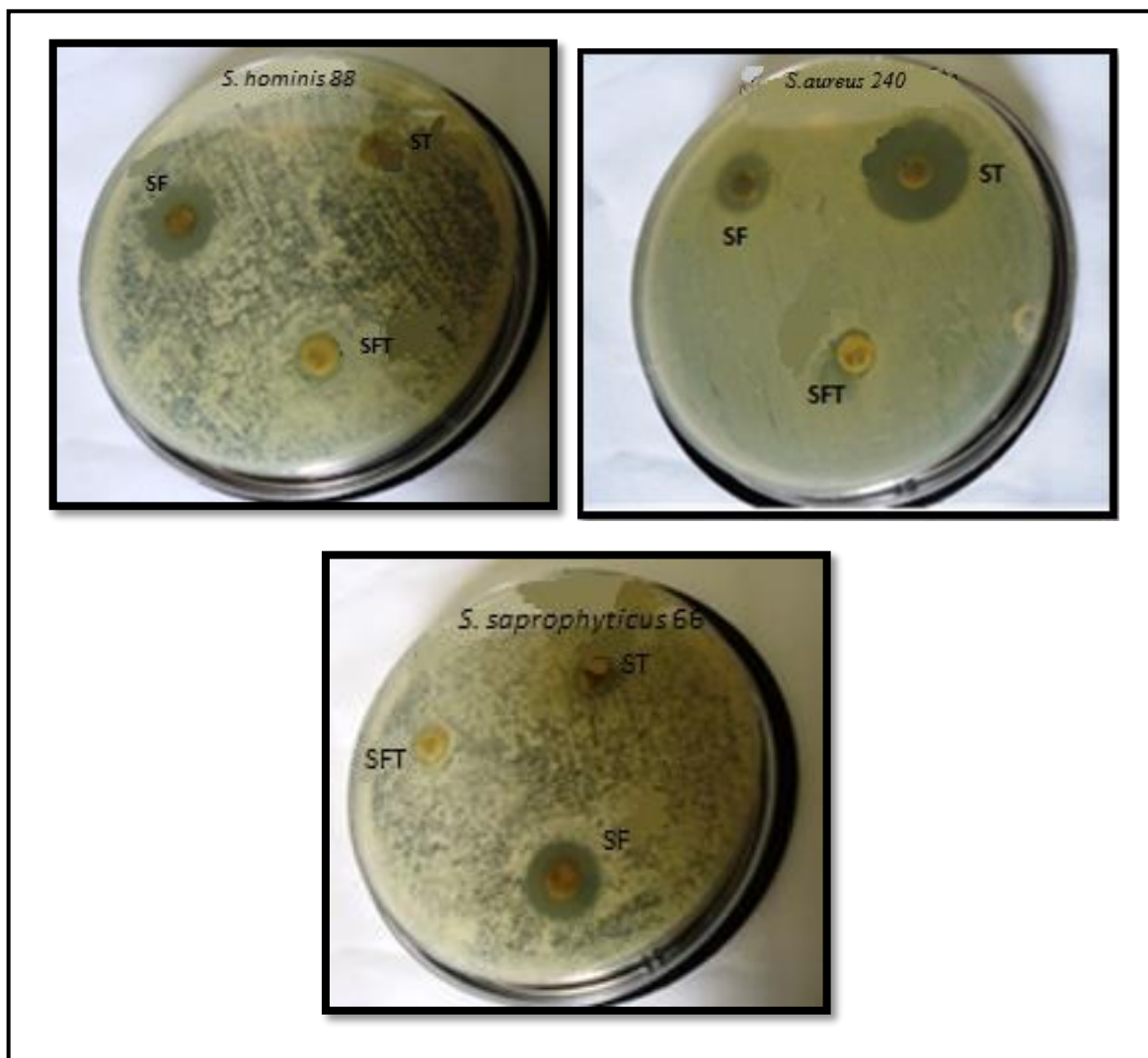
**Figure 35 :** Photos montrant l'activité de l'extrait flavonoïque **FFTPB** de *Medicago sativa*. L sur les différentes souches du premier essai.



**Figure 36 :** Photos montrant l'activité des différents extraits de *Medicago sativa*. L sur *C.albicans*.



**Figure 37 :** Photos montrant l'activité des extraits flavonoïques de *Medicago sativa*.L sur les différentes souches du deuxième essai.



**Figure 38 :** Photos montrant l'activité saponines de *Medicago sativa.L* sur les différentes souches testées.



**Figure 39 :** Photo montrant l'antibiogramme de *S. aureus* 240.

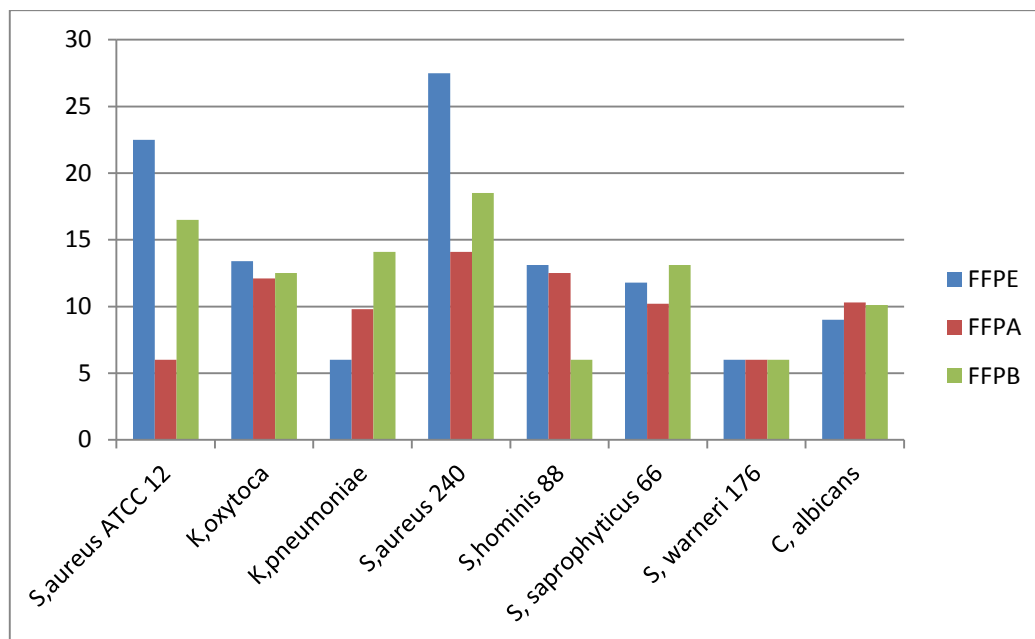
**Tableau 22 :** Diamètres des zones d'inhibitions des saponines du deuxième essai.

Souches	Extraits		
	SF	S T	SFT
<i>S. aureus ATCC 12</i>	6	6	6
<i>K. oxytoca</i>	6	6	10.6
<i>K. pneumoniae</i>	6	6	6
<i>S. aureus 240</i>	13.4	20.9	6
<i>S. hominis 88</i>	17.5	6	6
<i>S. saprophyticus 66</i>	15.5	6	6
<i>S. warneri 176</i>	10.5	9.5	6
<i>C. albicans</i>	9	8	7.1

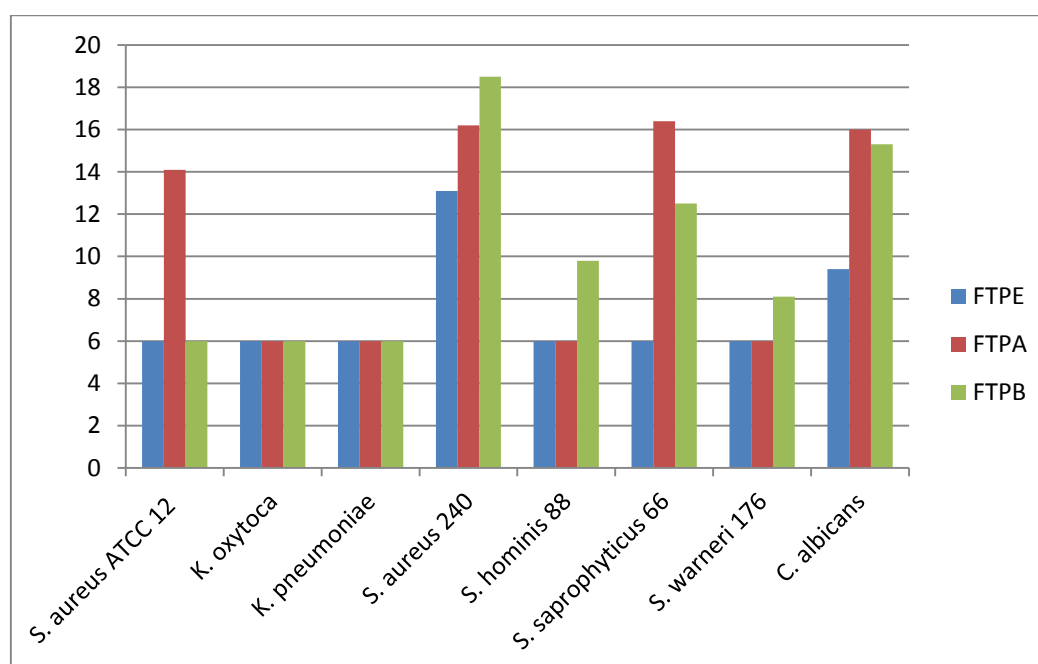
## Discussion

En premier essai de l'activité microbiologique on a constaté que la majorité des souches testées sont résistantes à nos extraits. Ils existent quelques dilutions plus actives que la solution mère, cela peut être lié à la diffusion de la DMSO dans le milieu de culture.

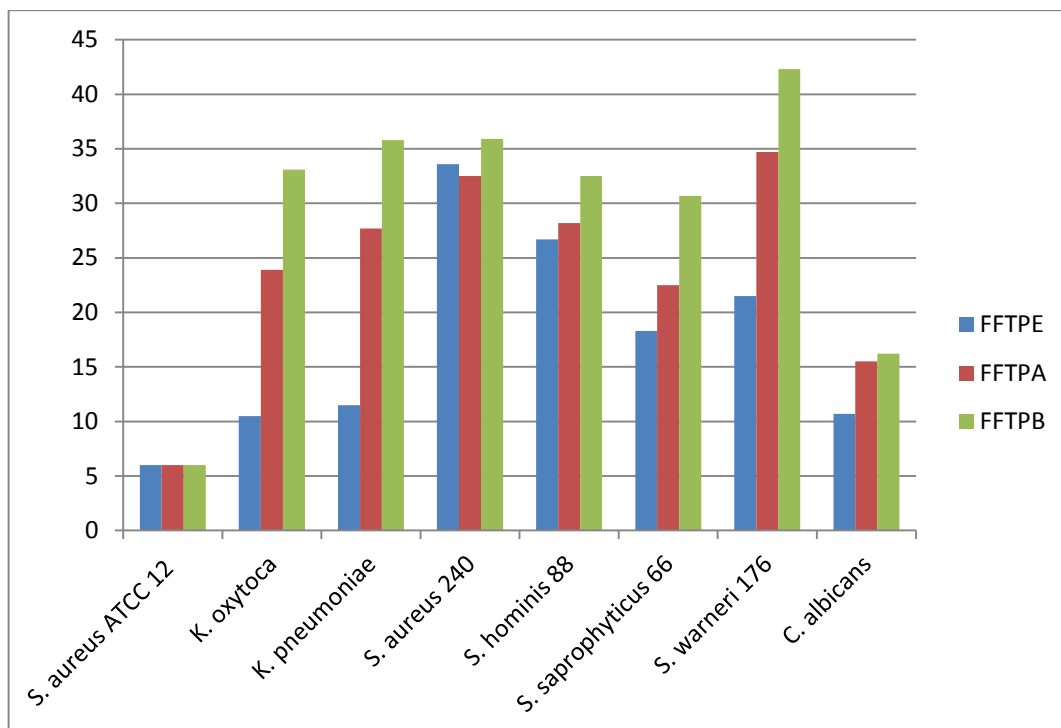
Dans le deuxième essai et en comparaison avec l'étude de **Aumento et al., (1988)** ; **Treki, al., (2009)** et **Athamena et al., (2010)**, on peut dire que d'une manière générale nos extraits flavonoïques présentent une activité antibactérienne et antifongique très importante (**Havsteen et al., 2002** ; **Sosa et al., 2006**). Cette activité varie selon les souches testées et selon les solvants d'extraction (**Rees et al., 1985** ; **Senhaji et al., 2005**) (figures n° 40, 41, 42). Les bactéries Gram (+) sont plus sensibles que les bactéries Gram (-) (**Koné et al., 2004**; **Hayouni et al., 2007**; **Shan et al., 2007** ; **Turkmen et al., 2007**; **Falleh et al., 2008**), cette sensibilité peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. La présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da.



**Figure 40 :** Spectre d'activité des flavonoïdes des feuilles de *Medicago sativa. L* sur les souches étudiées.



**Figure 41 :** Spectre d'activité des flavonoïdes des tiges de *Medicago sativa. L* sur les souches étudiées.



**Figure 42 :** Spectre d'activité des flavonoïdes du mélange feuilles/tiges de *Medicago sativa. L* sur les souches étudiées.

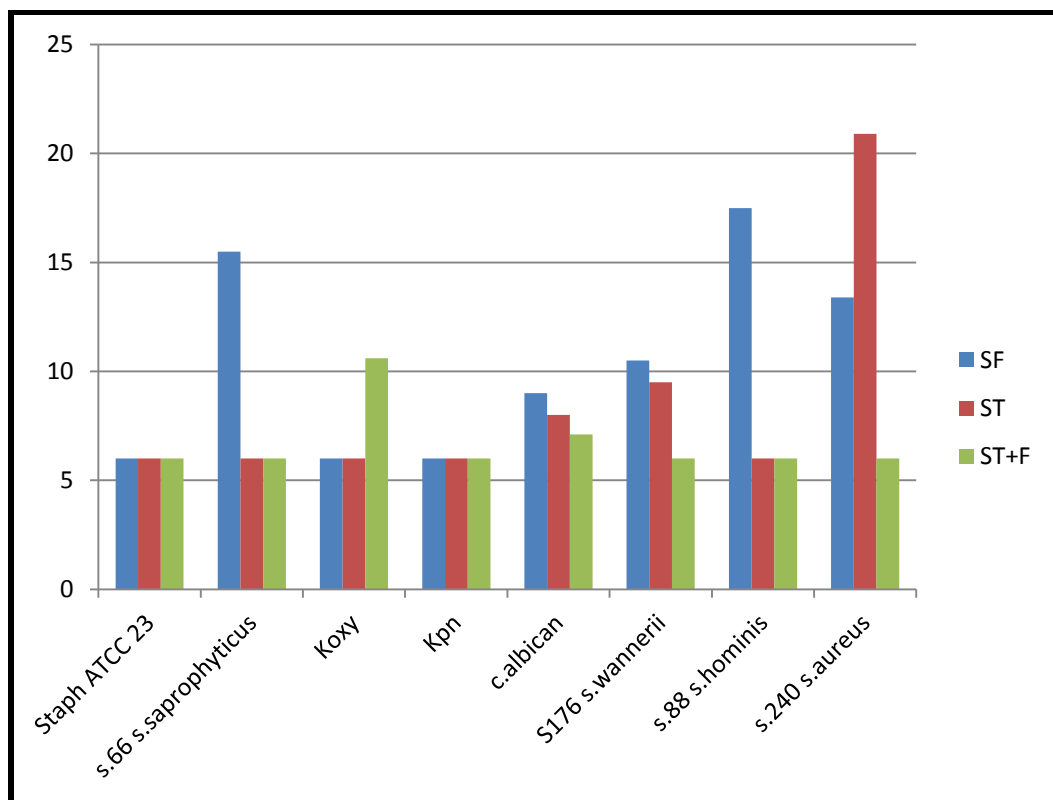
Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl (Georgantelis et al., 2007).

La plus importante zone d'inhibition est obtenue par l'extrait flavonoïque de la fraction butanolique du mélange ; *S. aureus* ATCC est la souche la plus résistante à nos extraits malgré qu'elle soit connue comme une souche sensible (Biyiti et al., 2004), la résistance de la souche peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni et al., 2007 ; Cushnie, 2011 ; Ghedadba, 2014). Il peut aussi lier à la méthode de diffusion en milieu gélosés (Natarajan et al., 2005; Fazeli et al., 2007).

Les flavonoïdes isolés des tiges sont les moins actifs, on peut démontrer que chaque extrait flavonoïque agit inégalement sur les bactéries, selon leur localisation dans la plante et selon leur polarité dans le solvant d'extraction (Wagner et al., 1993 ; Thangara et al., 2000 ; Basli et al., 2012; Koffi et al., 2014), ceci peut-être lié à la forte teneur des molécules glycosylées et à la forte teneur en composé flavonoïque (Bijondi, 1993; Jiménez, 1999).

Ces résultats désignent l'étude de Treki et al., (2009). Cowan (1999) et Bolou (2011) ont prouvé aussi que les phyto-molécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité, ceci confirme les résultats obtenus par Hammoudi (2012).

Les saponines de *Medicago sativa. L* sont moins actives que les flavonoïdes. Parmi les extraits des saponines, les saponines isolées des tiges sont les plus actives sur les bactéries (figure n° 43), l'inefficacité de l'extrait de saponines isolés du mélange est probablement due aux différences de leurs compositions chimiques.



**Figure 43:** Spectre d'activité des saponines de *Medicago sativa. L* sur les souches étudiées.

L'antibiogramme révèle l'activité très importante de nos extraits sur *S. aureus*.

# Conclusion générale



## Conclusion générale

Au terme de notre travail expérimental, nous pouvons dire que la luzerne cultivée ou *Medicago sativa.L* est une plante médicinale par excellence.

L'étude phytochimique de cette plante démontre sa richesse en plusieurs principes actifs tels que: les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanes et les leuco-anthocyanes connus pour leurs effets thérapeutiques.

Parmi les polyphénols identifiés par CCM : des anthocyanes, des flavones et des flavonones.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits méthanoliques de *Medicago sativa. L* a été évalué par l'étude de leur pouvoir à piéger le radical libre du DPPH. Les résultats indiquent que l'extrait méthanolique des feuilles de *Medicago sativa. L* présente la plus grande activité antioxydante. Ceci nous a permis de déduire que l'activité antioxydante des différents extraits de *Medicago sativa. L* est en corrélation avec la quantité des polyphénols présents dans la plante.

On peut constater aussi que les anthocyanes, les flavones et les flavonones étaient les molécules les plus intéressantes avec des résultats très importants pour l'activité antioxydante.

L'identification qualitative des flavonoïdes de *Medicago sativa.L* par HPLC et en comparaison avec les autres études réalisées sur la composition chimique des flavonoïdes de la luzerne cultivée, montre que dans la même espèce on peut trouver des différences au niveau de la composition chimique de leurs métabolites secondaires, ces variations peuvent être liées au facteur d'environnement ou à la méthode d'extraction.

A travers ce travail on a déterminé l'importance de l'activité microbiologique des différents principes actifs isolés de l'espèce *Medicago sativa.L* sur seize germes bactériens pathogènes des bacilles Gram<sup>-</sup> et des cocci Gram<sup>+</sup>. Selon les résultats de l'étude microbiologique et comparativement aux autres études réalisée sur le même sujet, on peut dire que l'extrait butanolique des flavonoïdes isolés de la partie aérienne de la luzerne cultivée ou *Medicago sativa.L* présente une meilleure activité antibactérienne et antifongique donc il est préférable de l'utiliser comme un antibiotique aux infections sévères telles que les septicémies et les endocardites ou comme un antifongique des infections causées par *C. albicans*.

Alors que l'activité microbiologique des saponines de la luzerne est moyennement importante surtout chez les saponines isolés à partir des tiges malgré qu'elles présentent l'activité la plus importante sur *S. aureus* et elle est responsable d'intoxications alimentaires, certaines infections localisées suppurées et aussi dans certains cas extrêmes de septicémies physiques.

Ces résultats sont très prometteurs ce qui apporte une validation scientifique de l'usage traditionnel de cette espèce.

## Perspectives

Pour le futur nous envisageons de mieux identifier quantitativement et qualitativement les différents composés des flavonoïdes et des saponines de la luzerne cultivée par des techniques plus sophistiquées ( RMN) et de poursuivre cette étude sur un grand nombre d'échantillons au niveau de plusieurs zones pour déterminer précisément l'influence de l'environnement sur le rendement et la qualité des flavonoïdes et des saponines.

L'étude d'autres principes actifs de cette plante tels que les vitamines, les anthocyanes ainsi que l'activité microbienne sur d'autres souches sont également à envisager.

# Références bibliographiques

## Bibliographies

- Afanas R., Eva I B., Ostrakhovitch E A., Mikhal R., Chik E V., Ibragimova G A., Korkina L G. 2001.** Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*. 61(6) : 677-684.
- Akroum S. 2011.** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse du garde de docteur de L'université Mentouri de Constantine. 71p.
- Alain P., Banga B., N'guessan A., Yapo F., N'guessan J D & Djaman A J. 2011.** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8(1): 1 – 11.
- Alexander J., Atli Auðunsson G., Benford D., Cockburn A., Dogliotti J, Di Domenico A. 2009.** Saponins in *Madhuca longifolia L.* as undesirable substances in animal Feed. *The EFSA Journal*. 979:1-36.
- Aliaga C., Lissi A E. 2004.** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.* 82: 1668-1673.
- Alluis B. 2000.** Modifications chimiques de flavonoides, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydants. Université Claude Bernard Lyon. 22p.
- Amezouar F., Badri W., Hsaine M., Bourhim N., Fougrach H. 2013.** Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea L.* *Pathologie Biologie*. 61 : 254–258.
- Anne P. 1945.** Sur le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann: Agron.* 2: 161-172.
- Applebaum, Marco S., Birk., Y. 1969.** Saponins as Possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 17: 618–622.
- Athamena S., Chalghem I., Kassah-laouar A., Laroui S., Khebri S. 2010.** Activité Anti-oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese science journal*. 11 : 78.
- Aumento R., Ayuso D., Gonzalez M., Garcia J., Jimenz M., Toro Sainz M. 1988.** Les flavonoïdes isolés d'*Erica Andevalensis cabezuderiberi*, Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 2 : 113-118.
- Bahorun T. 1997.** Substances naturelles actives : La flore mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, mauritius. 83-85 p.
- Baize D. 2000.** Guide des analyses en pédologie. Editions Quae. 87 p.
- Basile A., Giordano S., Lopez Saez JA., Cobianchi BC. 1999.** Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem.* 2 (8): 1419-82.
- Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N. 2012.** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum*. *Phytothérapie*. 10: 2- 9.
- Batawita K., Kokon K., Akpagona K., Koumaglo K., Bouchet P. 2002.** Fongicide

- activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O.Hoffm. (Asteraceae)). *Acta Bot. Gal.* 149 (1): 41-8.
- Belarbi-Ouarkoub S., Allaf K., et Hamdi A. 2008.** Séchage de l'oignon par DIC. *Revue des Energies Renouvelables*.8: 97 – 104.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D. 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*. 82: 390-393.
- Bertin E. 2002.** Les extraits foliaires de la luzerne EFL. L'UFR médecine de l'université de Remis. 9-23p.
- Besnard A. 1998.** la Luzerne. ARVALIS Paris. 02p
- Bijondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G.1993.** Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*. 8: 331- 377.
- Bolou G., Attioua B., N'Guessan A., Coulibaly A., N'Nuessan J., Daman A. 2011.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 80: 772 – 790.
- Bondet V., Williams W.B., Berset C. 1997.** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30 : 609-615.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova Saykova E. 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).*Revue de génie industriel*. 7 : 35-45.
- Bougandoura N., Bendimerad N.2012.** Effet antifongique des extraits aqueux et methanolique de *Satureja calamintha ssp.(nepeta)* briq. *Revue des BioRessources*. 2 : 1.
- Boullard B. 2002.** Plantes et champignons. Ed. Estem. 10p.
- Boumendjel A., Mariotte A.-M., Bresson-Rival D., Perrier E. 2003.** Hesperitin Esters: Highly Stable Flavanones With Both Free Radical Scavenging and Anti-Elastase Activities.*Pharmaceutical Biology*. 41 (7): 546-549.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots.*C. R. Biologies*. 331: 48–55.
- Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A et Satrani B. 2010.** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata (vahl)* masters du maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 79 :141 – 154.
- Boutaghane N. 2013.** Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae), Thèse du garde de docteur de L'université de Constantine 1.11p.
- Braden A., Hart NK et Lamberton JA. 1967.** Oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aus J Agric Res*. 18:355-348.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C.1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. U. Technol*. 28: 25-30.
- Brière T, 2011.** Valorisation des ressources naturelles, Creative Commons. 35p.
- Brooker C. 2007.** Le corps humain étude, structure et fonction. Ed. De Boeck Université. 2-4p.
- Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris 4<sup>ème</sup> Edition Lavoisier.100-106p.
- Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G et Swinnen J. V. 2005.** Induction of cancer

- cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry*. **280** (7) : 5636-5645.
- Bssaibis F., Gmira N., Meziane M. 2009.** Activité Antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.). W. Greuter. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. 3: 44-45.
- Burda S., Oleszek W. 2001.** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*. 49 (6) : 2774-2779.
- Biyiti L F., Meko'o DJ L., Tamze v., Amvam Zollo P H. 2004.** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 13 :11-20.
- Cao G., Sofic E., Prior R L. 1997.** Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22 (5): 749-760.
- Chaabena A., Abdelguerfi A. 2001.** Situation de la luzerne pérenne dans le Sahara et comportement de quelques populations locales et variété introduites dans le sud-est du Sahara algérien. INAS. 58p.
- Chebil L. 2006.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse du grade de docteur de L'institut National Polytechnique De Lorraine. 14-45p.
- Cheeke PR., OTERO R. 2005.** Yucca, Quillaja may have role in animal nutrition. *Feedstuffs*. 3: 11-14.
- Chevallier A. 2008.** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Larousse. 10-233 p.
- Choi Y., Noh D., Cho S. 2006.** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*. 39: 756–61.
- Clark G., Oscar Malte M. 1913.** Fodder And Pasture Plants. Harpress Publishing. 143p.
- Cowan M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
- Cronquist A. 1981.** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press Science. 1262p.
- Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O. 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. 80: 1144-1152.
- Cushnie TP., Hamilthoh VES., Lamb AJ. 2003.** Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res*. 158(4): 9-281.
- Cushnie T., Lamb A. 2011.** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38: 99-107.
- Dadi PK., Ahmad M, Ahmad Z. 2009.** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol*. 45 (1): 72-9.
- Daglia M. 2011.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 1-8.
- Di Carlo G., Mascolo N., A. Izzo A., and Capasso F. 1999.** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 65 (4): 337-353.
- Didrak M. 1999.** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (*Valex*, *Mimosa* bark, *Gallnut* powders, *Salvia sp* and *Phlomis sp*). *J. Biol*. 23: 241-8.
- Doughari J., Pukuma M., De N. 2007.** Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *African Journal of biotechnology*. 6: 2212 – 2215.
- Ekoumou C. 2003.** Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de pharmacie, Bamako. 144 p

- Faid M., Bakhy K., Anchad M., Tantaoui- Elaraki A. 1995.** Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. *J Journal of Food Protection*. 5:473-578.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M and Abdelly C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*. 331: 372-379.
- Fazeli M., Amin G., Ahmadin- Attari M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi N. 2007.** Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishane shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control Ethnopharmacol*. 18: 123-126.
- Fenwick DE., Oakenfull D. 1983.** Saponin content of food plants and some prepared foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 34: 186-191.
- Galati E M., Mondello M R., Giuffrida D., Dugo G. , Miceli N., Pergolizzi et Taviano M. F. 2003.** Chemical characterisation and biological effects of *sillician Opuntia ficus indica (L.)* Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem*. 51: 4903-4908.
- Gausson H., Leroy H F. 1982.** Précis de botanique, végétaux supérieurs. 2ème Ed. 426 p.
- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S A. 2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*. 76: 172-181.
- Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S., Moulou Y. 2014.** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare L.* *Phytothérapie*. 12 : 15-24.
- Gilbert G et Boutique R. 1954.** Mimosaceae et papilionaceae, in Flore du Congo belge et du Ruanda Urundi. édit. Bruxelles. Jard. Bot. 30 p.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez Romero M., Arraez Roman D., Segura Carretero A., Fernandez Gutierrez A. 2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- Gray A. 1997.** Pancreatic and extrapancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br J Nutr*. 78 (2) : 325-34.
- Güclü-Ustundag O., Mazza G. 2007.** Saponins: properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci*. 47(3): 231 – 258.
- Hambaba L., Boudjellal K. , Abdeddaim M., Aberkane M., Boudiaf K. 2012.** Étude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnus angustifolia L.* *Phytothérapie*. 10 : 350-356.
- Hammoudi R., Hadj M., Amdane F., Khodir A. 2012.** Activité antibactérienne des extraits phénoliques de la plante *Teucrium Polium Geyrii*. *Algerian Journal of arid environment*. 1: 53-54.
- Harrier L A., Whi P W., Sutherland JD., Sprent J. 1995.** A comparison of nodulating and non-nodulating african species of *Acacia* using morphological and molecular markers.' In Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. Newton éd. Kluwer Academic Publishers DordrechVBoston/London. 483 p .
- Havsteen B. 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96: 67-202.
- Hwang J. 2001.** Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *J. Agric. Food Chem*. 49 (1): 308-14.
- Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of

- Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. frut extracts. *Food Chemistry*. 105: 1126-1134.
- Heim K. E., Tagliaferro A R., Bobilya D J. 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10): 572-584.
- Heller R., Esmault R., Lance C. 1998.** Physiologie Végétale. 6eme édition. Dunod, Paris. 290p.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A K and Doble M. 2008.** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15: 639-652.
- Houghton P J et Raman A. 1998.** Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Ed. Chapman et Hall. Londres. 29-31p.
- Hsieh P. 2000.** Antimicrobial effect of cinnamon extract. Taiwanese. *J Agric Chem Food Sci*. 38:184–193.
- Ilic SB., Konstrantinovic SS., Todorovic ZB. 2004.** Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics Chem. Technol.* 3 (1): 73-7.
- Javanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.J. 1994.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116: 4846-4851.
- Jiménez M., Garcia- Carmona F. 1999.** Myricetin an Antioxidant flavonol is a substrate of polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1993-2000.
- Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić- Kojić A. 2010.** Plan inić and S.Tomas. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*. 28: 206-212.
- Kalemba D., kunicka A. 2003.** Antibacterial and Antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 10:829–1813.
- Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. 2007.** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. 100: 584–589.
- Katsoura M., Polydera A., Tsironis L., Tselepis A., Stamatis H. 2006.** Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology*. 123 : 491-503.
- Koffi A., Koffi-Nevry R., Kouassi K., Loukou Y., 2014.** Activité des extraits de six variétés de piment (*Capsicum*) utilisés en Cote d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*. 82 : 7379 – 7388.
- Koné W M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D., Dosso M. 2004.** Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 93: 43-49.
- Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H., Oreopoulou V. 2007.** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8:155-162.
- Kurisawa M., Chung J. E., Uyama H., Kobayashi S., 2003.** Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules*. 4 (5): 1394-1399.
- Kuster RM., Arnold N., Wessjohann L. 2009.** Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol*. 37 (1): 63-5.
- Le Moigne M., Symoneaux R., Jourjon F. 2008.** How to follow grape maturity for wine professionals with a seasonal judge training. *Food Quality and Preference*. 19: 672-681.
- Lopes-Lutz D., S Alviano D., S Alviano C., P. Kolodziejczyk P. 2008.** Screening of



- chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 69 :1732-1738.
- Lotito S B., Actis-Goretta L., Renart M L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H H., Steinberg F M., Keen C L., Fraga C G. 2000.** Influence of Oligomer Chain Length on the Antioxidant Activity of Procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276 (3): 945-951.
- Maataoui B., Hmyene A et Hilali S. 2006.** Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*), *Lebanese Science Journal*. 7(1) : 3-8.
- Macheix J ., Fleuriet A et Jay-Allemand C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 68-74 p.
- Malinow M. 1981.** Cholesterol and bile acid balance in *Macaca fascicularis* effects of alfalfa saponins. *J Clin. Invest.* 67 (1) : 156-62.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P. 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. 89: 411-420.
- Marfak, A. 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.
- Markowicz Bastos D., Saldanha L., Catharino R., Sawaya A., Cunha I., Carvalho P., Eberlin M. 2007.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- Martini A., Katerere D., Eloff J. 2006.** Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.* 93 (2-3): 207-12.
- Massiot G., Lavaud C., Guillaume D., Le Men-Olivier L. 1986.** Reinvestigation of the sapogenins and prosapogenins from alfalfa (*Medicago sativa*.L). *J Agric Food Chem* 36: 902–909.
- Mauries M. 2003.** Luzerne culture récolte conservation. Ed. France agricole. 12-13 p.
- Mc Donald S., Prenzler P.D., Autolovich M. & Robards K. 2001.** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chem*, 73: 73-84.
- Mellou F., Lazari D., Skaltsa H., Tselepis A. D., Kolisis F. N., Stamatis H. 2005.** Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116 (3): 295-304.
- Merken H., Beecher G. 2000.** Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatography A*. 897: 177-184.
- Middleton E., Drzewiecki G. 1984.** Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33(21): 3333-8.
- Miller N., Castelluccio C., Tijburg L., Rice-Evans C. 1996.** The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters -- radical scavengers or metal chelators. *FEBS Letters*. 392, (1), 40-44.
- Modak B. 2001.** Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quim.* 47 (1): 366-421.
- Molyneux P. 2004.** the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J sci Technol.* 26 (2 ): 211-219.
- Mookerjee B., Lee T., Logue G., Lippes H., Middleton E. 1986.** The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* 213: 511-20.
- Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G. 2005.** Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medicinal herb, *Journal of Ethnopharmacology*. 102 :123 -126.

- Neffar F** et Benabderahmane Z. 2013. Quantification des Huiles Essentielles dans deux Espèces de Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de Djebel Metlili (Batna). *Revue Agriculture*. 05 : 19 – 23.
- Namgoong S., Son K., Chang H., Kang S., Kim H. 1994.** Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci*. 54(5): 313-20.
- Okigbo R., Mbajinka C., Njoku C. 2005.** Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopia aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci*.1 (4): 392-7.
- Ojeil A., El Darra N., El Hajj Y, Bou Mouncef P., Rizk T et Maroun R. 2010.** Identification et caracterisation de composes phenoliques extraits du raisin chateau ksara. *Lebanese Science Journal*. 11(2) : 117.
- Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., Nakayama T. 2006.** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J*. 45: 133-43.
- Österreich und der Schweiz.1885.** Flora von Deutschland, Otto Wilhelm Thomé, 398 p.
- Paris, R. 1954.** B rill Suc. BDt, 457 p.
- Pérez-Magariño S., González-San J.L. 2006.** Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*. 96: 197-208.
- Perrier E., Mariotte A., Boumendjel A., Bresson-Rival D. 1998.** Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmetique, dermopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. FR 2778663-A1 France. 125p.
- Pierre D. 1996.** Soil microbiology. Editions Quae. 151p.
- Prat R. 2007.** Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations. Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris. 56 p.
- Proestos C., Sereli D., Komaitis M. 2006.** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem*. 95: 44-52.
- Quezel P., Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris. 135 p.
- Raven P., Evert R., Eichlorn S. 2000.** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck , Paris. 111p.
- Rees S., Harborne J. 1985.** The role of sesquiterpene Lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*. 24: 2225-2231.
- Ribereau-Gayon P. 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod.paris. 166p.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* . 20 (7): 933-956.
- Roussel M. 2006.** Les miracles du soja. Ed. Alpen. 26-29 p.
- Saija A., Tomaino A., Trombetta D., Luisa Pellegrino M., Tita B., Messina C., Bonina F., Rocco C., Nicolosi G., Castelli F. 2003.** 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 56 (2): 167-174.
- Samaniego-Sánchez C., González A., García-Parrilla M., Granados J., García de la Serrana H., Mart´inez M. 2007.** Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*. 593: 103-107.
- Sanchez-Moreno C. 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity

- in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: 121-137.
- Schoutteten F. 2004.** La Luzerne. Ed. CRCI/ARIST Champagen-Ardenne. 3-5p.
- Seeram N., Henning S., Zhang Y., Suchard M., Li Z., Heber D. 2006.** Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr.* 136 (10): 2481-5.
- Senhaji O., Faïd M., Elyachioui M., Dehhaoui M. 2007.** Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannell. *Journal de Mycologie Médicale*. 15 : 220-229.
- Shan B., Cai Y., Brooks J., Corke H. 2007.** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. **117**: 112-119.
- Slavica B., Ilic SSK B., Zoran B. 2004.** Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. *Phys. Chem. Technol.* 3: 67-71.
- Soltner. 1981.** Les bases de la production végétale. Tome 1, le sol. Collection sciences et techniques agricoles. 456p.
- Sosa M., Tonn C. 2008.** Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry Reviews*. 7: 3-24.
- Sroka Z. 2005.** Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C*. 60(11-12): 833-843.
- Subsamanian S., Stacey G et Yu O. 2007.** Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science.*, 12 (7) : 282-283.
- Suhr K., Nielsen P. 2003.** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 665-674.
- Thangara J., Adjei O., Allen B., Portaels F. 1999.** In Vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoter.* 45 : 231-233.
- Treki A., Dehimat S. 2009.** Etude phytochimique et evaluation de l'activite antibactérienne d'une Labiée : *Thymus hirtus*. *Sciences & Technologie C*. 29 : 25-29.
- Turkmen N., Velioglu Y., Sari F., Polat G. 2007.** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 12: 484-496.
- Ulanowska K., Traczyk A., Konopa G., Wegrzym G. 2006.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 184 (5): 271-8.
- Van Acker S., Van Den Berg D., Tromp M., Griffioen D., Van Bennekom W., Van Der Vijgh W., Bast A. 1996.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (3): 331-342.
- USSL. 1954.** Diagnostique and improvement of saline and alkali soils hand book n°60. USA, 160p.
- Vincent V., Levy F., Portaels F. 1992.** Proposed Minimal Standards For The Genus *Mycotarium* And For Description Of A New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *International journal of systematic bacteriology*. 42: 315-323.
- Viollon C., Chaumont J. 1994.** Antifungal properties Of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128: 151-153.
- Wagner H., Bladt S. 1996.** Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition, Springer. 207p.
- Wagner H. 1993.** Pharmazeutische Biologie. Drogen und Irhe inhaltsstaffe, Gustav Fisher

Verlag. Stuttgart-New-York. 50 p.

**Yun J., Pang E., Kim C., Yoo Y., Cho K., Chai J., Kim C., Choi S. 2004.** Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts, *J Periodontal Res.* 39(5):300-7.

**Yvon Gervaise M. 2004.** Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits, Euroforum, Paris, 10p.

**Zanin V. 1998.** Un nouveau concept nutritionnel pour l'homme l'extrait foliaire de luzerne. Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition APEF Paris. 6-21 p.

## Les sites

**Site A :** <http://www.passeportsante.net>. **Boudesocque L ., Yzerman M ., Bontemps G et Marie M . 2001.** Méthodes d'extraction et de purification des saponines de la Luzerne (*Medicago sativa.L*). Intérêts Modernes de cette Espèce.

**Site B :** <https://www.google.com/earth/>. **Google Earth. 2015.**

**Site C:** <http://www.ildis.org/LegumeWeb>. International Legume Database & Information Service LEGUMEWEB Report generated by LegumeWeb from the ILDIS World Database of Legumes, version 10.01

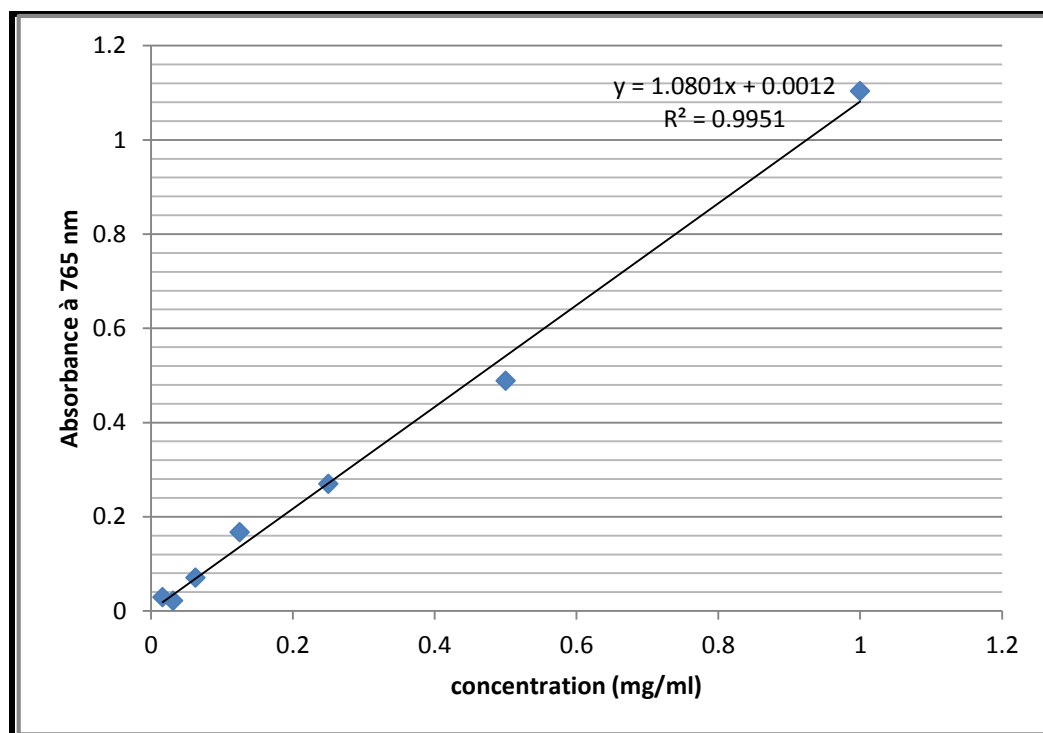
**Site D:** <http://floreduquebec.ca/english/photos=medicago-sativa>. **Perron M. 2015.** Flore du Québec.

**Site E:** <http://www.herbierimages.be> . **Pierre Papeux. 2015.** L'herbier en images.

# Annexes

## Annexe 01

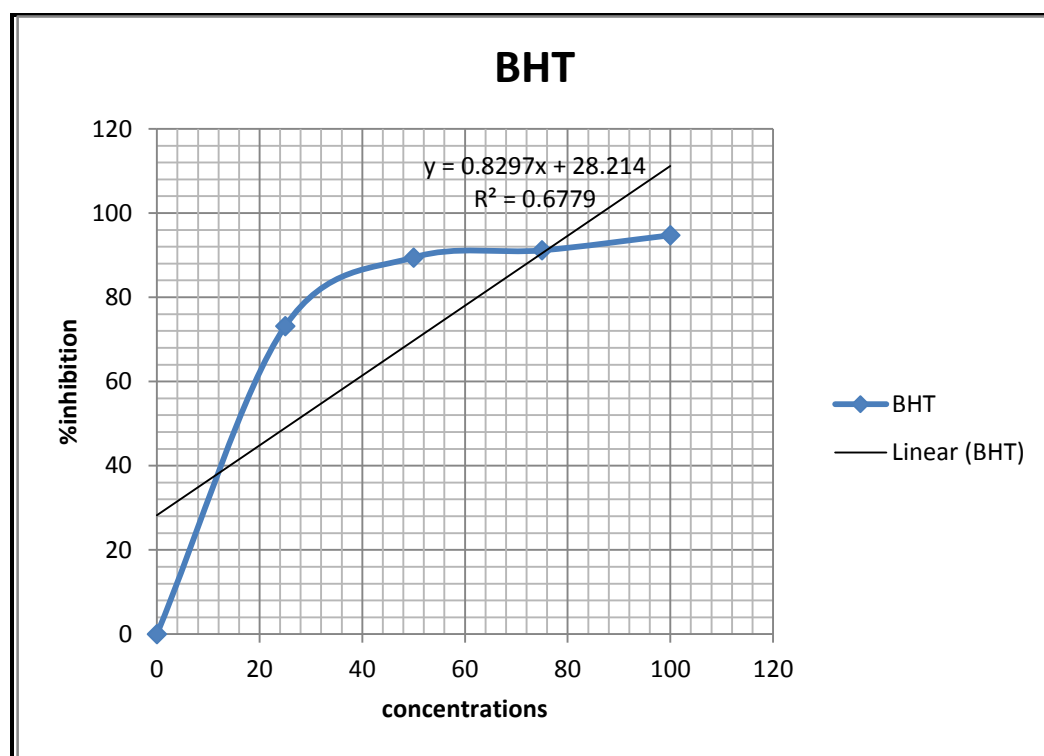
### Dosage des polyphénols



**Figure 01** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

## Annexe 02

### Evaluation de l'activité antioxydante



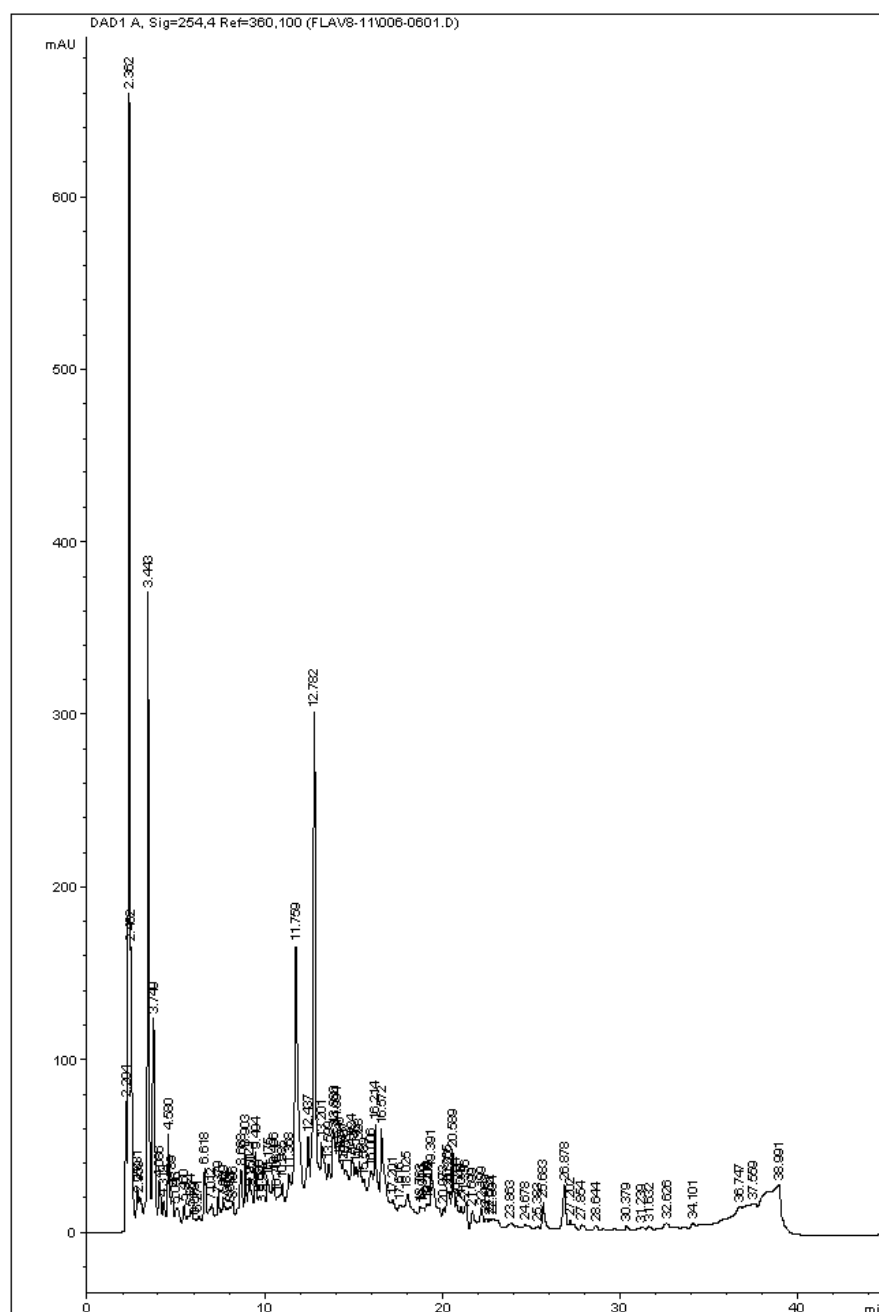
**Figure 02 :** Activité antioxydante du BHT.

## Annexe 03

### Analyse par HPLC

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLAV8-11\006-0601.D

Sample Name: ech6



Instrument 1 07/08/2011 17:27:25 BETTACHE.Z

Page 2 of 4





```

=====
Injection Date   : 07/08/2011 16:42:11      Seq. Line :    6
Sample Name     : ech6                      Location  : Vial 6
Acq. Operator   : BETTACHE.Z                Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 1               Inj Volume: 10 µl
Different Inj Volume from Sequence !      Actual Inj Volume: 20 µl
Sequence File   : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\FLAV8-11.S
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLAV8-11.M
Last changed    : 07/08/2011 12:46:50 by BETTACHE.Z
Analyse des Flavonoides dans sept (07) fractions .
Col=ODS 250X4.6 : 5µm a T=25C . PM= H2O pH 3.1 var ac acetic /ACN en gradient lineaire vdt
30min a 1ml/min en commençant par 100% de H2O et en terminant par 100% de ACN. Det=254nm.

```

```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.204	BV	0.0841	403.60226	75.85822	0.9611
2	2.362	VV	0.0911	3904.13574	659.48779	9.2973
3	2.462	VV	0.0843	942.43958	165.86269	2.2443
4	2.831	VV	0.1046	189.81905	26.18879	0.4520
5	2.959	VV	0.1740	270.07855	20.19837	0.6432
6	3.443	VV	0.0813	2137.63501	370.64783	5.0906
7	3.749	VV	0.1398	1253.35583	124.16046	2.9847
8	4.086	VV	0.1476	296.79486	28.95266	0.7068
9	4.319	VV	0.1341	166.38451	17.62796	0.3962
10	4.580	VV	0.1344	515.13599	56.50062	1.2267
11	4.789	VV	0.1316	213.47792	23.14458	0.5084
12	5.046	VV	0.2625	253.83716	13.93566	0.6045
13	5.460	VV	0.1612	169.65630	15.32261	0.4040
14	5.864	VV	0.2492	228.19229	12.14503	0.5434
15	6.079	VV	0.1531	79.66231	7.80501	0.1897
16	6.271	VV	0.1957	133.61777	9.07972	0.3182
17	6.618	VV	0.1427	363.87888	37.02588	0.8665
18	7.012	VV	0.2643	300.27029	15.75760	0.7151
19	7.379	VV	0.1819	277.41437	20.49366	0.6606
20	7.669	VV	0.2083	275.39590	17.43611	0.6558
21	7.914	VV	0.0951	90.61424	13.37284	0.2158
22	8.038	VV	0.1105	114.86724	14.80553	0.2735
23	8.196	VV	0.1695	207.11337	17.07520	0.4932
24	8.668	VV	0.2095	532.57190	35.39789	1.2683
25	8.903	VV	0.1243	396.00217	46.97948	0.9430
26	9.123	VV	0.1513	314.83350	30.78779	0.7497
27	9.250	VV	0.1092	185.45735	24.24528	0.4416
28	9.494	VV	0.1386	440.28311	45.61073	1.0485
29	9.680	VV	0.1400	189.64374	20.48221	0.4516
30	9.942	VV	0.2017	318.71301	20.92353	0.7590
31	10.175	VV	0.2247	482.87430	29.85571	1.1499
32	10.496	VV	0.1711	394.15948	32.59985	0.9387
33	10.706	VV	0.1147	160.80017	20.24815	0.3829
34	10.985	VV	0.2353	489.51788	27.54391	1.1657
35	11.368	VV	0.2201	542.34381	32.92923	1.2915
36	11.759	VV	0.2171	2703.14502	164.98849	6.4373
37	12.437	VV	0.1879	760.28479	54.78341	1.8105
38	12.782	VV	0.1631	3378.67358	300.56094	8.0460
39	13.201	VV	0.2428	966.15424	51.51151	2.3008
40	13.599	VV	0.1631	450.18225	38.86355	1.0721
41	13.880	VV	0.1877	794.40680	59.51537	1.8918
42	14.094	VV	0.1568	645.17279	58.44518	1.5364
43	14.246	VV	0.1015	291.86362	40.76463	0.6950
44	14.417	VV	0.1157	322.64047	38.54655	0.7683
45	14.582	VV	0.2283	571.33698	35.02068	1.3606
46	14.924	VV	0.1893	583.52460	42.74771	1.3896
47	15.146	VV	0.1440	376.37595	37.22739	0.8963
48	15.328	VV	0.2146	592.87164	40.07177	1.4119
49	15.589	VV	0.1827	391.22791	29.51260	0.9317
50	16.006	VV	0.2533	641.86462	34.78031	1.5285
51	16.214	VV	0.1801	805.91107	61.82112	1.9192
52	16.572	VB	0.2632	1159.10559	59.01321	2.7603
53	17.201	BV	0.2633	346.04849	17.92266	0.8241
54	17.616	VV	0.2502	270.23520	15.00154	0.6435
55	18.025	VB	0.3803	642.54456	21.27673	1.5302
56	18.763	BV	0.2047	206.05585	14.25095	0.4907
57	18.914	VV	0.1278	120.47464	13.54488	0.2869
58	19.116	VV	0.1149	123.61221	15.19578	0.2944

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLAV8-11\006-0601.D

Sample Name: ech6

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
59	19.202	VV	0.0854	90.52306	15.22688	0.2156
60	19.391	VB	0.2599	664.05096	33.41269	1.5814
61	20.073	BV	0.1649	148.72427	12.67762	0.3542
62	20.265	VV	0.1255	214.53067	24.66221	0.5109
63	20.372	VV	0.1072	162.70415	22.28208	0.3875
64	20.589	VV	0.1473	450.34763	45.55316	1.0725
65	20.794	VV	0.1532	188.21478	16.99341	0.4482
66	21.048	VV	0.1674	159.89667	13.57739	0.3808
67	21.336	VV	0.2076	217.70508	16.11145	0.5184
68	21.699	VV	0.2084	171.14452	11.58285	0.4076
69	22.199	VV	0.2142	181.22932	11.86681	0.4316
70	22.463	VV	0.1497	74.44924	7.13444	0.1773
71	22.661	VV	0.1326	60.14837	6.46375	0.1432
72	22.834	VV	0.3563	184.52303	6.44034	0.4394
73	23.863	VV	0.4840	171.11137	4.57871	0.4075
74	24.678	VV	0.3232	74.76803	3.03734	0.1781
75	25.383	VV	0.2400	36.87377	2.15115	0.0878
76	25.683	VB	0.1951	220.34866	15.95634	0.5247
77	26.878	BV	0.1795	321.62534	26.14786	0.7659
78	27.202	VV	0.2338	96.79447	5.48637	0.2305
79	27.854	VB	0.2193	45.66852	2.78572	0.1088
80	28.644	BP	0.1622	28.31396	2.57728	0.0674
81	30.379	PB	0.1404	16.17227	1.77269	0.0385
82	31.239	BV	0.2616	25.15526	1.45590	0.0599
83	31.632	VP	0.1911	17.04648	1.49448	0.0406
84	32.626	PB	0.3338	64.46300	2.98679	0.1535
85	34.101	PV	0.1854	37.87496	2.99686	0.0902
86	36.747	BV	0.7004	781.49158	14.19238	1.8610
87	37.559	VV	0.6054	767.63232	15.95105	1.8280
88	38.991	VP	0.8572	1940.24487	28.18164	4.6205

Totals : 4.19921e4 3751.59313

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\*\*\*  
\*\*\* End of Report \*\*\*

**Figure 03:** Chromatogramme d'HPLC de l'extrait flavonoïque de *Medicago sativa.L.*

## Annexe 04

### Antibiogramme de *S. aureus*

**Tableau 01 :** Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques sur *S. aureus*.

Vancomycine	Teicoplanine	Benzylpénicilline	Céfixime	Doxycycline
19	15.1	6	6	6

# **Publications et thèmes de recherches**

**Réalisé par : M<sup>lle</sup>. MESSIOUGHI Amel**

**Dirigé par : Mme TLILI-AIT KAKI Yasmina**

**Article accepté pour la soutenance**

## Research Article



## Effect of Solvent on the Antibacterial Activity of the Flavonoids in Luzerne

<sup>1</sup>Amel Messioughi\*, <sup>1</sup>Yasmina Tlili Ait Kaki, <sup>1</sup>Azzedine Chefrour, <sup>2</sup>Adala Chenna, <sup>3</sup>Abdelghani Djahoudi<sup>1</sup>Vegetal Biology Laboratory, Pharmacy Department, Medicine Faculty, Annaba University, Algeria.<sup>2</sup>VTRS Laboratory, University of El-Oued, Algeria.<sup>3</sup>Microbiology Laboratory, Medicine Faculty, Annaba University, Algeria.\*Corresponding author's E-mail: [messioughiamel@yahoo.fr](mailto:messioughiamel@yahoo.fr)

Accepted on: 02-06-2015; Finalized on: 30-06-2015.

## ABSTRACT

This work consists in identifying the influence of solvent extraction on microbiological activity of flavonoids isolated from *Medicago sativa*, that the phytochemical study shows its richness in flavonoids. Thus, three extracts obtained by three organic solvents, from the aerial parts of alfalfa harvested in the region of El Tarf (Eastern Algeria), tested on six bacterial strains and a strain of fungus. The phytochemical and microbiological analysis shows that the quantity and the quality of secondary metabolites substances in alfalfa is also variable and dependent on the solvent used. According to the results of the microbiological study and comparison with other studies in the same field, we can say that the butanol extract flavonoids isolated from the aerial part of *Medicago sativa* has better antibacterial and antifungal activity.

**Keywords:** *Medicago sativa*, flavonoids, antibacterial activity, antifungal activity, extracting solvent, butanol extract.

## INTRODUCTION

Alfalfa (*Medicago sativa*) was the subject of several published works particularly its use in forage and its ability to fix atmospheric nitrogen. It is cultivated as well, especially for agricultural needs. However, its therapeutic applications remain rare or even unknown. The objective of this study is to develop *Medicago sativa* entant that medicinal plant.<sup>1,2</sup> Our interest has focused on the wealth of chemical compounds in this plant species giving it unique properties that allow it to be classified as plants therapeutic effects. Phenolic content of a plant depends on a number of intrinsic and extrinsic factors<sup>3</sup>. The study conducted on this species cover both the quantitative and qualitative aspects of a group of flavonoids extracted from the aerial part of *Medicago sativa* and their microbiological activity. The calculated performance and microbiological activity of various extracts, were used to determine the influence of the extraction solvent to the latter<sup>4,5</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

## Vegetal Material

The harvest of the aerial parts of *Medicago sativa* was performed in the month of October in the region of Ben Mehdi wilaya of El Tarf Algeria. Area located between 36° 41 N and 7° 51 E a longitude from 0 to 50 m.

The drug consists of the dried leaves and stems at room temperature in the dark for ten days.

## Strains

Sixteen bacterial strains were the subject of a microbiological study including two referenced : *Escherichia coli* ATCC 23, *Staphylococcus aureus* ATCC 12

(ATCC: American Type Culture Collection) and fourteen strains isolated pathogen products *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*19, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella sp*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp*, *Staphylococcus aureus* 240, *Staphylococcus hominis* 88, *Staphylococcus saprophyticus*66, *Staphylococcus warneri* 176 et *Candida albicans*.

## Phytochemical Screening Flavonoids and Extraction

## Phytochemical Screening

Flavonoids, one of the active principles of *Medicago sativa* have been sought according to the methods described by Bruneton<sup>6</sup>. For this, 5 g of the powdered drug are macerated in 150 ml of 1% HCl for 24 h.

After filtering 10 ml of the mixture are basified by the addition of NH<sub>4</sub>OH, the presence of flavonoids, expressed after 3 hours by the appearance of a light yellow color in the upper part of the tube.

## Extraction

The extraction was performed by the method of Paris<sup>7</sup>: 40 g of drug are macerated in 800 ml 90% ethanol for one hour.

The residue is macerated again hot in 800ml of ethanol in the Soxhlet for 4 hours, after a night of rest, vacuum evaporation of the two ethanol solutions, taken up by 80 ml of boiling water the dry residue.

## Extraction with Ether

After filtration, extraction of the aqueous solution obtained above four times with diethyl ether (ethoxyethane) (4x40 ml).



### Extraction with Ethyl Acetate

Second extraction of the aqueous solution four times with ethyl acetate (4x40 ml).

### Extraction with Butanol

Third extracting the aqueous solution five times with butanol (butan-1-ol or n-butanol) (5x40 ml). We had three excerpts: flavonoids ethereal mixture Phase: FFTPE, flavonoids ethyl acetate phase mixture: FFTPA and flavonoids butanol phase mixture: FFTPB.

The yield is the ratio of the weight of the extract and the weight of the drug treated. Three replicates were performed for each extraction.

### Antibacterial Activity Test

#### Reactivation

The strains were first reactivated by inoculation in a suitable agar medium and from 3 to 5 and similar isolated colonies CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), bacterial suspensions obtained sterile saline was prepared at a concentration of  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml (Colony-Forming Unit).

#### Seeding

The cultivation method on Mueller-Hinton medium according Standardization antibiogram nationally used is that of Vincent<sup>8</sup>.

#### Layout of Disks

Disk calibrated and sterile blotting paper are impregnated with the test solutions using a micropipette (10 µl for each disk). The stock solution (SM) is prepared from a milligram of extract and one milliliter of DMSO.

In the first trial was conducted several dilutions of FFTPB extracted with DMSO (1/2, 1/4, 1/8, 1/16).

#### Reading

Reading is done by the millimeter measurement of the diameter of the inhibition zone around each disc<sup>9-12</sup>.

We performed two microbiological tests: in the first we analyze extract flavonoids (FFTPB) twelve bacterial strains and a fungal strain; the second was tested three extracts obtained previously seven bacterial strains and the strain of *C. albicans*.

## RESULTS

### Phytochemical Screening

Qualitative analyzes of the samples revealed the presence of flavonoids that have been our microbiological study.

### Determining Efficiency

The butanol fraction is the richest in flavonoids (FFPB: 1.073%). It was noted that there are significant differences between the flavonoid content of each extraction phase (Table 1).

### Study of the Antimicrobial Effect of Extracts

The extracts were tested on a range of bacterial strains and two fungal strain. According to Table 2, remarkable inhibition zones that obtained from the extract on FFTPB *K. oxytoca* (18.7mm) followed by *S. aureus* ATCC (16.5mm) and slightly active in *K. pneumoniae* (11.5mm). The fungal strain *C. albicans* is sensitive to FFTPB (14.2mm). Most other strains are resistant to our extracts.

**Table 1:** Content (Wealth) of flavonoids in drugs.

Extracts	Flavonoids yield 40 g DM	%
FFTPE	0.99 ± 0.078	0.247
FFTPA	0.328 ± 0.267	0.821
FFTPB	0.429 ± 0.370	1.073
TFFT	0.856 ± 0.169	2.14 ± 0.423

Notes: TFFT: Total of (FTP + + FTPB FTPA).

Each value is the average of 3 repetitions.

They exist some solutions that are more active than the stock solution, but in most of the strains, they are inactive. After selection of the strains according to the most important inhibitions areas, a second test was performed on the different extracts studied (we only used the stock solution because of the inhibition zones negligible dilutions for most strains). Our choice was limited to three bacterial strains (We added some *Staphylococcus* species because of the diameters of the zones of inhibition remarkable about this strain). In the second test, the FFPB extract is most active for all strains with the exception of *S. aureus* ATCC, the largest zone of inhibition is that of *S. warneri* (42.3mm). Among the studied strains, *S. aureus* ATCC is the resistant strain (Table 3). Regarding fungal strain FFPB the extract has the highest zone of inhibition (16.2mm), *S. aureus* ATCC and *K. pneumoniae* are resistant to all samples.

## DISCUSSION

May explain the differences between the levels of flavonoids in various phases by the polarity flavonoids vis-à-vis their extraction solvent<sup>13-15</sup>. The use of the drill mixing/sheets causes an increase in flavonoid rate<sup>16</sup> de on can say that our results are in agreement with the results of Bertin<sup>17</sup> et Zanin<sup>18</sup>. First test microbiological activity it was found that the majority of the tested strains are resistant to our extracts. They exist several dilutions more active than the mother solution, can be linked to the dissemination of DMSO in the culture medium. In the second trial and comparison with the study Athamena<sup>19</sup> and Treki<sup>20</sup>, it can be said that in general we flavonoiques extracts have antibacterial activity and very significant antifungal<sup>21,22</sup>.

This activity varies among strains tested and according to extraction solvents<sup>16,23</sup>. The largest zone of inhibition is achieved by the flavonoid extract the butanol fraction of the mixture; *S. aureus* ATCC is the most resistant strain our extracts despite being known as a sensitive strain<sup>24</sup>,



the resistance of the strain can be attributed to the ability of the antibacterial agent to uniformly diffuse into the agar<sup>25-27</sup>. It can also be linked to the agar diffusion method d'extraction<sup>28,29</sup>.

It can be shown that each flavonoid extract acts illegally bacteria, according to their polarity in the extraction solvent<sup>30-32</sup>.

These results indicate the study Triki<sup>20</sup>.

This may be related to the high content of glycosylated molecules and the high content of flavonoid compound<sup>33,34</sup>.

Cowan<sup>35</sup> and Bolou<sup>36</sup> have also shown that the phyto-molecules are distributed among the solvents according to their polarity and solubility, this confirms the results obtained by Hammoudi<sup>37</sup>.

## CONCLUSION

Through this work the importance of microbiological

activity of flavonoids isolated species was determined *Medicago sativa*. The phytochemical study of this plant demonstrates its richness in flavonoids. Our results have found that there are differences between the chemical composition of secondary metabolites.

According to the results of the microbiological study we can say that the butanol extract flavonoids isolated from the aerial part of alfalfa and *Medicago sativa* has better antibacterial and antifungal activity so it is best to use as an antibiotic for severe infections such as sepsis and endocarditis or as an anti-fungal infections caused by *C. albicans*.

**Acknowledgement:** We thank the laboratory staff medical botany, plant biology laboratory and microbiology laboratory team, of the Medical Faculty of Annaba, Algeria, for the information provided and available to us the equipment and products needed to carry out this work.

**Table 2:** Diameter of inhibition of the first test areas.

Strains	FFTPB				
	(SS)	½	1/4	1/8	1/16
<i>E. coli</i> ATCC 23	9.5	6	6	6	6
<i>S. aureus</i> ATCC 12	16.5	12.2	8.5	11.5	11.1
<i>A. baumannii</i>	9.6	11.5	9.5	6	6
<i>E. cloacae</i> 19	10.9	8.3	7.9	6	6
<i>E. coli</i>	7	8.1	7.2	10.2	6
<i>K. oxytoca</i>	18.7	6	6	6	6
<i>K. pneumoniae</i>	11.5	6	6	6	6
<i>P. mirabilis</i>	7.2	6	6	6	6
<i>Pseudomonas</i> 53	7.9	8.9	8.1	7.5	6
<i>Salmonella</i>	9.5	9.6	7.5	7.2	6.2
<i>S. marcescens</i>	7.7	9.6	9.1	6	6
<i>Shigella</i>	10.2	10.5	9.6	6	6
<i>Candida albican</i>	14.2	9.1	10.1	8.2	7.7

**Table 3:** Diameter of the second test flavonoid inhibition zones

Strains	Extracts		
	FFTPB	FFTPA	FFTPB
<i>S. aureus</i> ATCC 12	6	6	6
<i>K. oxytoca</i>	10.5	23.9	33.1
<i>K. pneumoniae</i>	11.5	27.7	35.8
<i>S. aureus</i>	33.6	32.5	35.9
<i>S. hominis</i>	26.7	28.2	32.5
<i>S. saprophyticus</i>	18.3	22.5	30.7
<i>S. warneri</i>	21.5	34.7	42.3
<i>C. albicans</i>	10.7	15.5	16.2





## REFERENCES

1. Hsieh P, Antimicrobial effect of cinnamon extract, Taiwanese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 2000, 184–193.
2. Faid M, Bakhy K, Anchad M, Tantaoui- Elaraki A, Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon, J Journal of Food Protection, 5, 1995, 473-578.
3. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, Comptes Rendus Biologies, 331, 2008, 372-379.
4. Bonnaillie C, Salacs M, Vassilova Saykova E, Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.), Revue de génie industriel, 7, 2012, 35-45.
5. Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić- Kojić A, Plan inić and S. Tomas. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans, Journal of Food Science, 28, 2010, 206-212.
6. Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4<sup>ème</sup> Edition, Lavoisier, 2009, 100-106.
7. Paris R, Brill Suc, BDt, 1954, 457.
8. Vincent V, Levy F, Portaels F, Proposed Minimal Standards For The Genus Mycotarium And For Description Of A New Slowly Growing Mycobacterium Species, International journal of systematic bacteriology, 42, 1992, 315-323.
9. Doughari J, Pukuma M, De N, Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*, African Journal of biotechnology, 6, 2007, 2212–2215.
10. Bssaibis F, Gmira N, Meziane M, Activité Antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.). W. Greuter, Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale, 3, 2009, 44-45.
11. Choi Y, Noh D, Cho S, Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea, LWT - Food Science and Technology, 39, 2006, 756–761.
12. Hambaba L, Boudjellal K, Abdeddaim M, Aberkane M, Boudiaf K, Étude *in vitro* des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnus angustifolia* L, Phytothérapie, 10, 2012, 350-356.
13. Viollon C, Chaumont J, Antifungal properties Of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*, Mycopathologia, 128, 1994, 151-153.
14. Suhr KI, Nielsen P, Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi, Journal of Applied Microbiology, 94, 2003, 665-674.
15. Kalemba D, kunicka A, Antibacterial and Antifungal properties of essential oils, Current Medicinal Chemistry, 10, 2003, 829-1813.
16. Rees S, Harborne J, The role of sesquiterpene Lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant, Phytochemistry, 24, 1985, 2225-2231.
17. Bertin E, Les extraits foliaires de luzerne, Maison de la recherche Fondation pour la Recherche Médicale, 2006, 5-6.
18. Zanin V, Un nouveau concept nutritionnel pour l'homme l'extrait foliaire de luzerne, Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition APEF, 1998, 6-21.
19. Athamena S, Chalhghem I, Kassah-laouar A, Laroui S, Khebri S, Activité Anti-oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L, Lebanese science journal, 11, 2010, 78.
20. Treki A, Dehimat S, Etude phytochimique et evaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*, Sciences & Technologie C, 29, 2009, 25-29.
21. Havsteen B, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacology and Therapeutics, 96, 2002, 67-202.
22. Sosa M, Tonn C, Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects, Phytochemistry Reviews, 7, 2008, 3-24.
23. Senhaji O, Faid M, Elyachioui M, Dehhaoui M, Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannell, Journal de Mycologie Médicale, 15, 2005, 220–229.
24. Biyiti L, Meko'o D, Tamzc V, Amvam Zollo P, Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises, Decade of African Traditional Medicine, 13, 2004, 11-20.
25. Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, Food Chemistry, 105, 2007, 1126-1134.
26. Cushnie T, Lamb A, Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, International Journal of Antimicrobial Agents, 38, 2011, 99-107.
27. Ghedadba N, Bousselesla H, Hambaba L, Benbia S, Moulou Y, Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L, Phytothérapie, 12, 2014, 15-24.
28. Natarajan D, John Britto S, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G, Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medicinal herb, Journal of Ethnopharmacology, 102, 2005, 123-126.
29. Fazeli M, Amin G, Ahmadi-Attari M, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N, Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishane shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria, Food Control Ethnopharmacol, 18, 2007, 123-126.
30. Koffi A, Koffi-Nevry R, Kouassi K, Loukou Y, Activité des extraits de six variétés de piment (*Capsicum*) utilisés en Cote d'Ivoire, Journal of Applied Biosciences, 82, 2014, 7379–7388.
31. Thangara J, Adjei O, Allen B, Portaels F, *In Vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloracin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of Mycobacterium ulcerans, Journal Antimicrobial Agents Chemoter, 45, 1999, 231-233.



32. Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N, Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum*, *Phytothérapie*, 10, 2012, 2-9.
33. Biondi D, Cianci P, Geraci C, Ruberto G, Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants, *Flavour and fragrance journal*, 8, 1993, 331-377.
34. Jiménez M, F Garcia-Carmona, Myricetin an Antioxidant flavonol is a substrate of polyphenol oxidase, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1999, 1993-2000.
35. Cowan M, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1999, 564-582.
36. Bolou G, Attioua B, N'Guessan A, Coulibaly A, N'Nuessan J, Daman A, Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80, 2011, 772–790.
37. Hammoudi R, Hadj M, amdane F, Khodir A, Activité antibactérienne des extraits phénoliques de la plante *Teucrium Polium Geyrii*, *Algerian Journal of arid environment*, 1, 2012, 53-54.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

