

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE



N° :.....

DOMAINE : Sciences de la nature et de la
vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Biodiversité et Physiologie
végétale

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par:

BOUCHELALLEG Aicha

MECHICHE Ahlem

Intitulé

**Evaluation de l'activité biologique des extraits
et des huiles essentielles de la plante
*Hedysarum spinosissimum ssp capitatum.***

Soutenu devant le jury composé de:

Dr SMAILI Taher	MCA	Université de M'Sila	Président.
Dr BELKASSAM Abdelouahab	MCB	Université de M'Sila	Rapporteur.
Mr HADJI Abbas	MAA	Université de M'Sila	Examineur.

Année universitaire : 2017 /2018

Remerciement

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Je tiens à remercier chaleureusement :

Dr. BELKASSAM Abdelouahab, Maître de conférence de classe B au département de science de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf de M'sila, pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour son encadrement, pour sa patience, son soutien moral sa rigueur et sa disponibilité durant la période de préparation de ce mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à Dr.SMAILI Taher, Maître de conférence de classe B au département de science de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf de M'sila, d'avoir accepté de présider le jury.

Nous tenons également nos vifs remerciements à Mr. HADJI Abbas, maître-assistant de classe A au département de science de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf de M'sila, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Un merci très spécial à Dr. BENMHAIA Radhouane chef de spécialité de Biodiversité et Physiologie Végétale, pour son aide et ses conseils.

À tous les ingénieurs des laboratoires.

À tous les étudiants de master de la promotion 2018.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la Réalisation de ce travail.

AHEM ET AICHA

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mon Très chère père
Tayeb qui m'a toujours soutenu, et qu'a été toujours
présent pour moi*

A ma très chère Mère

Pour vos mains qui ont tant travaillées

Pour votre coeur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes chère frère

A mon adorables soeurs

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux
moments au cours de mon cursus à l'université:*

Ahlem, iman, fatima, mayada, assma, wafa,

A toutes les étudiantes de 2ème année Master

Biod.P. V ET B. V.M

A tous ma famille

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Je dédie ce travail

BOUCHÉLALÉG Aïcha

إهداء

اهدي عملي هذا إلى والداي الكريمين اللذين لم يبخلا علي طوال حياتي بحنانهما وعطفهما وأسأل الله أن يبارك في حياتهما ويدخلهما جنة النعيم

إلى أخي الغالي "حسان" الذي لم يبخل علي بنصائحه وتوجيهاته إلى زوجته وأولاده.

إلى أخي الغالي "عبد الصمد"

إلى زوجته وأولاده

إلى كل أخواتي وأزواجهم وأولادهم

"منيرة. سليمة. نعيمة. سهام. حميدة"

إلى اعز صديقاتي

نور الهدى. عيشة. عيشة. سلام. لبنى. سليمة

إلى كل العاملين معي بمستشفى مقرة

إلى كل من يحمل لقب مشيش

أحلام مشيش

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction... ..01

Premier Partie : Etude Bibliographie

Chapitre I: Présentation de la plante étudiée

I. La famille de Fabacées 03

I.1.Description botanique de la famille fabacées03

I.2. Répartition géographique des Fabacées04

I.3. Sous-famille : Fabiodées.....04

II. Le genre *Hedysarum*04

II.1. L'espèce *Hedysarum spinosissimum* L.....05

II.1. 1.Généralité sur L'espèce *Hedysarum spinosissimum* L.....05

II.1. 2.Description botanique d'*Hedysarum spinosissimum* L.....05

II.1.3.Position systématique de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *capitatum*...05

Chapitre II: Métabolisme secondaire

I-Métabolisme primaire08

II-Métabolisme secondaire.....08

II.1. Définition08

II.2.Classification des métabolismes secondaires.....08

II.2.1.Les composés azotés.....08

II.2.1.1. Les alcaloïdes.....	08
II.2.1.1.1.Biosynthèse des alcaloïdes.....	09
II.2.1.1.2-Propriétés biologiques des alcaloïdes.....	10
II.2.1.2.Les composés phénoliques.....	10
II.2.1.2.1.Classification des composés phénoliques.....	10
➤ Les tanins	10
➤ Les coumarines.....	11
➤ Les flavonoïdes.....	12
II-1-3- Les huiles essentielles.....	16
II-1-3-1- Définition.....	16
II-1-3-2- Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	16
II-1-3-2-2- Compositions chimiques	17
II-1-3-3- Les constituants des huiles essentielles.....	17
II-1-3-4- Répartition et localisation des huiles essentielles.....	19
 Chapitre III : Les Activités biologiques	
I-L'activité antioxydant.....	20
I-1-Généralité.....	20
I-2-Stress oxydant et ses conséquences biologiques.....	20
I-3-Les radicaux libres.....	20
I-4-Les antioxydants.....	20
I-5-Antioxydants d'origine végétale.....	21
II-Activité antibactérienne.....	21
II-1-Généralité.....	21
II -2-Les antibiotiques.....	21
II-3-Description des souches bactériennes utilisées.....	21

Deuxième Partie :

Chapitre I : Matériel et méthode

I-Matériel végétal.....	24
I-1- Le modèle d'étude.....	24
I-2-La récolte	24
II-Extraction.....	25
II-1- Macération.....	25
II-2- L'extraction des principes actifs.....	25
II-2-1- Préparation de l'extrait brut par extraction solide-liquide(ESL).....	25
II-2-2- Fractionnement de l'extrait hydrométanolique extraction Liquide-liquide(ELL).....	26
II-3-Extraction des coumarines.....	29
II-4-L'extraction de l'huile essentielle.....	30
II-4-1-Conservation de l'huile essentielle obtenue.....	31
III-Analyses qualitatives des extraits de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	31
III-1-Préparation des plaques CCM	32
IV-Test des activités biologiques.....	33
IV-1-Activité antioxydant de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum	33
IV-2-Activité antibactérienne de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	35
Chapitre II : Résultats et discussion	
I- Evaluation des techniques d'extraction de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum	38
I-1-Extraction des polyphénols de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	38

I-1-1-Rendement des extraits secs de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	38
I-2-Extraction des huiles essentielles <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	39
I-3-Extraction des coumarines.....	40
II-Analyse quantitatives des extraits <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum.....	41
II-1- Chromatographie sur couche mince.....	41
III-Résultats des tests biologiques.....	50
III-1-Activités antioxydant des extraits <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum ..	50
III-2-L'activité antibactérienne des extraits de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp capitatum	52
Conclusion	58

Références bibliographiques

Annexe

الملخص

Résumé

Abstract

Liste Des abréviations

Abs : Absorbance

BHT : Hydroxytoluène butylée

C : Concentration

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : Chloroforme

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl

EAcOEt.Fl : Extrait d'acétate d'éthyle de la fleur

EAcOEt.Fel : Extrait d'acétate d'éthyle de la feuille

EBr. Fl : Extrait brute de la fleur

EBr. Fel : Extrait brute de la feuille

En-BuOH. Fl : Extrait n-butanol de la fleur

En-BuOH. Fel : Extrait n-butanol de la feuille

ERO : Espèce réactives de l'oxygène

g : gramme

GPx : La glutathion peroxydase

HE : Huile essentiel

IC₅₀ : Concentration d'Inhibitrice 50

MeOH : Méthanol

ORAC : Oxygène Radical Absorbance Capacity

Rf : Rapport frontal

RHE : Rendement en huile essentiel

SOD : Le superoxyde dismutase

UV : Ultra-violet

V/V : Volume par volume

Liste des tableaux

Tableau 01: les différents Systèmes utilisés pour la CCM de gel de silice.....	32
Tableau 02 : Les souches microbiennes.....	36
Tableau 03 : Les Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait d'acétate d'éthyle de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	46
Tableau 04 : Les Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait <i>n</i> -Butanol de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i> ..	47
Tableau 05: Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait brut de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	48
Tableau 06 : Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans les coumarines de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	49
Tableau 07: Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait brute de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	55
Tableau 08: Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait acétate d'éthyle de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	56
Tableau 09: Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait <i>n</i> -butanol de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	57
Tableau 10: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait des coumarines de plante <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatu</i>	57

Liste des figures

Figure 01: La plante de <i>Hedysarum spinosissimum</i> .Subsp capitatum.....	06
Figure 02 : Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes.....	09
Figure 03 : Structure chimique des tannins.....	11
Figure 04 : Formule semi-développée de la coumarine.....	11
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 06 : Etapes communes de la biosynthèse de tous les flavonoïdes.....	15
Figure 07 : Structure générale des saponosides.....	16
Figure 08 : Localisation géographique de la wilaya de M'sila.....	24
Figure 09: Appareil de Rotavapeur de type BÜCHI-R -120.....	25
Figure 10 : Extraction liquide- liquide Par l'acétate d'éthyle de la feuille.....	27
Figure 11 : Extraction liquide- liquide Par l'acétate d'éthyle de fleur.....	27
Figure 12 : Extraction liquide-liquide Par n-butanol de la feuille.....	27
Figure 13 : Extraction liquide-liquide Par n-butanol de la fleur.....	27
Figure 14 : Les étapes d'extraction des flavonoïdes.....	28
Figure 15 : Extraction des coumarines De la fleur.....	30
Figure 16 : Extraction des coumarines De la feuille.....	30
Figure 17 : Appareil d'hydrodistillation de type de cleverger.....	31
Figure 18 : Appareil de l'Ultra-Violet	33
Figure19 : Forme libre et réduite du DPPH	34
Figure 20 : Appareil de Spectrophotomètre	35
Figure21 : Rendement des différents extraits de <i>Hedysarum spinosissimum</i> .ssp <i>capitatum</i>	38
Figure 22: Rendement des huiles essentielles de <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>	39

Figure 23: Rendement des coumarines de <i>Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum</i>	40
Figure 24 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et <i>n</i> -buOH des feuilles (04 systèmes de solvants)	42
Figure 25: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des extraits bruts des feuilles (04 systèmes de solvants)	43
Figure 26: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des coumarines des feuilles (04 systèmes de solvants)	43
Figure 27: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des AcOEt et <i>n</i> -buOH des fleurs (04 systèmes de solvants)	44
Figure 28 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des extraits bruts des fleurs (04 systèmes de solvants)	45
Figure 29 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des coumarines des fleurs (04 systèmes de solvants)	45
Figure30 : Représentation de l’Inhibition du radical DPPH par l’estimation des valeurs d’IC ₅₀ des différents extraits de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i>	51
Figure 31: l’effet de l’acétate d’éthyle de la fleur de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	53
Figure32: l’effet de l’acétate d’éthyle de la feuille de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	53
Figure 33: l’effet de <i>n</i> -butanol de la feuille de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> . Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	53
Figure 34: l’effet de <i>n</i> -butanol de la fleur de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	53
Figure 35: l’effet d’extrait brut de la feuille de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	54
Figure 36: l’effet d’extrait brut de la fleur de <i>Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum</i> . Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d’extraits	54

Figure 37: l'effet de coumarine de la feuille de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.....54

Figure 38: l'effet de coumarine de la fleur de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.....54

Introduction

Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancien et a toujours été faites de façon empirique (**Svoboda et al., 2000**).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiple semis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie; Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique.

Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine. (**Hostettmann et al., 1998**). La famille légumineuse renferme les anciennes familles de Césalpiniacées, des Mimosacées et des Papilionacées et compte 18000 espèces, dont les haricots, les pois, les genêts, les trèfles, les robiniers, etc. (**Couplan, 2012**).

Cette famille des légumineuses est sur le plan agricole importante et est spontanée ou cultivée dans le monde entier à des fins diverses, notamment la production de nourriture et de fourrage, comme les engrais verts, ou l'assurance du sol pour réduire l'érosion (**Chen et al., 1995**).

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressées à des espèces non connus pas. Dans le but général de l'étude est la caractérisation photochimique des extraits issue de la plante *Hedysarum spinosissimum*

ssp *Capitatum*. à travers de l'évaluation de l'activité biologique (activité antioxydant et activité antibactérienne) des extraits et les huiles essentielles de notre plante pour avoir un aperçu sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez la plante pour mieux comprendre leur effets biologiques.

Notre travail de recherche sera réparti en deux parties.

La première partie consiste en une étude bibliographique avec trois chapitres le premier est présentation de la plante étudiée et le deuxième chapitre sur le métabolisme secondaire et l'activité biologique dans le dernier chapitre.

La deuxième partie est la partie expérimentale qui divisé en deux chapitre le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes manipulations, le deuxième chapitre présentera les résultats obtenus accompagnés de leur discussion.

Une conclusion viendra clôturer notre travail.

Partie N°01

Etude

bibliographique

Chapitre N°01
Présentation de la
plante étudiée

I- La famille Fabacées

I-1- Description botanique de La famille Fabacées

Les plantes Fabacées sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles (**Judd et al., 2002**).

Les formes arbustescents prédominent dans les pays chauds ; les formes herbacées dans les régions tempérés (**Dupont et Guignard, 2012**). À métabolisme azoté élevé et acides aminés inhabituels. Souvent nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*) ; Parfois canaux ou lacunes sécrétrices ; généralement des annins ; souvent des alcaloïdes Parfois des composés cyanogénétiques ; plastes des tubes criblés à cristaux protéiques et aussi à grains d'amidon. Poils variables. Feuilles généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Entières à parfois dentées serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées. Produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines.

Les Inflorescences sont presque toujours indéterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement 5, libres ou plus souvent soudés, pétale généralement 5, libres ou soudé, valvaires ou imbriques, tous semblables, ou le pétale postérieure différant par la forme, la taille et la couleur (c'est-à-dire formant un étendard), disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs souvent soudés ou adhérentes formant une carène, ou largement étalés.

Les étamines 1 à nombreuses, mais généralement 10, abritées dans le périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes ; à filets libre ou soudés et, dans ce cas, souvent monadelphes ou diadelphes (9 étamines soudés et la supérieur, ou vexillaires, plus ou moins libre).

Les grains de pollen sont tricolporés, tricolpés, ou triporés, généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle presque toujours 1, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore ; L'ovaire est supère, à

placentation pariétale, style 1, incline vert l'avant parfois velu ; stigmate 1, réduit. Ovule 1 à nombreux par carpelle disposés sur 2 rangs le long d'un placenta supérieur, souvent campylotropes. Nectar produit par la surface interne de l'hypanthium ou par un disque intrastaminal. Seul un carpelle persiste : il est à l'origine d'une gousse appelée «légume» par les premiers botanistes (**Dupont et Guignard, 2012**).

Le fruit est généralement une gousse, parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscente, un akène, une drupe ou une baie.

I-2-Répartition géographique des Fabacées

Les Fabacées quasi cosmopolite, la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants ; Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats. Genre 630 et l'espèce 18000 (**Judd et al., 2002**).

I-3-Sous-famille : Fabioïdées

Fabioïdées (papilionoïdées) sont des herbacés, buissons, ou arbre, feuilles composées pennées ou trifoliolées, rarement unifoliolées, corolle zygomorphe, étamines 10 ou 9 + 1 incluses, pollen monades (**Judd et al., 2002**).

Les Fabioïdées (du genre faba, fève), autrefois appelées papilionacées, en raison de la forme de la corolle en «papillon», comprennent de nombreux représentants de nos régions : les Trèfles, les Pois, les Haricots ... (**Dupont et Guignard, 2012**). Les Fabioïdées, représentent d'ailleurs les deux tiers des espèces de «Légumineuses». (**Dupont et Guignard, 2012**).

II-Le genre *Hedysarum*

Les espèces du genre *Hedysarum* (famille des Fabacées et tribu des Hedysarées) poussent spontanément sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, présentant ainsi une grande diversité. Ce genre est représenté par plus de 170 espèces réparties à travers l'Europe tempérée, la région méditerranéenne, l'Ouest de l'Asie, la Sibérie et l'Amérique du Nord en allant de l'Arizona jusqu'au Canada et aux régions Arctiques (**Allen et Allen 1981; Wielgorskaya 1995**).

En Afrique du Nord, on recense 10 espèces dont plusieurs sont endémiques. La Tunisie et le Maroc comprennent chacune six espèces (**Battandier et Trabut, 1902; Jahandiez**

et Maire, 1932) et l'Algérie comprend neuf espèces dont *H. naudinianum* Coss. Et *H. perrauderianum* Coss et Durieuendémiques de l'Algérie, et *H. carnosum* Desf. Et *H. pallidum* Desf. Endémiques de l'Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1962).

Les espèces du genre *Hedysarum* sont bien adaptées aux sols calcaires et aux bancs graveleux et rocailleux. Certaines espèces poussent jusqu'à 2300 m d'altitude (Allen et Allen, 1981).

Hedysarum vient du mot grec *Hedys*, qui signifie fourrage doux à brouter (Bonnier, 1934). Les plantes appartenant à ce genre sont d'une manière générale constituées d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes: tige principale orthotrope et ramifications latérales plagiotropes. Ces espèces comme toutes les autres espèces légumineuses fourragères telles que la luzerne, participent à la fixation des sols et à leur enrichissement en azote, ainsi qu'à l'alimentation du bétail étant donné que la majorité d'entre elles sont pâturées par les ovins et les bovins.

II-1- L'espèce *Hedysarum spinosissimum* L.

II-1-1- Généralité sur L'espèce *Hedysarum spinosissimum* L.

C'est une espèce méditerranéenne annuelle polymorphe, présente des inflorescences en tête dense (même à la fructification) en atteignant au plus 2 cm de long. Elle se caractérise par des folioles glabrescentes, souvent plus ou moins alternes dans la portion inférieure de la feuille. Elle pousse sur de sols salés et caillouteux.

La sous espèce *Hedysarum spinosissimum* subsp *capitatum*. A allogamie prépondérante, présente des fleurs de 15-20 mm et de couleur purpurine ou blanchâtre (Quezel et Santa 1962).

II-1-2- Description botanique d'*Hedysarum spinosissimum* ssp *capitatum*

C'est une plante annuelle de 5-40cm, velue blanchâtre, couchés ou ascendante et à racine grêle. Les feuilles sont petites 5à8 paires de folioles ovales ou linéaires, tronqués ou échancrés, mucronées, pubescentes en dessous. Les stipules libres et lancéolées-acuminées. Elles présentent des fleurs roses, assez grandes (8-12mm) et rapprochées en grappes très courtes, ombelliformes, sur des pédoncules plus long que la feuille. Les

pédicelles plus courts que le tube de calice. Le calice à gorge coupées transversalement, à dent plus longue que le tube. L'étendard plu long que les ailes et dépassant un peu la carène ;

Les gousses sont formées de 2 à 4 articles arrondis, hérissées d'aiguillons crochus, velus et à bords non ailés. Les grains sont luisantes (**Tela Botanica, 2001**).



Figure 01: La plante de *hedysarum spinosissimum.ssp capitatum*.

En haut: la plante;

En bas à gauche: les fleurs;

En bas au centre: les feuilles;

En bas à droite : grains.

II-2-Position systématique de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp capitatum*

Selon (Quezel et santa, 1962), la position systématique de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp capitatum* est comme la suite :

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Dialypétales
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Sous-famille	Faboidées
Genre	<i>Hedysarum</i>
Espèce	<i>Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum.</i>

Chapitre N° 02
Métabolisme
Secondaire

Le métabolisme

I. Métabolisme primaire

Les Métabolites primaires sont directement impliqués dans les processus vitaux essentiels au développement normal et à la reproduction des cellules. Parmi ceux-ci, il y a les acides aminés, les nucléotides, les glucides, les alcools, les antioxydants, les acides carboxyliques, les polyphénols et les vitamines (**Jean-Pierre Jost, 2014**).

II. Métabolisme secondaire

II.1. Définition

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al., 2002**).

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux. Ils ont d'abord été considérés comme des produits de rebut, mais on sait maintenant que les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent. Beaucoup fonctionnent comme signaux chimiques permettant à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement. D'autres interviennent pour défendre la plante contre les herbivores, les pathogènes (organismes responsables de maladies) ou les compétiteurs. Certaines assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines. (**Raven et al., 2014**).

II.2. Classification des métabolismes secondaires

II.2.1. Les composés azotés

II.2.1.1. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W. Meisner en 1818 et est utilisé pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, ce sont des substances azotées, basiques, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (**Bruneton, 1999**).

Les alcaloïdes ont des structures très diverses, ils dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques. Ils ont une activité biologique chez les animaux, souvent même à très faibles concentrations, et beaucoup sont couramment utilisés en médecine (par exemple la cocaïne, morphine...). (Judd *et al.*, 2002).

II.2.1.1.1. Biosynthèse des alcaloïdes

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (Ziegler et Facchini, 2008). Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire (Nacoulma, 2012).

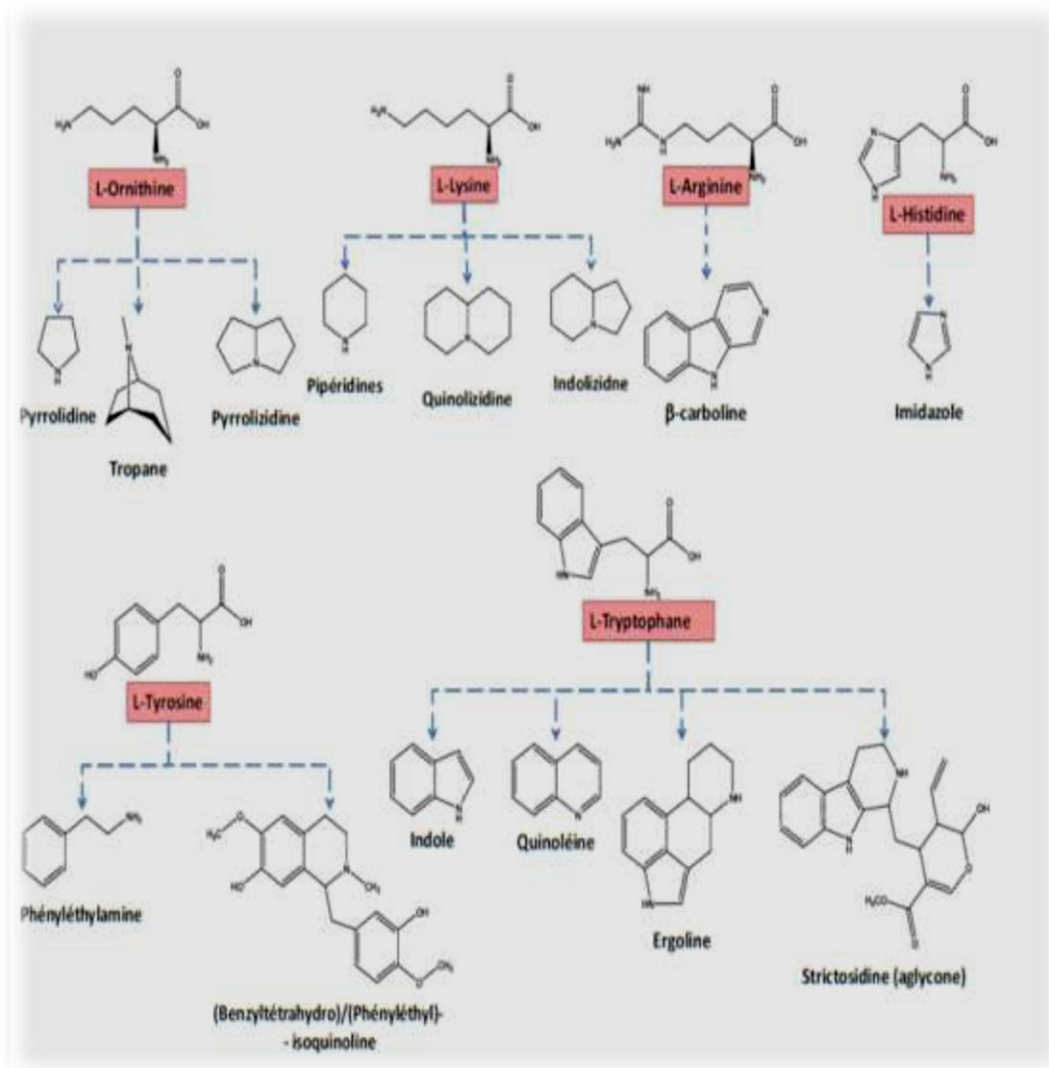


Figure02: Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes (Nacoulma, 2012).

II.2.1.1.2. Propriétés biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'Homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétylcholine, epinephrine, norépinephrine, acide aminobutyrique (GABA), dopamine et la sérotonine. Les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques: Analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne), (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphédrine), plusieurs alcaloïdes servent de modèle pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures (**Bhat, 2005**).

II.2.1.2. Les composés phénoliques

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques, désigne un vaste ensemble de substances qui présentent toutes un point commun, la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les composés phénoliques ou polyphénols forment une grande famille de composés chimique très divers depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes que sont par exemple, les tanins et la lignine. La structure de base est le phénol, un cycle aromatique hydroxylé (**Hopkins, 2003**).

II.2.1.2.1. Classification des composés phénoliques

➤ Les tanins

Utilisés depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (vin, thé...). En première approximation, on peut considérer que les tannins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Aussi les premières estimations quantitatives des tannins ont-elles utilisées la condensation avec des protéines modèles : gélatine, albumines...

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différant à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Macheix, 2005).

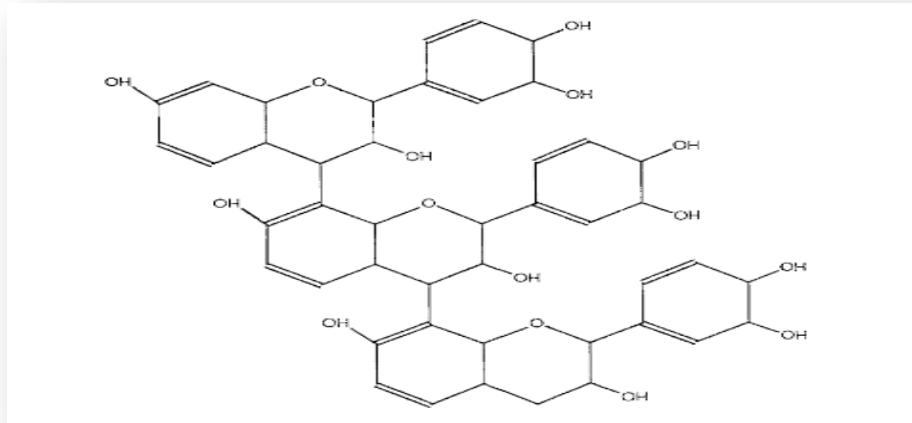


Figure 03: structure chimique des tannins (Larbier et Leclercq, 1992).

➤ **Les coumarines**

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques (Benayache, 2005). Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999).

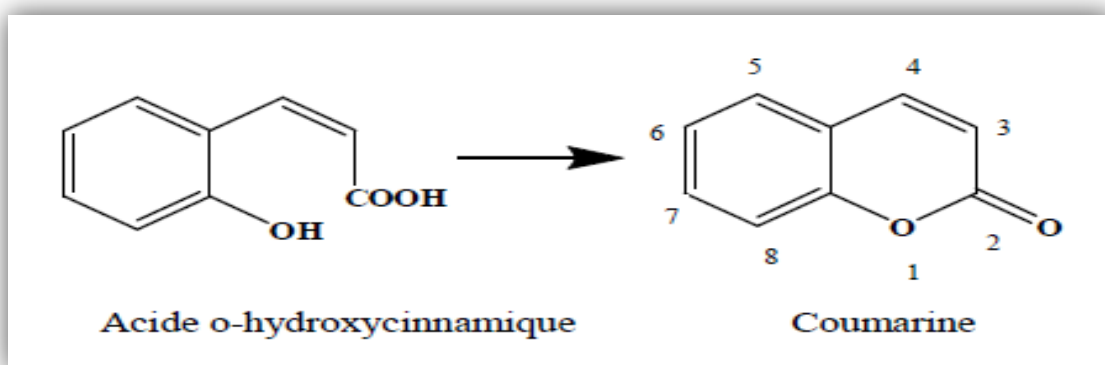


Figure04: Formule semi-développée de la coumarine (Bouderdara, 2013).

➤ **Les lignines**

Contrairement aux autres composés phénoliques, les lignines se déposent dans les parois cellulaires et non dans la vacuole. Après la cellulose, les lignines constituent le composé organique le plus abondant sur terre ; ce sont les polymères formés de trois types de monomères : le *p*-coumaryle, le coniféryle et les alcools sinapiques. La lignine est surtout importante pour la résistance à la compression et la rigidité qu'elle confère à la paroi cellulaire (**Raven, 2014**).

Les lignines sont des molécules hydrophobes. Cette propriété explique leurs qualités protectrices contre les bioagresseurs et le fait que les cellules lignifiées soient des cellules mortes. Les lignines sont très résistantes à la compression. On les retrouve dans le sclérenchyme, qui assure la protection, le soutien et la conduction de la sève brute (xylème) et dans les tissus adultes (**Pouzet, 2010**).

Les lignines, biopolymères complexes, hydrophobes, très souvent associés à la cellulose, peuvent être considérées au niveau technologique tout d'abord comme des coproduits résultants d'un prétraitement ou d'une transformation des lignocelluloses pour l'utilisation principale de la cellulose (**Morot-Gaudry, 2016**).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des constitués de cycles benzoïques présentant plusieurs groupements hydroxyles et sont pour cette raison également nommés polyphénols.

Les groupements hydroxyles sont responsables de la fonction antioxydant des polyphénols. Les flavonoïdes présentent un fort effet antioxydant et peuvent, par conséquent, prévenir les lésions oxydatives survenant par exemple au niveau des lipoprotéines LDL. Les flavonoïdes peuvent également influencer l'activité des enzymes intervenant dans les processus d'inflammation, d'agrégation et d'adhésion plaquettaires au niveau des parois vasculaires (**Descheemaeker et Provoost, 1999**).

Les flavonoïdes peuvent être répartis en isoflavonoïdes ou phytoestrogènes, en catéchines, en anthocyanes et en flavonoïdes. Un représentant important des flavonoïdes est la quercitrine. Il existe plus de 4.000 sortes de flavonoïdes décrits à ce jour et ce nombre va croissant (**Descheemaeker et Provoost, 1999**). Le terme flavonoïdes

rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones et les isoflavones. Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. On les trouve donc dans les plantes très colorées comme les légumes verts foncé ou les fruits rouges (**Causse, 2004**).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le méso-philes. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (**Bruneton, 1999**).

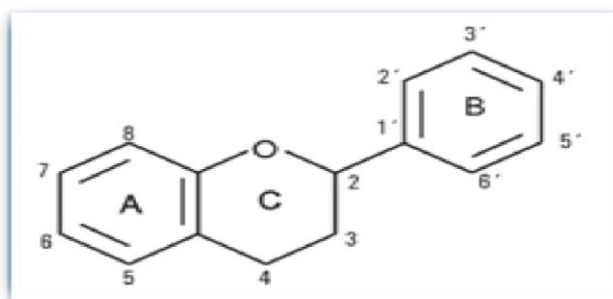


Figure 05: Structure de base des flavonoïdes. (**Bruneton, 1999**).

- **Les principales classes de flavonoïdes**

a- Les flavones et les flavonols

Les flavones et les flavonols représentent la majorité des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas. Chez ces molécules le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables hydroxyles libres ou étherifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C-4', peut être disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles

(OH) comme ils peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. Les principales flavones sont l'apéginine

et la lutéoline, alors que les principaux flavonols sont la quercétine, kaempférol, et la myricétine (**Bruneton, 1999**).

b- Les flavanones et les dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues

insaturés rassemblant les flavones et flavonols. La principale flavanone est la naringénine, alors que le dihydroflavonol le plus rencontré est la catéchine (**Bruneton, 1999**).

c- Les chalcones

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α , β -insaturé. Si les substitutions sur le noyau A sont le plus ou vent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Pour ce type de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes. Les chalcones les plus importants sont: la butéine et la phlorétine (**Bruneton, 1999**).

d- Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylées en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. Les anthocyanidines les plus abondantes sont: la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine (**Bruneton, 1999**).

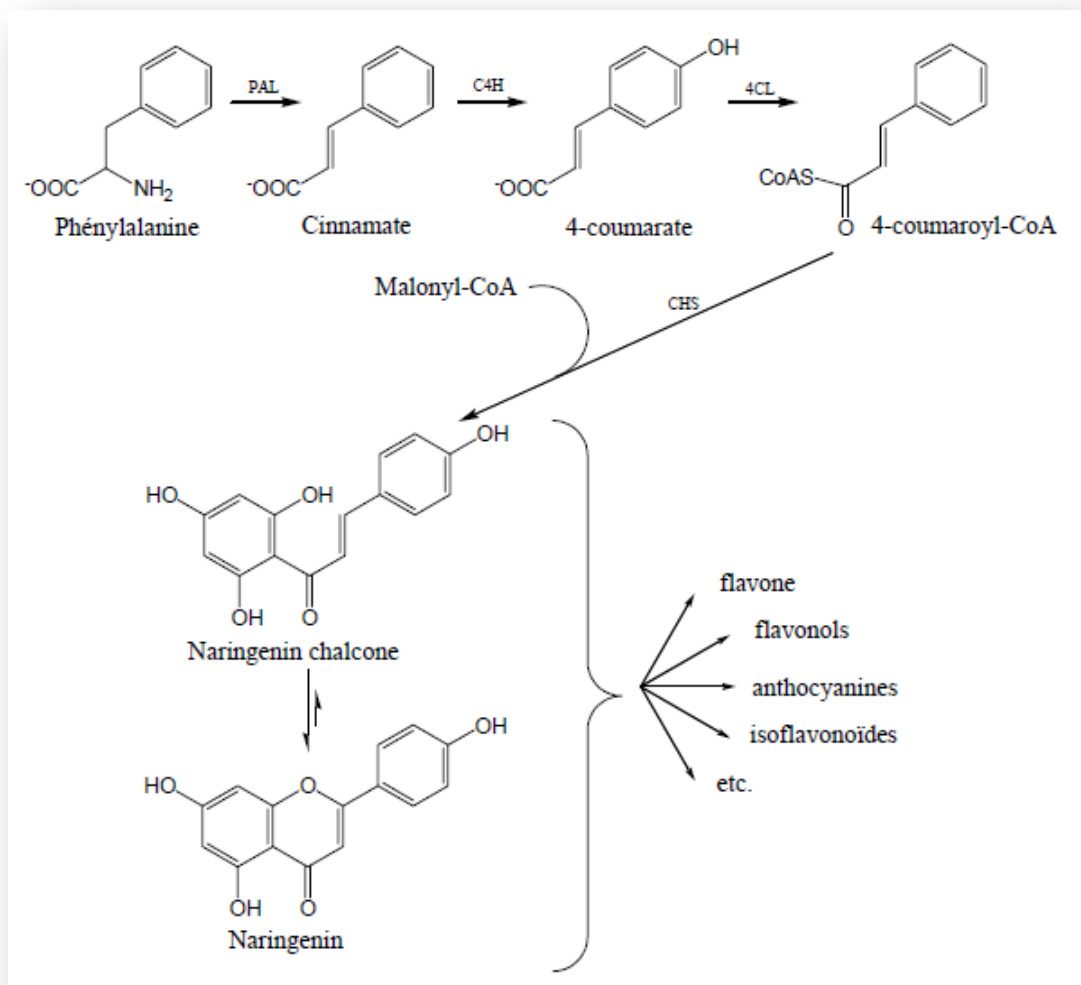


Figure06: Etapes communes de la biosynthèse de tous les flavonoïdes (Fiorucci, 2006).

➤ Saponosides

Le terme de saponoside est dérivé de la saponaire (*Saponaria*) qui était jadis utilisée comme substitut du savon, les saponosides sont des terpènes glycosylés, ils peuvent être des stéroïdes glycosylés ou des hétérosides triterpéniques, comme ils peuvent être trouver sous forme d'aglycones (ou génines; ce sont des composés terpéniques ne possédant pas de glucides) appelés sapogénines. La combinaison d'un triterpène hydrophobe et d'un glucide hydrophile confère aux saponosides des propriétés tensioactives ou de détergent, qui lorsqu'ils sont agités avec de l'eau produisent une mousse savonneuse (William, 2003).

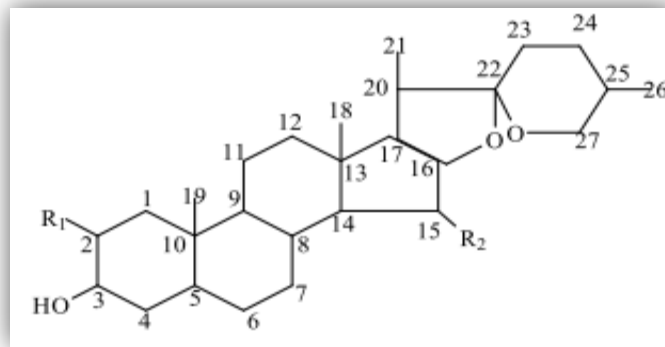


Figure07 : Structure générale des saponosides (**Bouhadjera, 2005**).

II-1-3- Les huiles essentielles

II-1-3-1- Définition

Les huiles essentielles sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Bruneton, 1999**).

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse végétale : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

L'huile essentielle se trouve dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage (**Kaloustian et Hadji-Minaglon, 2012**).

II-1-3-2- Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

II-1-3-2-1- Propriétés physiques

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur ;
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99 (Les huiles essentielles de saffron, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions) ;
- Elles ont un indice de réfraction élevé ;
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée ;
- Elles dissolvent les grasses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels ;
- Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée ;
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté (**Bekhechi et Abdelouahid, 2014**).

II-1-3-2-2- Compositions chimiques

Les huiles essentielles sont des mélanges plus ou moins complexes dont les constituants jouent du point de vue parfum des rôles d'inégale importance : les uns contribuent puissamment à l'arôme de l'essence, certains participent simplement à l'harmonie du mélange. D'autres sont complètement inodores ou peu odorants, ceux-ci ont un rôle tout à fait effacé.

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

II-1-3-3- Les constituants des huiles essentielles

Les principaux constituants des huiles essentielles sont les suivants :

✓ Les terpénoïdes

Les composés terpénoïdes constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structural que fonctionnel. Avec près de 15.000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbone. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblages.

La formation de structures acycliques, l'addition de fonction comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes (**Hopkins, 2003**).

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils : mono-et sesquiterpènes.

-Les monoterpènes

Constituants les plus simples de la série, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités «isopréniques». Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α et γ -terpinène, p-cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus...). Les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules : alcools (géraniol, borniol...), phénols(thymol, aldéhydes(citronellal), cétones (carvone, β -vetivone), esters (Acétate de cédryle), éthers(1,8-cinéole) (**Bruneton, 1999**).

-Les sesquiterpènes

Un grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles. Biologiquement, bon nombre de structures sesquiterpéniques sont des phytoalexines, d'autres semblent agir comme des

régulateurs des croissances, d'autres enfin attirent les insectes ou agissent à l'encontre de ceux-ci comme des facteurs antinutritifs (**Bruneton, 1999**).

✓ **Les composés aromatiques**

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyles et des propénylphénols, parfois des aldéhydes.

On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en (C_6-C_1) comme la vanilline ou comme l'antranilate de méthyle (**Bekhechi et Abdelouahid, 2014**).

II-1-3-4- Répartition et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus...) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannellier, des bois (bois de rose...), des racines (vétiver), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscade).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon la localisation (**Bruneton, 1999**).

II-1-3-5- La différence entre les huiles essentielles et les huiles fixes :

Il est important de distinguer entre les huiles essentielles, les huiles fixes (huiles d'olive...) et les graisses contenues dans les végétaux. En effet :

- Seules les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et des graisses ;
- Elles se distinguent des huiles fixes par leurs compositions chimiques et leurs caractérisations physiques ;
- Elles sont fréquemment associées à d'autres substances comme les gommes et les résines.

D'ailleurs elles-mêmes à se résinifier par exposition à l'air (**Abdelouahid et Bekhechi, 2014**).

Chapitre N° 03

Activité

biologique

I-L'Activité antioxydant

I-1-Généralité

Les propriétés antioxydants des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant, le vieillissement cellulaire, et les maladies cardiovasculaires ou dégénérative (Wang et Mazza, 2002 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Sarni *et al.*, 2006). Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydants de ces composés naturels. (Fuhrman *et al.* , 1995). Les antioxydants naturels comme les composés phénoliques, et particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes peuvent empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant plus rapidement que ce dernier. Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électron souvent aromatiques (Vansant, 2004).

I-2-Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Smirnoff, 2005).

I-3-Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons nonappariés (Jacques et André., 2004). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la

molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

I-4-Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier, 2003). On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

I-4-1-Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avisar et al., 1989).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

I-4-2-Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels...etc. sont considérés comme des antioxydants. Les plus courants: La vitamine E ou α -tocophérol, La vitamine C ou acide ascorbique (Gardès-Albert et al., 2003).

I-5-Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH et peroxydes RO₂. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet ¹O₂, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert et al., 2003).

II-Activité antibactérienne

II-1-Généralité

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique (Ayachi, 2014).

II -2-Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

II-3-Description des souches bactériennes utilisées

✓ *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick *et al.*, 1988).

✓ *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (Patrick *et al.*, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven *et al.*,

2004). Les bactéries appartenant à l'espèce *Escherichia coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (**Patrick et al., 1988**).

✓ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de larg. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactérie possède un aspect de «vol mouche». *P.aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéroplastes. Elle est responsable de 10% de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3ème rang après *E.coli* et *S.aureus*, mais le 1 er rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires. (**Richard et Kiredjian, 1995**).

✓ *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis est un coccus Gram positif, en forme de bactérie d'acide lactique, avec ubiquity démontrée sur plusieurs sites anatomiques. *Enterococcus faecalis* isolats ont été isolés à partir d'échantillons cliniques comme agent étiologique chez les patients atteints d'infections manifestes et de sites du corps que l'on croyait être stérile mais absent des signes et des symptômes de l'infection. *E. faecalis* est impliquée dans la santé humaine et la maladie, reconnue comme un commensal, un probiotique et un opportuniste multiplient les agents pathogènes résistants. *E faecalis* est apparue comme clé pathogène dans les infections nosocomiales. *Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale vivant dans le tractus gastro-intestinal des humains (**Mack, 2014**).

Partie N°02

Etude

expérimentale

Chapitre N° 01
Matériels et
méthodes

I-Matériel végétal

I-1- Le modèle d'étude

Le genre *Hedysarum* appartient à la famille des Fabacées, Ce genre est représenté par plus de 170 espèces réparties à travers l'Europe tempérée, la région méditerranéenne, l'Ouest de l'Asie, la Sibérie et l'Amérique du Nord en allant de l'Arizona jusqu'au Canada et aux régions Arctiques, C'est une plante qui était utilisée autrefois en fourragère. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée par monsieur REBBAS Khellaf, enseignant de la faculté de sciences et de la vie, université de M'sila (Algérie).

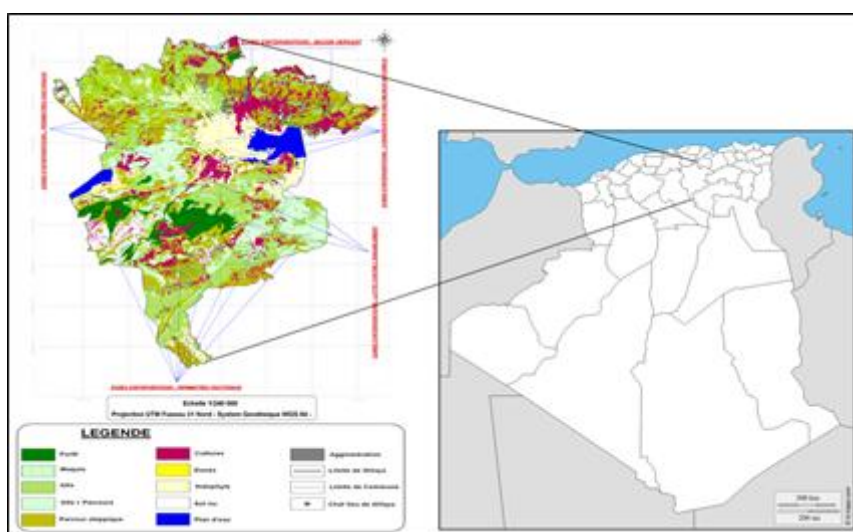


Figure 08: Localisation géographique de la wilaya de m'sila

(Conservation des forêts de M'sila. 2012)

I-2-La récolte

La plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *capitatum* a été collectée en février (les feuilles), et en mars (les fleurs) dans la région de pôle universitaire de M'sila, les feuilles a été séchée à l'ombre pendant quinze jours avant utilisation. Les fleurs ont été séchées à l'ombre pendant dix jours avant utilisation, les fleurs et les feuilles ont été concassées séparément finement en poudre par broyage dans un mortier traditionnel, Pulvérisées au broyeur puis soumises aux tests phytochimie et à différentes extractions.

II-Extraction

II-1- Macération

➤ Le principe

La macération est la méthode d'extraction la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec l'agitation de temps à autre, L'opération bien que généralement longue et rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles (**Leybros et Fremeaux, 1990**).

II-2- L'extraction des principes actifs

II-2-1- Préparation de l'extrait brut par extraction solide-liquide(ESL)

50 de poudre de fleurs et 100g de poudre de feuilles de la plante est macéré dans un solution contient de 70 ml de méthanol et 20ml d'eau distillé, pendant 48 heures, cet opération est répétée trois fois à température ambiante, l'extrait est ensuite filtré par papier filtre, puis évaporé sous pression réduite à sec, ($T=40^{\circ}\text{C}$) par un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200,).Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$, on obtenait donc de l'extrait hydrométhanolique brut (**EBr.Fel**) de la feuille et (**EBr.Flir**) de la fleur.



Figure09 : Rotavapeur de type BÜCHI-R -120

II-2-2- fractionnement de l'extrait hydrométanolique extraction liquide liquide(ELL)

L'extrait brut de la plante (EBr.Fel et EBr.Flr) est fractionné en utilisant une série de solvants à polarité croissante. Les extraits bruts sont initialement mélangés avec 50 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter, après la décantation (quelques heures), la phase d'acétate d'éthyle (organique) supérieur est récupérée, la phase aqueuse inférieure obtenue dépigmentée avec trois lavages successifs à l'acétate d'éthyle, et soumis à un autre fractionnement par le n-butanol, en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

Cette série d'extraction a permis d'obtenir quatre extraits organiques bruts: extrait d'acétate d'éthyle de la feuille (EAcOEt.Fel), extrait d'acétate d'éthyle de la fleur (EAcOEt.Flr), qui seront récupérés dans des boîtes pétries en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

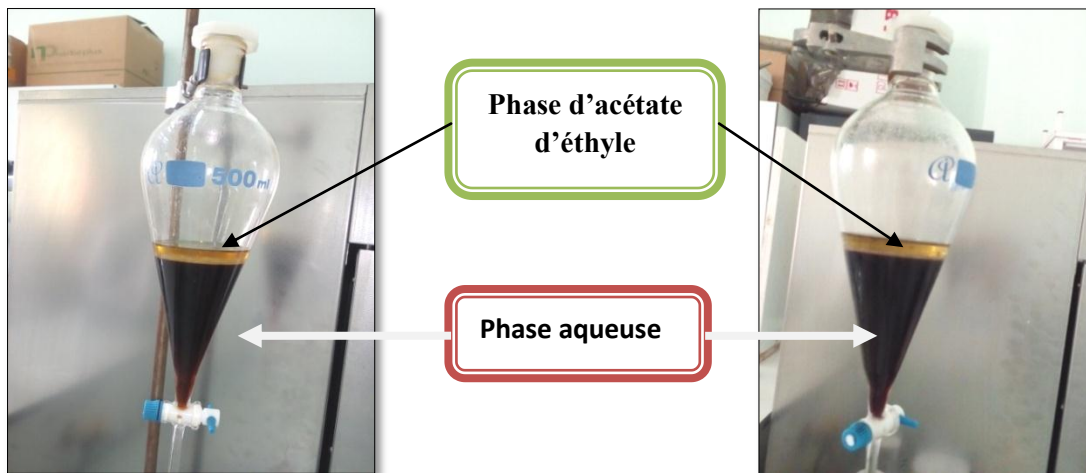


Figure10:Extraction liquide- liquide
Par l'acétate d'éthyle de feuille

Figure11 : Extraction liquide-liquide
Par l'acétate d'éthyle de la fleur

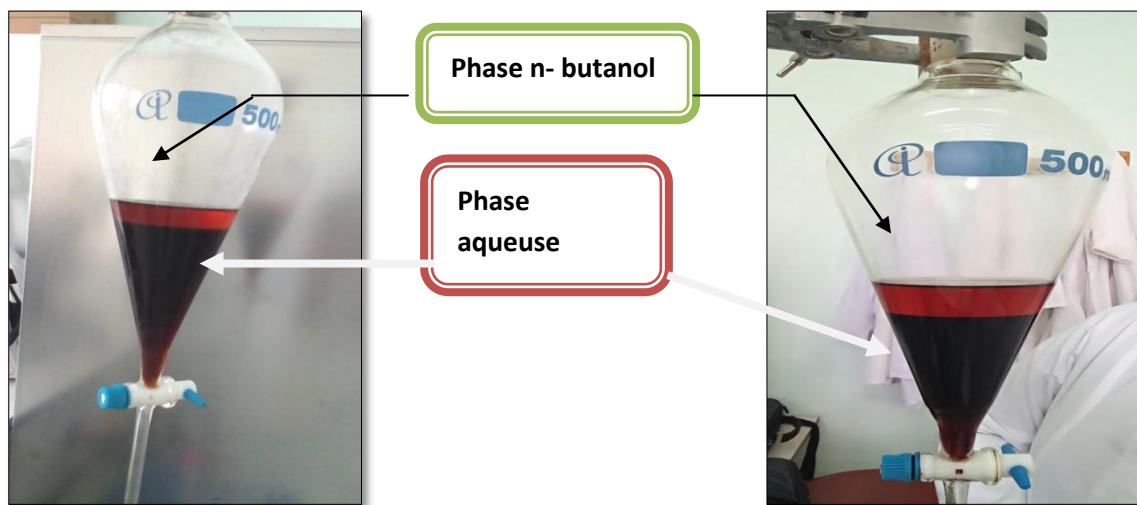


Figure12: Extraction liquide- liquide par
n-butanol de la feuille

Figur13 : Extraction liquide- liquide Par
n-butanol de la feuille

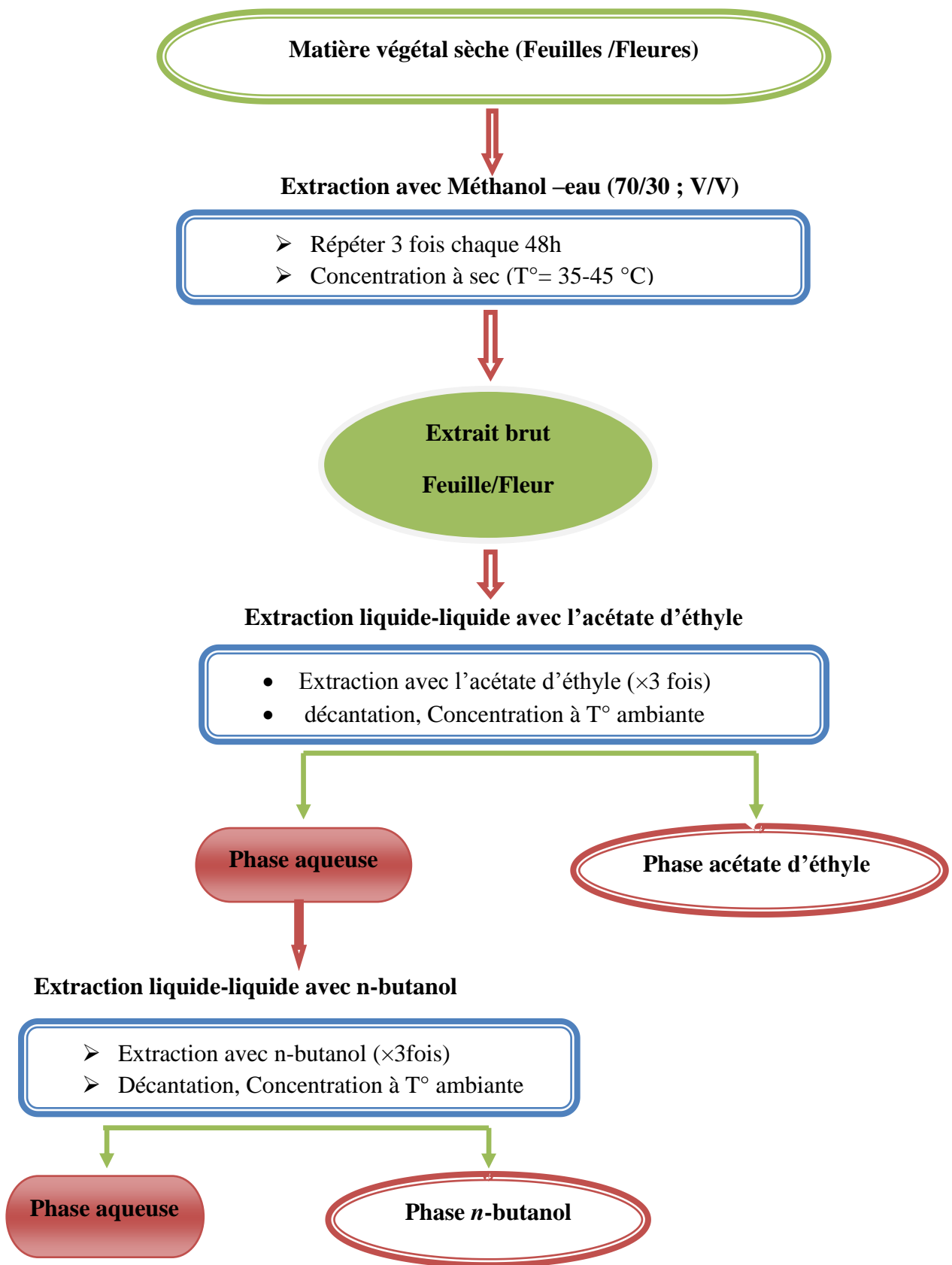


Figure14 : les étapes d'extraction des flavonoïdes

➤ **Calcul du rendement des extraits**

Le rendement de différents extraits obtenus a été déterminé en calculant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'acétate et celle de la matière végétale utilisée

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = (P1-P0)100/P$$

Avec ;

P= poids initial de l'échantillon(g) ;

P0 =poids de boîte pétri vide(g) ;

P1= poids de boîte pétri après évaporation totale(g).

Extraction des coumarines

1/Poser l'extrait brut de feuille dans un bécher, mesure le PH avec le PH-mètre, puis on ajoute quelques gouttes de NH_4OH jusqu'à l'obtention de PH basique (PH=9), poser l'extrait dans une ampoule à décanter, verser 30 ml de chloroforme et le laisser pendant 1jour, afin d'obtenir deux phases, phase organique(1) et phase aqueuse(1). Répéter cet étape 2fois.

2/ Diminuer le PH de phase aqueuse(1) jusqu'à l'obtention de PH acide (PH=2) par l'Hcl diluer(5.6%), répéter les mêmes opérations de 1^{er} pas. Pour obtenir deux phases, phase organique(2) et phase aqueuse(2).

Les coumarines a été porter dans la phase organique (2).

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait brut de feuilles par l'extrait brut de fleurs.

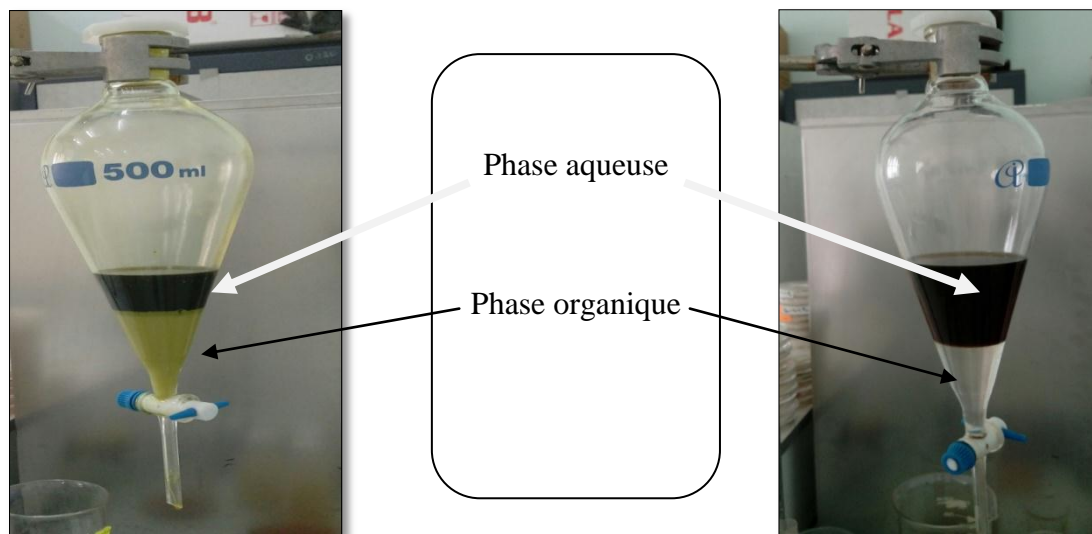


Figure15 : extraction des coumarines de la fleur

Figure16 : extraction des coumarines de la feuille

L'extraction de l'huile essentielle

Les huiles essentielles de plante étudiée ont été extraites par hydro distillation par un appareil du type Clevenger. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau distillée portée à ébullition, La vapeur saturée d'huiles essentielles traverse vers un serpentin ou elle se condense pour donner deux produits : l'eau florale et l'huile essentielle.

Avant le commencer de l'extraction, l'appareil a été nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée pour éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Les fleurs et les feuilles sèches(100g)ont été mises dans une fiole de 1000ml qui fut remplie avec 500ml d'eau distillée ; la fiole avec son contenu a été mise sur le chauffe-ballon. Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans la fiole sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie la fiole avec le réfrigérant. Une fois arrivées dans le réfrigérant, elles se condensent rapidement et se retrouvent dans l'ampoule à décantation qui permet la séparation immédiate de l'essence par sa densité. Après 3 heures d'extraction, l'huile essentielle a été recueillie dans un petit flacon en verre hermétique et recouvert de papier aluminium pour le protéger de la lumière et conservée à 4°C.

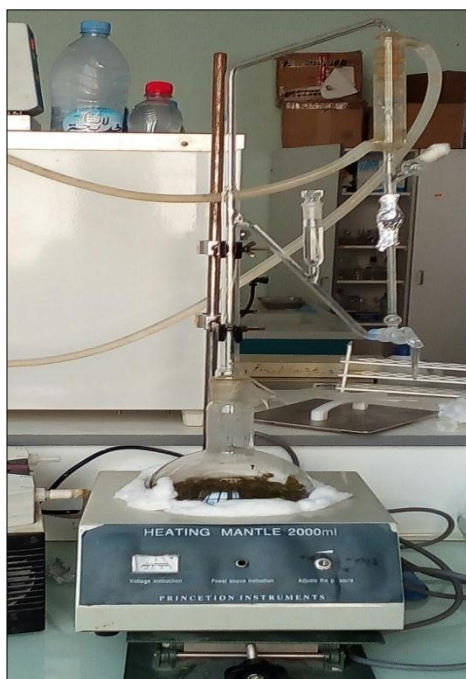


Figure 17: Appareil d'hydrodistillation de type de clevenger.

Conservation de l'huile essentielle obtenue

Les huiles essentielles ont conservé à une température voisine 4C°, dans un flacon en verre hermétique fermé pour la préserver de l'air et de la lumière

Calcul du rendement de l'huile essentielle

$$\text{RHE (\%)} = M_1 / M_0 \times 100$$

Avec ;

RHE :rendement en l'huile essentielle de la feuille et de la fleur ;

M₁ : masse des huiles essentielles en recueilli en (g) ;

M₀ :masse de matière végétale utilisée en (g).

Analyses qualitatives de *Hedysarum spinosissimum*

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols, flavonoïdes) dans nos extraits.

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM, TLC en anglais) nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les différentes classes de composés contenus dans les extraits testés.

Principe :

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile (**Braith waite et Smith, 1999**).

Préparation des plaques CCM

Les plaques utilisées sont des plaques en gel de silice de type silica gel 60F254 de 0.25mm d'épaisseur, déposées sur feuille d'aluminium. Ces plaques sont découpées selon les dimensions : 2.5cm de large, de 10cm de long.

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques, quatre Systèmes Ont été essayés pour les meilleures séparations des extraits de la plante *Hedysarum spinosissimum*

Tableau 01: les différents Systèmes utilisés pour la CCM de gel de silice.

Systèmes solvants	N°	Proportion	Référence
Chloroforme/acétate d'éthyle	01	(8 ; 2, V/V)	(Belkassam, 2009)
Chloroforme/Méthanol	02	(9 ; 1, V/V)	
Chloroforme/Méthanol	03	(7 ; 3 V/V)	
Méthanol/acétate d'éthyle/hexane	04	(7 ; 4 ; 0.5, V/V)	

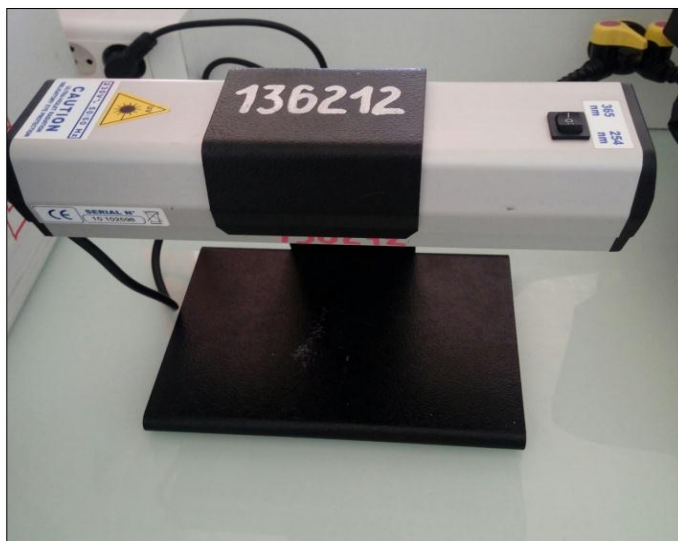


Figure18 : Appareil de l'Ultra-violet

Test des activités biologiques

Activité antioxydant

Test au DPPH

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

Principe

Le DPPH est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où $(\text{AH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (Brand-Williams *et al.*, 1995).

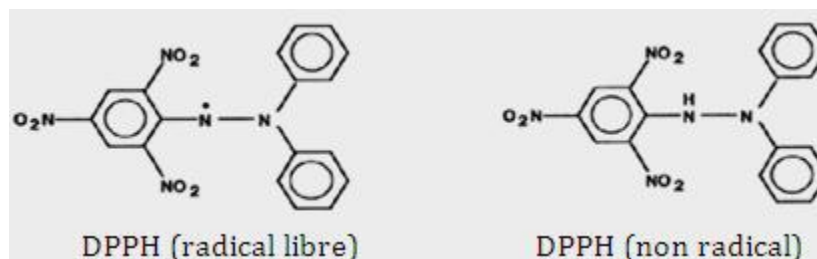


Figure19 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams et al, 1995).

Mise en œuvre pratique

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,4 mM est mélangée avec différentes concentrations des extraits de *H. spinosissimum* (10,25,50,100µg/ml) ;Mettre (2,5,10,20 µl) respectivement de chaque dilution de ces extraits dans un tube, ajouter le méthanol (38,35,30,20 µl, ajouter 160µl de solution méthanolique de DPPH, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 160 µl de la solutionm éthanolique de DPPH et 40µl de méthanol.

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait de *H. spinosissimum* par un antioxydant standard: le BHT (control positif) .

La longueur d'onde d'absorption a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm par un spectrophotomètre.

Toutes les opérations sont réalisées en duplicata.

Expression des résultats

$$\text{Inhibition}\% = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{control}}$$

Tels que :

Abs_{control} : Absorbance du control négatif à la longueur d'onde 517 nm ;

Abs_{test} : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517 nm.

Les résultats sont la moyenne de deux mesures séparées ± écart type.

➤ **Calcul des IC₅₀:**

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (*Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (**Torres et al, 2006**).

Pour la comparaison de l'activité, l'hydroxytoluène butylée (BHT) a été utilisés comme antioxydants aux mêmes conditions expérimentales.



Figure20 : l'appareil de spectrophotomètre

Activité antibactérienne

Evaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu gélosé se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'extrait. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé (**Bssaibis et al, 2009**).

Principe

Elle consiste en l'identification d'une substance agissant sur un microorganisme ainsi que la détermination de la concentration minimale inhibitrice nécessaire de cette substance qui détruit le microorganisme. Les extraits sont déposés sur des disques de papier qui sont déposés sur la gélose en boîte de pétrie. Après incubation de 24 heures à

l'étuve à 37 °C et les zones d'activités apparaissent sur le fond opaque de la gélose (Madjour, 2014).

Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests font parties de microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants.

Les microorganismes testés proviennent de laboratoire de Microbiologie de l'université de M'sila. Ils correspondent aux espèces suivantes:

Tableau02 : Les souches microbiennes

Etat frais	Souches	codes	Gram
Bacille	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	
Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	positif
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	

Application

Préparation du milieu de culture : Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète (obtention d'une solution limpide). Puis, on ajuste le PH au 7,4. Puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boites de pétri à 4 mm de hauteur et laisser quelques minutes jusqu'à la solidification.

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de plantes.

Préparation des disques : Des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, Ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et conserver jusqu'à l'utilisation.

Préparation des dilutions d'extraits de *H. spinosissimum* : Les extraits de *H. spinosissimum* ont été dissous dans le DMSO avec des dilutions successives au demi pour avoir quatre concentrations à C1=1/2, C2=1/4, C3=1/8, C4=1/16.

Préparation de l'inoculum : Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est très fort.

Ensemencement et dépôt des disques : La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzène et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage de 100µl de suspension bactérienne sur toute la surface gélosée.

Les disques imprégnés d'extraits sont disposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile au bec benzène. En effet de chaque dilution on prélève 10µl et on la met dans les disques.

Pour le contrôle négatif (témoin) on met une 5^{ème} disque chargé de 10 µl de DMSO.

Finalement, les boîtes de pétri sont incubées à l'incubateur pendant 18 à 24 heures à 37°C.

Lecture des antibiogrammes : La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques l'aide d'une règle en (mm).

Chapitre N° 02
Résultats et
discussions

I-Evaluation des techniques d'extraction

I-1-Extraction des polyphénols

I-1-1-Rendement des extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans nos plantes nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle et n-butanol), les coumarines. Les valeurs obtenues sont représentées dans l'histogramme suivant :

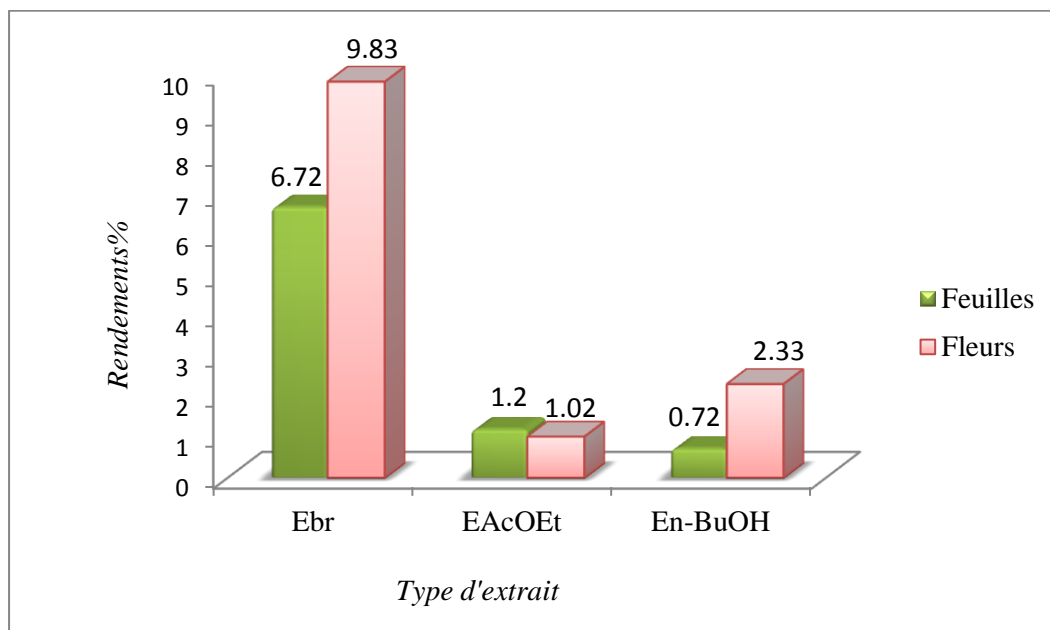


Figure 21: Rendement des différents extraits de l'espèce *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum*

Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits des feuilles et des fleurs sont plus ou moins variables.

Le rendement trouvé dans l'extraction est plus important dans l'extrait méthanolique brut des feuilles et des fleurs par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle et n-butanol, l'ordre du rendement comme suite : Ebr.Fl(9.83%), Ebr.Fel(6.72%), EAcOEt.Fel(1.2%), EAcOEt.Fl(1.02%), En-BuOH.Fl(2.33%), En-BuOH.Fel(0.72%).

Les résultats Ebr.Fl(9.83%), sont plus proche que les résultats de *Stylosanthes mucronata* de la partie supérieure Macéré 9,78 trouvé par **Sanago(2008)**. Qui a le protocole d'extraction éthanoliques obtenant à partir 100g .

Les résultats obtenus trouvés par **Muanda(2010)** du rendement d'extraction méthanolique des composés phénoliques de feuille de *Daniella Oliveri* est (13.6%) de l'extrait MeOH/H₂O(30%),et(20%) de l'extrait MeOH/H₂O(70%), qui sont plus élevées par rapport notre rendement Les résultats obtenus trouvés par **Muanda(2010)** de le rendement d'extraction méthanolique des composés phénoliques des feuilles de *Desmodium Adscendens* est (32.1%) de l'extrait MeOH/H₂O(30%),et(40.6%) de l'extrait MeOH/H₂O(70%),qui sont trop élevées par rapport notre rendement.

I-2-Extraction des huiles essentielles

Il existe différents procédés d'extraction (distillation, solvants volatils, expression à froid et CO₂ supercritique) mais, pour l'aromathérapie, seuls quelques-uns assurent une bonne qualité finale. L'obtention des huiles essentielles se fait généralement soit par hydrodistillation, soit par expression à froid (zestes).

Dans notre cas, les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation en utilisant un appareil de cleverger

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$\text{RHE (\%)} = M_1 / M_0 \times 100$$

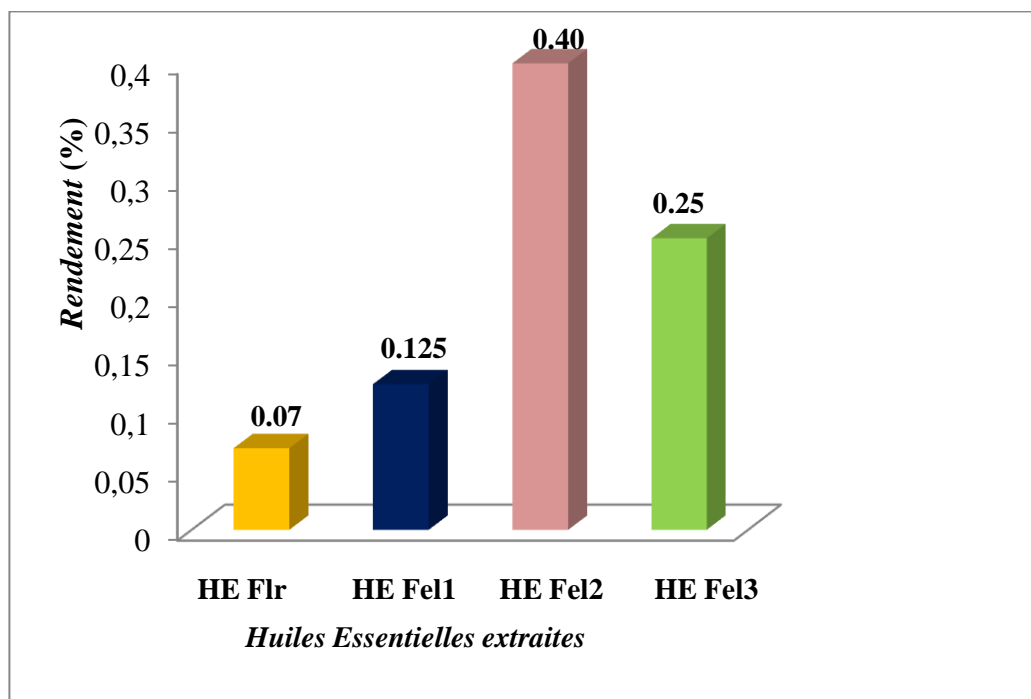


Figure 22 : Rendement des huiles essentielles de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

HE Flr : Huile essentielle extraite de fleurs dans notre étude;

HE Fel1: Huile essentielle extraite de feuilles dans notre étude;

HE Fel2 : Huile essentielle extraite de feuilles par **Muanda (2010)**;

HE Fel3: Huile essentielle extraite de feuilles par **Muanda (2010)**.

D'après les résultats trouvés par **Muanda (2010)**, dans *D. oliveri* le rendement d'HE est 0.40% et dans *D. adscendens* est 0.25%, donc notre rendement est faible que le rendement de deux espèces.

I-3-Extraction des coumarines

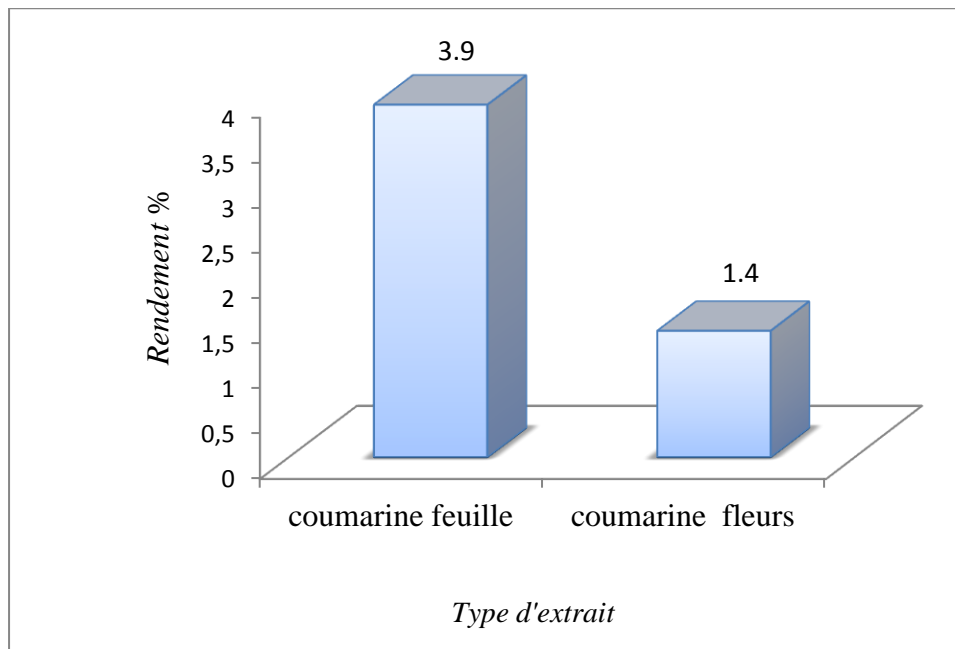


Figure 23: Rendement des coumarines de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

Les résultats obtenus de notre travail indiquent que les extraits des coumarines de deux parties (Fel et Flr) ont été exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait de coumarine de feuille qui est (3.9%) qui est celui de celui avec l'extrait de coumarine des fleurs qui est (1.4%)

II-Analyse quantitatives des extraits

II-1- Chromatographie sur couche mince

Pour un essai d'analyse qualitative de contenu phénolique de nos différents extraits (EBr,EAcOH ,En-BuOH) de la fleur et de la feuille de la plante de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* . On a utilisé Chromatographie sur couche mince (CCM), puisqu'elle est l'une des méthodes habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétale, et qui est simple à mettre en œuvre. On a utilisé quatre systèmes d'élution de polarité différente.

Les résultats expérimentaux mentionnés dans les figures et les tableaux suivants montrent la présence des composés phénoliques dans la feuille et dans la fleur.

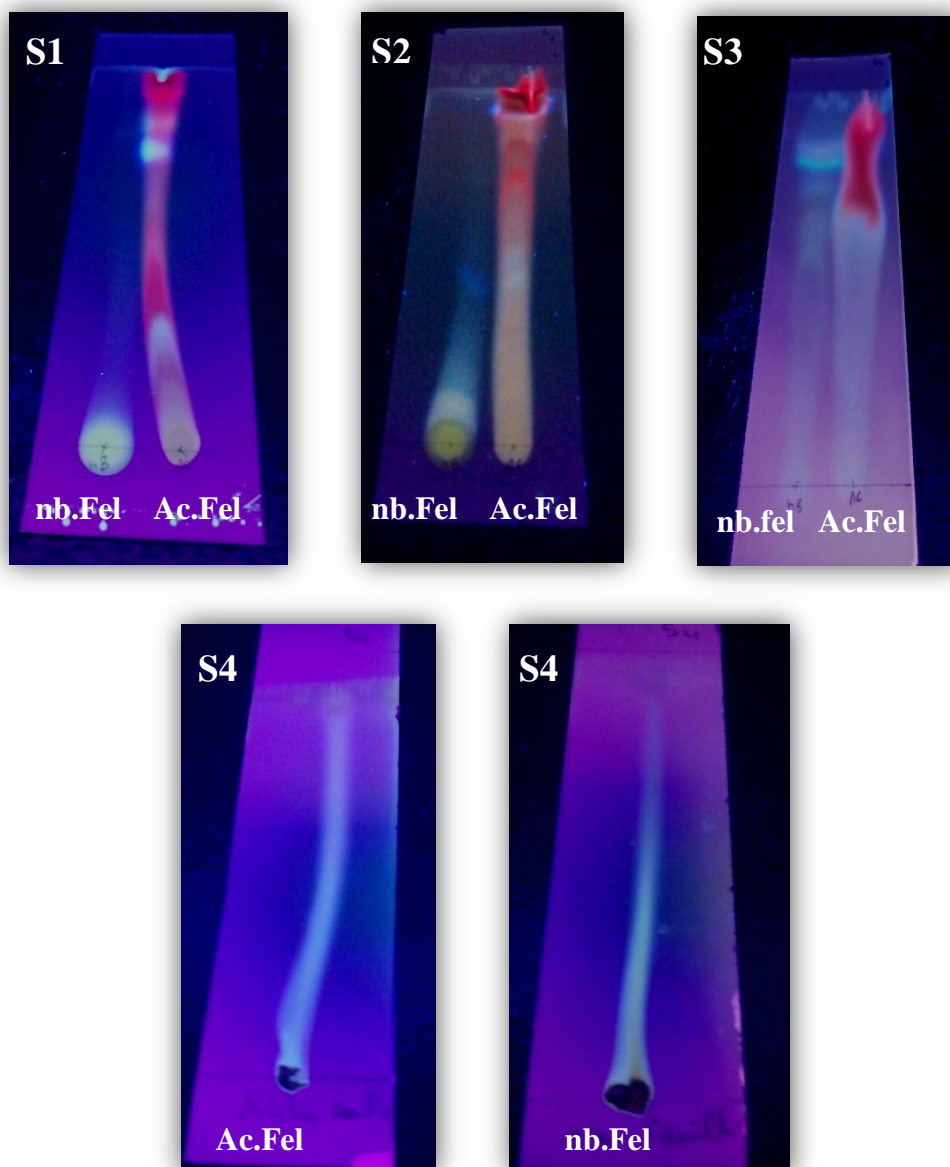


Figure 24 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des feuilles de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants) .

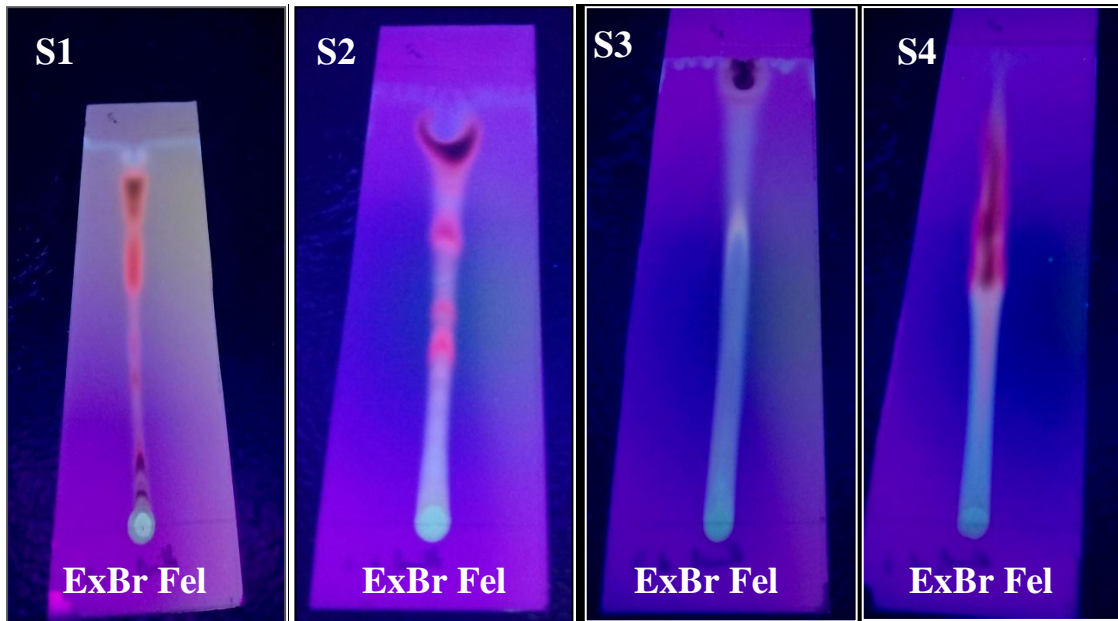


Figure 25: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des extraits brutes des feuilles de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants).

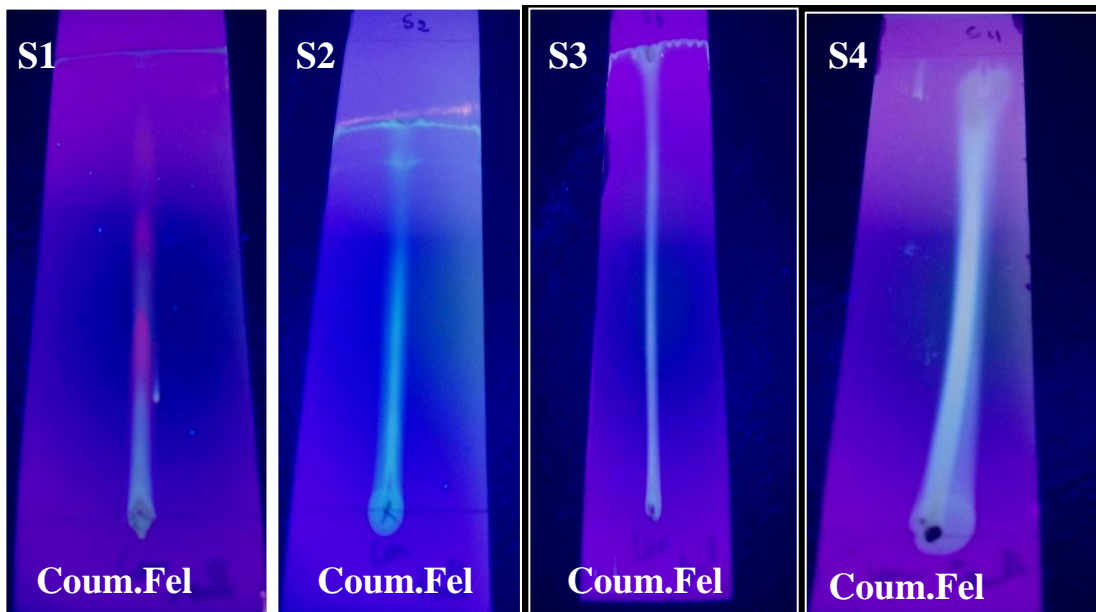


Figure 26: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des coumarines des feuilles de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants).

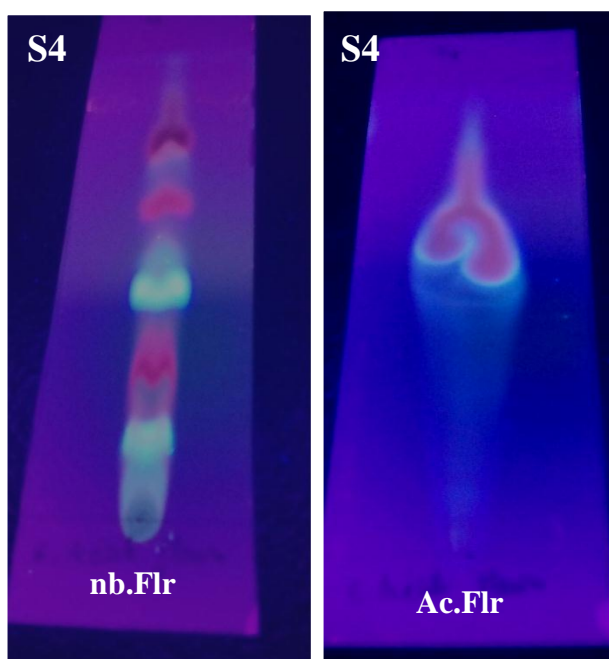
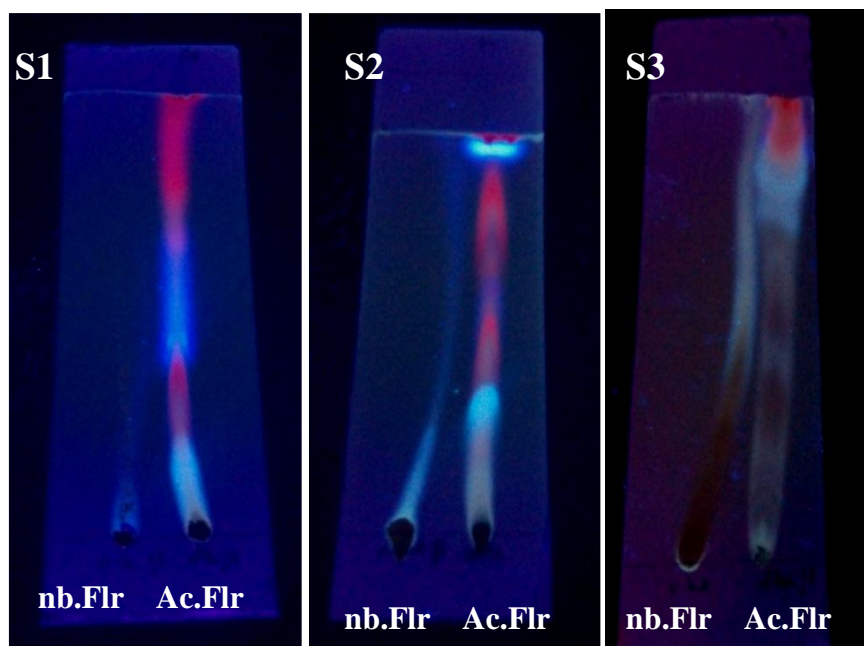


Figure 27 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des AcOEt et n-buOH des fleurs de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants).

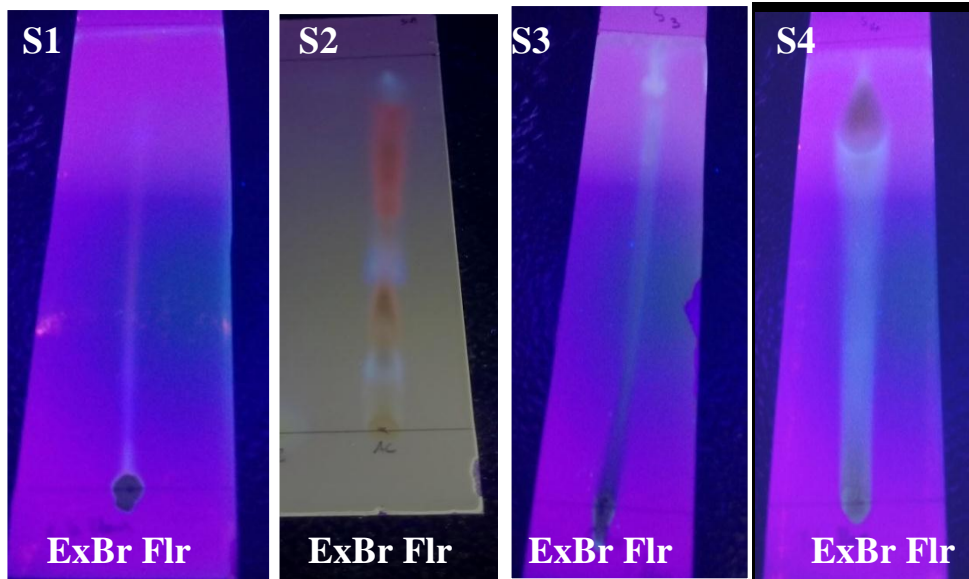


Figure 28 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des extraits brutes des fleurs de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants).

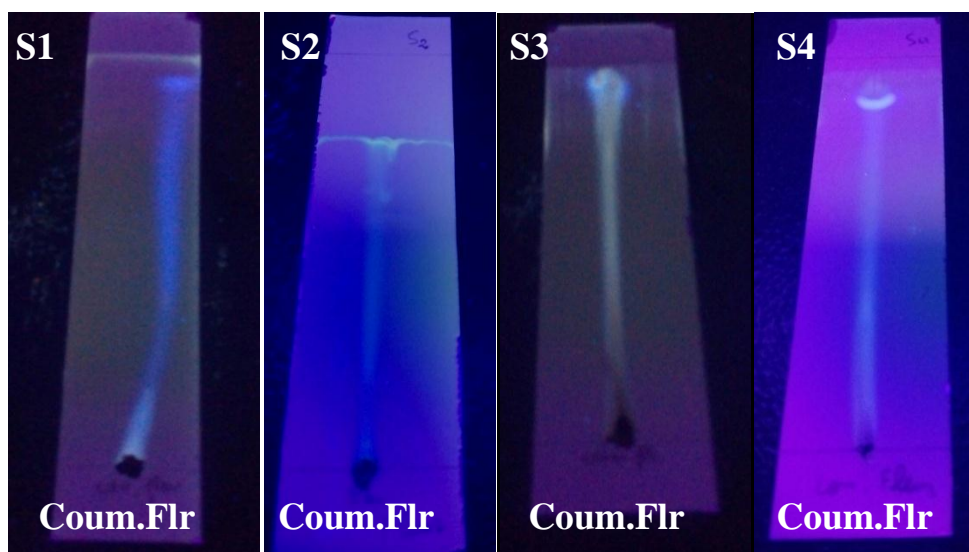


Figure 29: Chromatogramme résultant de la CCM des fractions des coumarines des fleurs de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* (04 systèmes de solvants).

Tableau 03 : Les Rf et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait d'acétate d'éthyle de plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*.

N° des systèmes de solvants	Extrait d'acétate d'éthyle					
	Feuilles			Fleurs		
	N° des spots	Couleur des spots	RF	N° des spots	Couleur des spots	RF
01	01	Jaune foncée	0.06	01	Jaune claire	0.05
	02	Marron claire	0.18	02	Bleu fluorescent	0.15
	03	Rouge claire	0.32	03	rose	0.22
	04	Rose claire	0.57	04	rouge	0.28
	05	Mauve claire	0.65	05	Bleu fluorescent	0.5
	06	Rose claire	0.71	06	rose	0.57
	07	Rouge claire	0.84	07	rouge foncée	0.79
	08	Rouge foncée	0.95	-	-	-
02	01	Jaune claire	0.35	01	Jaune claire	0.20
	02	Blue claire	0.43	02	Bleu fluorescent	0.32
	03	Rose claire	0.60	03	Rose	0.44
	04	Rouge claire	0.65	04	Rouge	0.53
	05	Marron	0.75	05	Rose	0.73
	06	Rose claire	0.83	06	Rouge	0.90
	07	Marron foncée	0.89	07	Bleu fluorescent	0.94
	08	Rouge foncée	0.97	08	Rouge foncée	0.95
03	01	Jaune claire	0.13	01	Jaune claire	0.07
	02	Blue claire	0.60	02	Marron claire	0.18
	03	Jaune claire	0.66	03	Jaune	0.25
	04	Marron foncée	0.70	04	Marron claire	0.57
	05	Rouge claire	0.97	05	Blue	0.75
	-	-	-	06	Rouge claire	0.91
	-	-	-	07	Rouge foncée	0.94
04	01	Jaune claire	0.08	01	Vert claire	0.48
	02	Bleu claire	0.69	02	Rouge	0.86
	03	Rose	0.87	03	jaune	0.96
	04	rouge	0.95	-	-	-

Dans le système de solvant N°01 : Chloroforme /Acétate d'éthyle (8/2), le nombre des spots dans la fraction d'acétate d'éthyle de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* est semblable dans les feuilles et dans les fleurs, avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Dans le système de solvant N°02 : Chloroforme/Méthanol (9/1), le nombre des spots dans la fraction d'acétate d'éthyle de *Hedysarum spinosissimum.ssp capitatum* sont égales dans les feuilles et dans les fleurs, avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Dans le système de solvant N°03 : Chloroforme/Méthanol (7/3), les fleurs sont riches en composés phénoliques (7spots), que les feuilles (5spots), avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Dans le système de solvant N°04 : Méthanol/ Acétate d'éthyle/Hexane (7/4/0,5), le nombre des spots est semblable dans les feuilles et dans les fleurs, avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Tableau 04 : Les Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait *n*-Butanol de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

N°des systèmes de solvants	Extrait <i>n</i> -Butanol					
	Feuilles			Fleurs		
	N°des spots	Couleur des spots	RF	N°des spots	Couleur des spots	RF
01	01	Jaune foncée	0.06	01	Bleu fluorescent	0.07
	02	Bleu claire	0.13	02	Marron claire	0.49
02	01	Jaune foncée	0.06	01	Jaune claire	0.08
	02	Jaune claire	0.12	02	Blue fluorescent	0.22
	03	Blue fluorescent	0.22	03	Blue claire	0.89
	04	Marron claire	0.38	-	-	-
03	01	Jaune	0.06	01	Marron foncée	0.40
	02	Jaune claire	0.41	02	Jaune claire	0.96
	03	Blue fluorescent	0.65	03	-	-
	04	Jaune claire	0.73	-	-	-
	05	Marron claire	0.80	-	-	-
	06	Jaune marron claire	0.93	-	-	-
04	01	Jaune claire	0.41	01	Marron	0.39
	02	Bleu fluorescent	0.87	02	jaune	0.94

Dans le système de solvant N°01 : Chloroforme /Acétate d'éthyle (8/2), et dans le système de solvant N°04 : Méthanol/ Acétate d'éthyle/Hexane (7/4/0,5), le nombre des spots dans la fraction de *n*-butanol de *Hedysarum spinosissimum*.ssp *capitatum* est égale dans les feuilles et dans les fleurs, avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Dans le système de solvant N°02 : Chloroforme/Méthanol (9/1), le nombre des spots est semblable dans les feuilles et dans les fleurs, avec variabilité des Rf et de différents couleurs.

Les feuilles donnent une meilleure séparation des composés phénoliques dans le système de solvant N°03: Chloroforme/Méthanol (7/3), où le nombre des spots est supérieur (6spots), que les fleurs (3spots).

Tableau 05: Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans l'extrait brut de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

N°des systèmes de solvants	Extrait brut					
	Feuilles			Fleurs		
	N°des spots	Couleur des spots	RF	N°des spots	Couleur des spots	RF
01	01	Jaune claire	0.03	01	Blue fluorescent	0.27
	02	Rose claire	0.06	02	Rose claire	0.31
	03	Rose	0.09	03	Blue fluorescent	0.73
	04	Rouge	0.12	04	Rose claire	0.94
	05	Rose	0.15	05	Rouge	0.98
	06	Rose claire	0.26	-	-	-
	07	Rouge	0.46	-	-	-
	08	Blue fluorescent	0.93	-	-	-
02	01	Jaune claire	0.32	01	Jaune claire	0.94
	02	Rouge	0.41	02	Bleu claire	0.96
	03	Rose	0.53	-	-	-
	04	Rouge	0.85	-	-	-
	05	Blue fluorescent	0.96	-	-	-
03	01	Jaune	0.50	01	Marron	0.16
	02	Jane foncée	0.58	02	Bleu	0.82
	03	Bleu	0.83	03	marron claire	0.96
	04	Rouge	0.95	-	-	-
04	01	Jaune claire	0.18	01	Jaune foncée	0.12
	02	Rose	0.40	02	Jaune claire	0.70
	03	Rouge	0.81	03	Marron	0.88
	04	rose	0.97	04	Blue fluorescent	0.94

Les feuilles donnent une meilleure séparation des composés phénoliques dans le système de solvant N°01: Chloroforme /Acétate d'éthyle (8/2) où le nombre des spots est supérieur (8spots), que les fleurs (5spots).et dans le système de solvant N°02 : Chloroforme/Méthanol (9/1), où le nombre des spots est supérieur (5spots), que les fleurs (2spots).

Dans le système de solvant N°03: Chloroforme/Méthanol (7/3), le nombre des spots est semblable dans les feuilles et dans les fleurs.

Dans le système de solvant N°04 : Méthanol/ Acétate d'éthyle/Hexane (7/4/0,5), le nombre des spots est égale dans les feuilles et dans les fleurs.

Tableau 06 : Rfs et les couleurs des spots obtenus dans les quatre systèmes par CCM dans les coumarines de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

N° des systèmes de solvants	Extrait des coumarines					
	Feuilles			Fleurs		
	N° des spots	Couleur des spots	RF	N° des spots	Couleur des spots	RF
01	01	Jaune claire	0.19	01	Marron claire	0.32
	02	Rouge	0.36	02	Jaune claire	0.90
	03	Rose	0.47	03	Bleu fluorescent	0.96
	04	rouge	0.58	-	-	-
	05	rose	0.63	-	-	-
	06	rouge	0.79	-	-	-
	07	bleu Claire	0.94	-	-	-
02	01	Jaune claire	0.11	01	Jaune claire	0.22
	02	Bleu claire	0.85	02	Bleu fluorescent	0.97
	03	Bleu fluorescent	0.93	-	-	-
03	01	Jaune	0.10	01	Jaune claire	0.06
	02	Bleu claire	0.93	02	Bleu fluorescent	0.73
	03	rouge	0.96	-	-	-
04	01	Jaune	0.78	01	Jaune	0.78
	02	rouge	0.95	02	Bleu fluorescent	0.94

Dans le système de solvant N°02 : Chloroforme/Méthanol (9/1), et le système N°03: Chloroforme/Méthanol (7/3), le nombre des spots est semblable dans les feuilles et dans les fleurs.

Les feuilles donnent une meilleure séparation des composés phénoliques dans le système de solvant N°01: Chloroforme /Acétate d'éthyle (8/2) où le nombre des spots est supérieur (7spots), que les fleurs (3spots)

III-Résultats des tests biologiques

III-1-Activités antioxydant

➤ **Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* par la méthode de DPPH :**

L'activité antioxydant des différents extraits et de l'huiles essentielles *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droites dont les équations sont les suivantes :

Extrait méthanolique brute :

Feuilles : $y=0.328x+44.30$ $R^2=0.838$

Fleurs : $y=0.259x+45.77$ $R^2=0.899$

Extrait d'acétate d'éthyle :

Feuilles : $y=0.409x+49.96$ $R^2=0.83$

Fleurs : $y=0.490x+48.36$ $R^2=0.705$

Extrait de *n*-butanolique :

Feuilles : $y=0.350x+49.25$ $R^2=0.804$

Fleurs : $y=0.345x+46.53$ $R^2=0.918$

Extrait des coumarines :

Feuilles : $y=0.163x+3.757$ $R^2=0.842$

Fleurs : $y=0.700x+2.205$ $R^2=0.944$

Huiles essentielles :

Feuilles : $y=0.747x+6.583$ $R^2=0.784$

Fleurs : $y=0.52x+8.008$ $R^2=0.858$

BHT :

Feuilles : $y=0.619x+8.67$ $R^2=0.943$

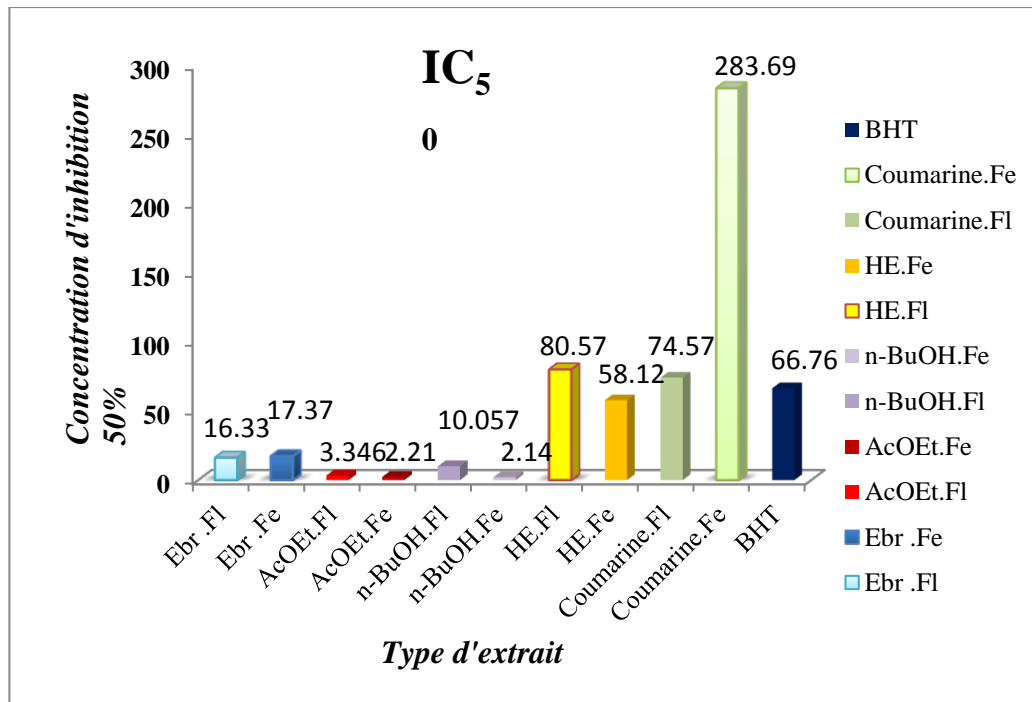


Figure 30: Représentation de l’Inhibition du radical DPPH par l’estimation des valeurs d’IC₅₀ des différents extraits de *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*.

L’activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en IC₅₀. La figure N°29 montre que une comparaison générale déduite sous forme d’histogrammes des résultats obtenus pour tous les extraits des deux parties (feuilles et fleurs) de la plante étudiée et ceux du l’antioxydant standard BHA qui montré une activité antioxydant puissante avec une IC₅₀ de l’ordre de (66.76 µg/ml).

L’analyse des résultats d’IC₅₀ de nos extraits, montre que l’extrait de n-butanol et l’extrait d’acétate d’éthyle des feuilles de *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*. Indiquant une meilleure activité antioxydant que celles des fleurs avec IC₅₀ (2.14 µg/ml) et (2.21 µg/ml), respectivement et (10.057 µg/ml) et (3.346 µg/ml) de celle des fleurs respectivement.

Par contre l’extrait brut des fleurs montre la meilleure activité avec une IC₅₀ (16.33 µg/ml) par apport des feuilles qui est (17.37 µg/ml).

Les huiles essentielles des fleurs de notre plante a une activité antioxydant faible que celle des feuilles avec IC₅₀ (80.57 µg/ml) et (58.12 µg/ml).

On constate que les coumarines des feuilles et des fleurs de la plante étudiée présente une activité plus faible que les différents extraits. Avec IC₅₀ (283.69 µg/ml) et (74.57 µg/ml).

Ce dernier résultats est similaire de celui acquis par **Muanda (2010)**, qui remarque que les valeurs des IC₅₀ des extraits étudiés varient entre (2.7µg/ml et 10.2 µg /ml). Pour les feuilles de *Daniella oliveri* qui possédant des propriétés antioxydant intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de IC₅₀. Il est trouve aussi une activité de balayage des radicaux élevée avec IC₅₀ (4µg/ml) pour les feuilles de *Desmodium adscendens*.

III-2-L'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* a été réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide, Muller Hinton Agar. Cet a permis de déterminer l'action des extraits de la plante dissouts dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures et les tableaux ci-dessous :

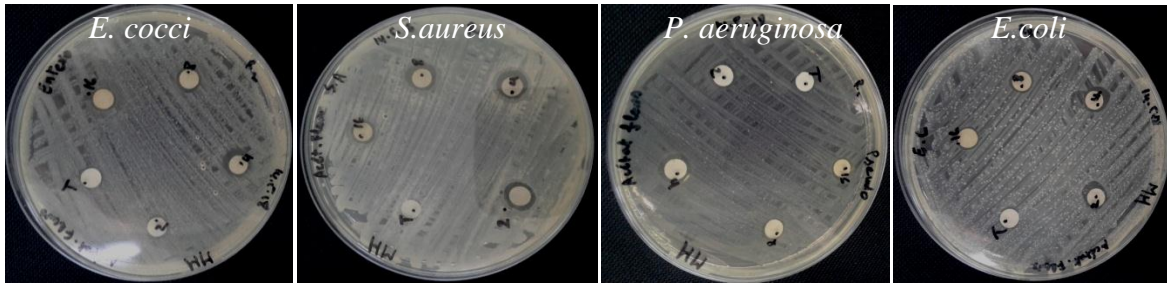


Figure 31: l'effet de l'acétate d'éthyle de la fleur de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits

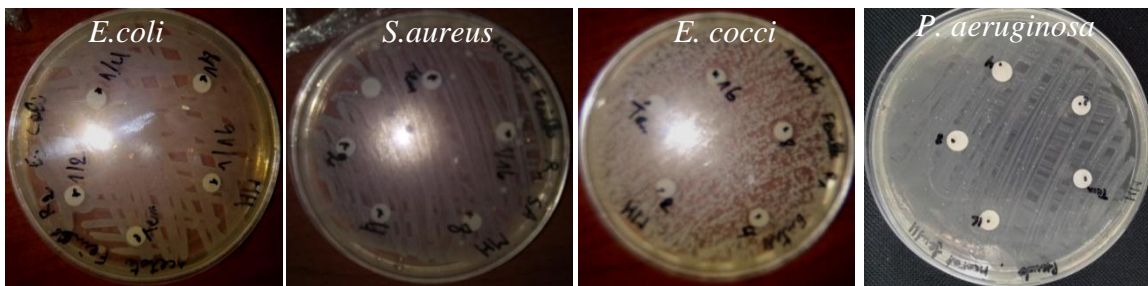


Figure 32 : l'effet de l'acétate d'éthyle de la feuille de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits

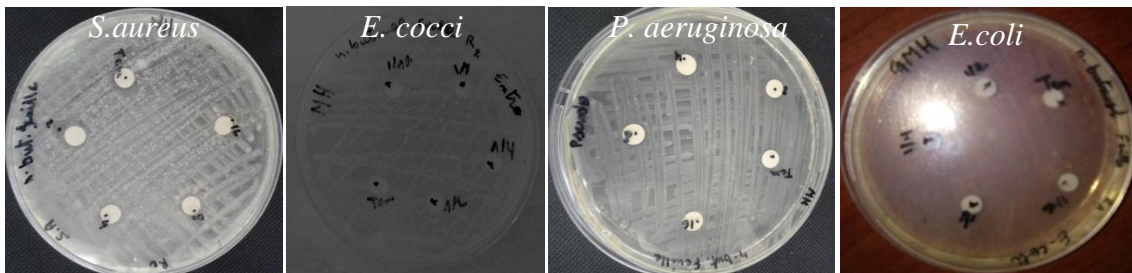


Figure 33: l'effet de n-butanol de la feuille de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits

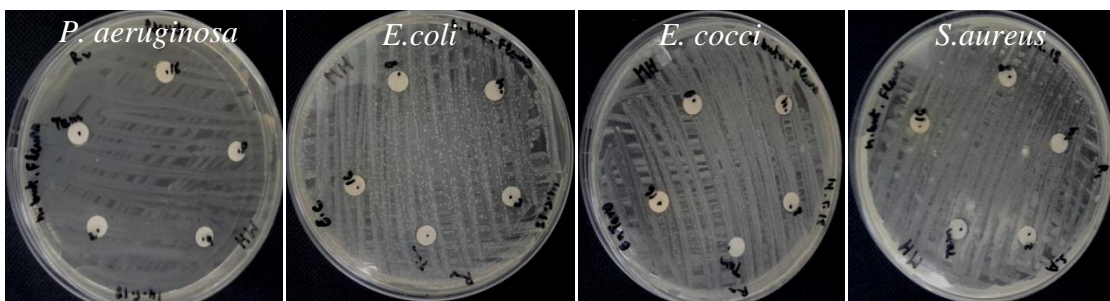


Figure 34: l'effet de n-butanol de la fleur de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.

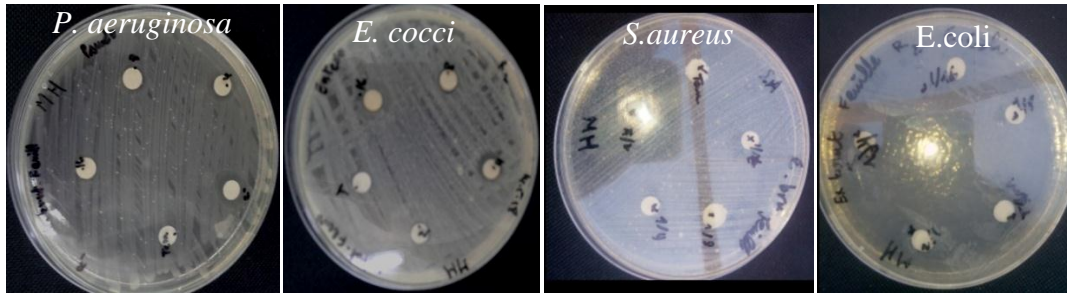


Figure 35: l'effet d'extrait brut de la feuille de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.

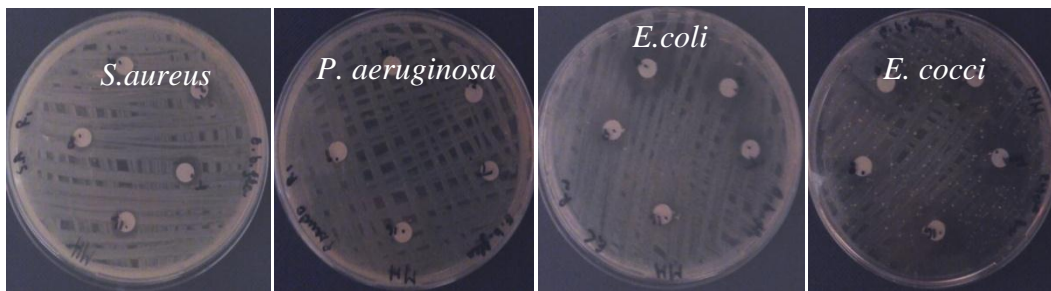


Figure 36: l'effet d'extrait brut de la fleur de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.

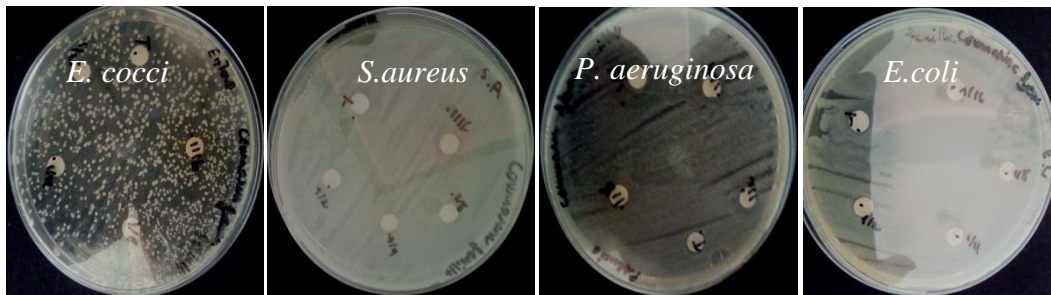


Figure 37: l'effet de coumarine de la feuille de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.

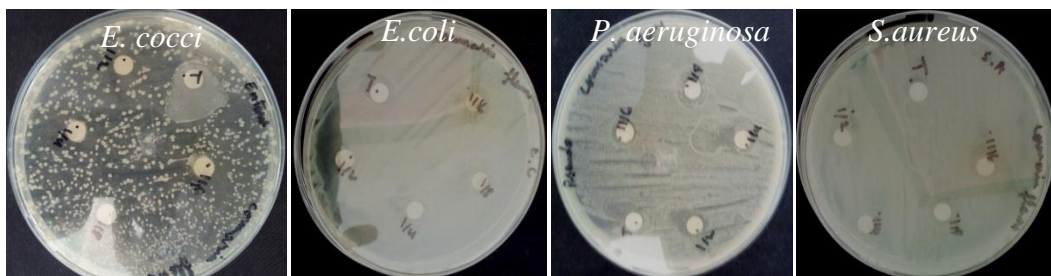


Figure 38: l'effet de coumarine de la fleur de *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Sur les souches bactériennes testées en présence de différentes concentrations d'extraits.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolise par des signes d'après la sensibilité des souches des polyphénols :

Non sensible(-) ou résistante : diamètre <8 mm ;

Sensible(+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm ;

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm ;

Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20 mm (**Madjour, 2014**).

Tableau 07: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait brute de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

Partie Souches	Feuilles					Fleurs				
	Les dilutions de l'EBr du <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>									
	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité
<i>E. coli</i>	7	8	8	9	+	15	16	13	10	++
<i>S. aureus</i>	7	8	9	10	+	13	10	12	10	+
<i>P. aeruginosa</i>	10	7	6	9	+	7	8	7	6	+
<i>E. cocci</i>	8	11	11	13	+	16	15	14	15	++

Les résultats obtenus dans le tableau 07 et les figures 33 ; 34 montrent que : l'activité antimicrobienne est remarqué dans l'extrait brute est remarqué des fleurs et des feuilles de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum* vis-à-vis les quatre souches (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*), avec un diamètre de zone d'inhibition varié de 6à 16mm.

Le pouvoir antibactérienne le plus élevé de l'extrait brute est observé chez les fleurs : pour *E. coli* dans les faibles concentrations 2 et 4 avec une zone d'inhibition de 15mm et16mm et 13mm, 10mm pour les concentrations 8 et 16 respectivement.

Pour *E. faecalis* une zone d'inhibition compris de 16mm, 15mm dans les concentrations2 et 16 avec respectivement, et des zones d'inhibitions 15 et 14 dans les concentrations intermédiaires 4 et8.

Pour *P. aeruginosa* ,une zone d'inhibition proche chez les différentes concentrations entre 6mmet 8mm.

Chez les feuilles on constate que une activité inhibitrice moins efficace par apport les fleurs, une zone d'inhibition maximale de 13mm dans la concentration 16 chez *E. faecalis* , et une zone d'inhibition minimale de 6 dans la concentration 8.

L'étude réalisée par **Muanda (2010)**, sur les extraits méthanoliques, montre une activité plus élevée pour l'inhibition des germes sur des feuilles de *Daniella oliveri*, pour *E. coli* (12mm), *s. aureus* (10 mm), *P. aeruginosa* (14 mm), les extraits méthanoliques des feuilles de *Desmodium adscendens* a un effet inhibiteur vis-à-vis *E. coli* (12mm), *S.aureus* (13 mm), *P. aeruginosa* (11 mm).

Tableau 08: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait acétate d'éthyle de plante *Hedysarum spinosissimum* subsp *Capitatum*.

Souches	Feuilles					Fleurs				
	Les dilutions de l'EAcOEt du <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>									
	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité
<i>E. coli</i>	6	7	8	9	+	10	12	16	15	++
<i>S. aureus</i>	7	2	3	5	-	7	9	11	10	+
<i>P. aeruginosa</i>	7	8	7	9	+	11	8	12	9	+
<i>E. cocci</i>	8	10	12	13	+	12	13	15	12	++

Les résultats obtenus dans le tableau 08 et les figures 30montrent que :

l'extrait acétate d'éthyle des fleurs possède un meilleur effet antibactérien avec des zones d'inhibitions varient entre (10 à 16 mm) chez *E. coli* et (12 à 15 mm) chez *E.faocalis*.

pour *s. aureus* et *P. aeruginosa* une zone d'inhibition entre (7 et 11mm) et (8 et 11 mm) respectivement. En outre, on remarque que la sensibilité des souches bactériennes à acétate d'éthyle des feuilles de la plante étudiée est faible, où on trouve une zone d'inhibition entre (6 et 9 mm) pour *E. coli*, de (7 à 9 mm) pour *P. aeruginosa*, une faible activité (2 à 7 mm) présente chez *S. aureus*.

Tableau 09: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait *n*-butanol de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

Partie	Feuilles					Fleurs				
	Les dilutions de n-BuOH du <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>									
Souches	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité
<i>E. coli</i>	5	6	8	9	+	5	6	5	7	-
<i>S. aureus</i>	7	9	8	7	+	7	6	5	5	-
<i>P. aeruginosa</i>	6	6	8	9	+	5	5	7	6	-
<i>E. cocci</i>	6	8	10	13	+	8	6	9	7	+

Les résultats obtenus dans le tableau 08 et les figures montrent que : l'activité antimicrobienne est remarqué dans l'extrait de *n*-BuOH des feuilles vis-à-vis toutes les souches là où on remarque une zone d'inhibition de (6 à 13 mm) chez *E. faecalis*, et entre (6 à 9 mm) chez les autre souches. Par contre, les souches *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* été non sensibles au l'extrait de *n*-BuOH de fleurs, sauf l'exception de *E. faecalis* dont leur zone d'inhibition est entre (6 et 9 mm).

Tableau 10: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'extrait des coumarines de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*.

Partie	Feuilles					Fleurs				
	Les dilutions des coumarines du <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp <i>Capitatum</i>									
Souches	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité	1/2	1/4	1/8	1/16	sensibilité
<i>E. coli</i>	8	8	10	9	+	10	13	12	13	+
<i>S. aureus</i>	10	8	6	9	+	7	9	10	13	+
<i>P. aeruginosa</i>	9	11	12	11	+	11	13	12	10	+
<i>E. cocci</i>	12	11	11	12	+	11	9	11	13	+

Les résultats présentés dans le tableau 10 et les figures 37 ,38 montrent que :

Les quatre souches étudiées sont sensibles pour l'extrait des coumarines de plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*. Présente une même sensibilité dans les deux partie Feuilles et Fleurs, dont les souches bactériennes testées sont inhibés avec un degré différent, avec des zones d'inhibitions entre (8 et 10 mm) chez *E. coli* et de (11 et 12mm) chez *E. faecalis* pour les Feuilles, et entre (7 et 13 mm) chez *s. aureus* et de (10 et 13mm) chez *s. aureus* et *E. coli* pour les Fleurs.

Conclusion

Conclusion

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antibactérienne ou antioxydants.

Dans le présent travail, s'est porté sur l'étude des activités biologiques et de la phytochimie de *Hedysarum spinosissimum* ssp. *capitatum* plante médicinale de famille de Fabacées, Il a permis de mettre en évidence à travers une analyse phytochimiques, la richesse de cette plante en composés phénoliques.

La plante étudiée *Hedysarum spinosissimum* ssp. *capitatum* a été soumise à une extraction des composés phénoliques par macération hydroalcoolique, pour les deux parties (Feuilles et Fleurs). Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits sont variables selon les parties de notre plante et que le rendement le plus élevé est enregistré avec l'extrait brut des feuilles suivi par l'extrait bruts des fleurs avec des pourcentages de 9.83%et 6.72% respectivement. Tandis que les plus les plus faibles sont notés chez l'extrait butanolique des fleurs suivies par l'extrait d'acétate d'éthyle de deux parties feuilles et fleurs, avec 0.72 et 1.20,1.02 % respectivement. Tandis que le rendement des huiles essentielles des deux parties feuilles et fleurs qui est très faible, avec 0.125%et 0.07%. Pour le rendement des coumarines chez les feuilles et les fleurs est compris de 3.9%et 1.4 %.

L'analyse qualitative par la méthode de CCM montre que la présence des déférents composées phénoliques dans les déférentes extraits de notre plante étudiée avec une variabilité des nombres des spots et des couleurs avec des quatre systèmes solvant. Les trois systèmes de solvant [chloroforme /acétate d'éthyle (8 :2) ; chloroforme/Methanol (9 :1) ; chloroforme/Methanol (7 :3)] sont les systèmes qui donnant une meilleure séparation des molécules, pour l'extrait d'acétate d'éthyle de deux parties (feuilles et fleurs)

Le teste de l'activité biologique des extraits de cette plante montre qu'ils possèdent une activité antioxydant qui déterminé par la méthode de DPPH avec $IC_{50}=2.14 \mu\text{g/ml}$, et une activité antibactérien des extraits issus de notre plante par la méthode de diffusion en milieu gélosé, a permis de conclure que, nos extraits sont actifs sur les souches bactériennes testées à l'exception de l'extrait butanolique contre *Staphylococcs aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococci faocalis*. Cette dernière souche est la plus sensible aux extraits testés avec des diamètres d'inhibition varient entre 14 à 16 mm.

En fin, la présente étude montre la richesse de cette plante étudiée en composés phénoliques, ce qui montre l'importance de leurs utilisations en médecine locale comme agents antimicrobiens et antiocciendaux.

Références bibliographiques

- [1] Allen O.N., Allen E.K.(1981). The Leguminosae. A Source Book of Characteristics. Uses and Nodulation. Univ. Wisconsin Press. Madison, WI: 324-325.
- [2] Avissar N., Whitin J.C., & Allen P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 2: 15850-15855.
- [3] Ayachi, A. (2014). Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus* (*D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carotassphispanicus*) de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. p: 31-38.
- [4] Baatout, H., Combes, D., & Marrakchi, M. (1991). Reproductive system and population structure in two *Hedysarum* subspecies. I. Genetic variation within and between populations. *Genome*, 34(3), 396-406.
- [5] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46(11), 1086-1089.
- [6] Belkassam, A. (2009). L'effet des facteurs climatiques de métabolisme secondaires dans une plante médicinale *Rutamontana* L. Thèse de Magistère. Université Oum El Bouaghi.
- [7] Benayache, F. (2005). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 199 p.
- [8] Bergogne-Berezin, E., Dellamonica, P. (1995) Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson*, Paris, 486 p.
- [9] Bhat, S. V., Nagasampagi B. A., Sivakumar, M. (2005). Chemistry of Natural Products. *Narosa, New Delhi, India.* , Ch. 4: 237.
- [10] Bonnier, G. (1934). Flore complète illustrée en couleurs de France Suisse et Belgique (comprenant la plupart des plantes d'Europe). Tome troisième: 84-85.
- [11] Bouderdara, N. (2013). Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachryslibanotis* L. Thèse de doctorat. Université Mentouri. Constantine. 91p.

- [12] **Bouhadjera. (2005).** Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R. Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. p: 2- 48.
- [13] **Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnelley, S., & McAnelley, C. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience et Nutrition*, 4(6), 7.
- [14] **Braithwaite A., Smith F. J. (1999).** Chromatographic Methods. 5ème Ed *Kluwer Academic Publishers*. London. 548 p.
- [15] **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* **28** : 25-30.
- [16] **Bssaibis, F., Gmira, N., & Meziane, M. (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Revue de Microbiologie Industrielle, Santé et environnement*, 3, 44-55.
- [17] **Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. & Li, Y., (1995).** Characteristics of *Rhizobium trianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1), P153.
- [18] **Cuilel, N. (1983).** Methodologie of vegetal drugs. Rumania. P:1-32.
- [19] **Cuplan, F. (2012).** Les plantes et leurs noms : Histoires insolites, Quae, Paris.
- [20] **Deschomacker, K., Provoost, CH. (1999).** L'impact de la nutrition sur la santé, développement récents, I, Garant, Louvain, P 95.
- [21] **Dupont, F., & Guignard J-L. (2012).** Botanique Les familles de plantes 15^{ème} édition, 163-164-p.
- [22] **Fiorucci, S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis. 15 p.
- [23] **Fuhrman, B., Lavy A., & Aviram M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:549-554.
- [24] **Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z & Daniel Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. pp: 91-96.

- [25] **Henry L. Mack . (2014).** Enterococcus Faecalis: Molecular Characteristics, Role in Nosocomial Infections and Antibacterial Effects. Amazon France.Paris.P202.
- [26] **Hopkins, W.G. (2003).** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. Paris.p 268-273.
- [27] **Hostettmann, K., Potteray, O. &Wolfender, J. L. (1998).**The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimie*, 52, 10-17.
- [28] **I.B.S., Carvalho P.O. &Eberlin M.N. (2007).** Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- [29] **Jacques, B., & André, R. (2004).** Biochimie métabolique. *Ed ellipses. Paris*, 217-225.
- [30] **Jahandiez, E., & Maire, R. (1932).** Catalogue des plantes du Maroc–Tome deuxième: Dicotylédones Archichlamydées-Alger. *Minerva*, 161.
- [31] **Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. Stevens P. (2002).** Botanique systématique. Une perspective phyllogénétique. Paris, Bruxelles, De Boek Université, 282.
- [32] **Judd, WS., Campbell, CS., Kellogg,E A., Stevens, P. 1999.**Botanique systématique une perspective phylogénétique, De Boeck université, paris.
- [33] **Kaloustian,J., Hadji-Minaglon,F.(2012).** La connaissance des huiles essentielles, qualilogie et aromathérapie, Springer, Paris, p 12.
- [34]**Larbier,M, Leclercq,B.(1992).** Nutrition et alimentation des vollailes, INRA, Paris, P 293.
- [35]**Leybros,J.,Fremaux,P(1990).**Extraction solides- liquides especs théoriques technique de l'ingénieurs. Génie de procédés. Vol(2/2780,22).
- [36] **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- [37] **Mack,H.(2014).**Enterococcus Faecalis: Molecular Characteristics, Role in Nosocomial Infections and Antibacterial Effects.Amazon,France.p130.

- [38] **Madjour, S. (2014).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinusofficinalis*. Mémoire de fin d'étude en Master. Université Mohamed KhiderBiskra. 45 p.
- [39] **Marfak, A. (2003).** Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. pp: 6-7-10.
- [40] **Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., &Eberlin, M. N. (2007).** Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules*, 12(3), 423-432.
- [41] **Martinez-Cayuela, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*77:147-161.
- [42] **Maurice, N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.
- [43] **Morot-Gaudry, J.(2016).** Les végétaux, un nouveau pétrole, Quae, Pris. P33.
- [44] **Muanda, F-N. (2010).**Identification de polyphenols, evaluation de leur activiteantioxydante et etude de leurs proprietes biologiques.THESE Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paul Verlaine-Metz
- [45] **Nacoulma, AP., (2012).** Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcusfascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92 p.
- Narosa, New Delhi, India. , Ch. 4: 237.*
- [46] **Patrick B., Jean L. & Michel S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed. Médecine –Sciences Flammarion. Paris. p: 100-108.
- [47] **Porizet, D. (2010).** Production durable de biomasse la lignocellulose des poacées,Cedex,P 121.
- [48] **Projet De numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela boutonica. (2011).**www.tela-boutanica.org
- [49] **Quezel, P. and Santa, S. (1962),** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C.N.R.S.ed. Paris, france.
- [50] **Raven, P.H., Evert, R.F. et Echhorn, S.E. (2014).** Biologie végétale. 3^{ème} Ed. de boeck. Bruxelles.P80-85.

- [51] **Rémésy, CH. (2005).** Propriétés biologiques des polyphénols que mangerons-nous demain. Odilke Jacob, Paris, p156.
- [52] **Richard, C., Kiredjian, M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : pseudomonas, Alcaligenes, Flavonacterium, Acintobacter, Brucelle, Bordetella. 2^{ème} édition. Ed Institut. Pasteur. Paris. Pp :42-43.
- [53] **Riotte, B. (2017).** Mon guide huiles essentielles, Amazon, France.
- [54] **Sanogo, S. (2008).** Etude de la phytochimie et de l'effet hypoglycémiant de trois (3) plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle au Mali. Thèse doctorat de Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).
- [55] **Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Lavoisier. p 2-10.
- [54] **Smirnoff, N. (2005).** Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants; Ed 1: BLACKWELL; p: 141-210.
- [56] **Spiller, M., Spiller, G. (2005).** Tout savoir sur les fibres, édition le mieux-être, Canada, P30.
- [57] **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S. et Peter W.J. (2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed. Elsevier Academic Press. p:71-132.
- [58] **Svoboda, K. P., Svoboda, T. G., & Syred, A. D. (2000).** Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs. *Microscopic Publications*.
- [59] **Torres, R., Faini, F., Modak, B., Urbina, F., Labbé, C., & Guerrero, J. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*, 67(10), 984-987.
- [60] **Vansant, G. (2004).** Radicaux libres et antioxydants: principes de base. In *Symposium «Antioxydants et alimentation»*. Institut Danone.
- [61] **Wang J., Mazza G. (2002).** Effect of Anthocyanins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factors α in LPS/IFN- γ -Activated RAW.264.7. Macrophages. *J. Agric. Food. Chem.*, 50 : 4183-4189.
- [62] **Wielgorskaya, T. (1995).** Dictionary of Generic Names of Seed Plants. Columbia University Press.
- [63] **Ziegler J., Facchini P.J., (2008).** Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* Vol (59): 735 – 769.
- .

Annexe



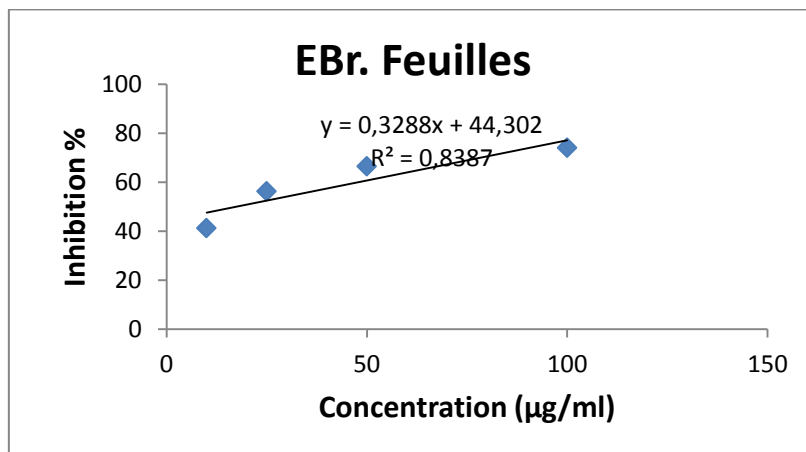
Annex01 : Différents extraits de plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



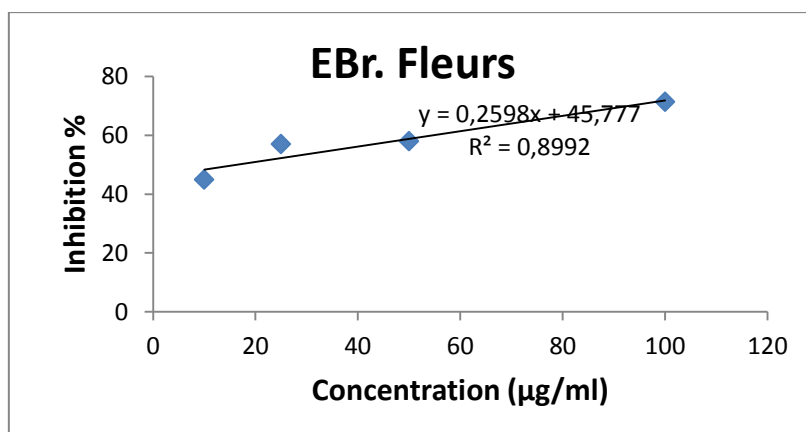
Annex02 : Préparation des extraits de pour *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*
(étape de l'activité antioxydant)



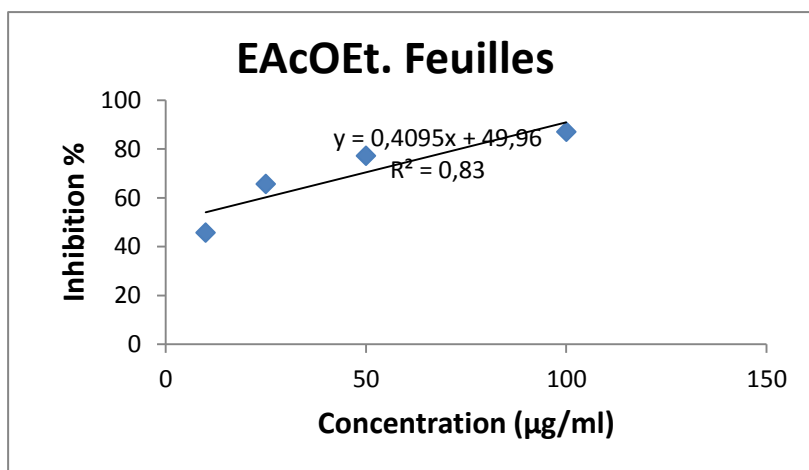
Annex03 : Rendements des huiles *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*



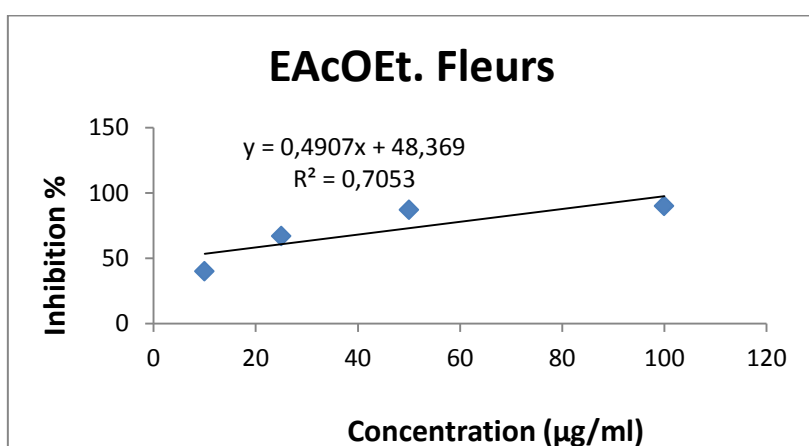
Annex04 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait brut des feuilles de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*



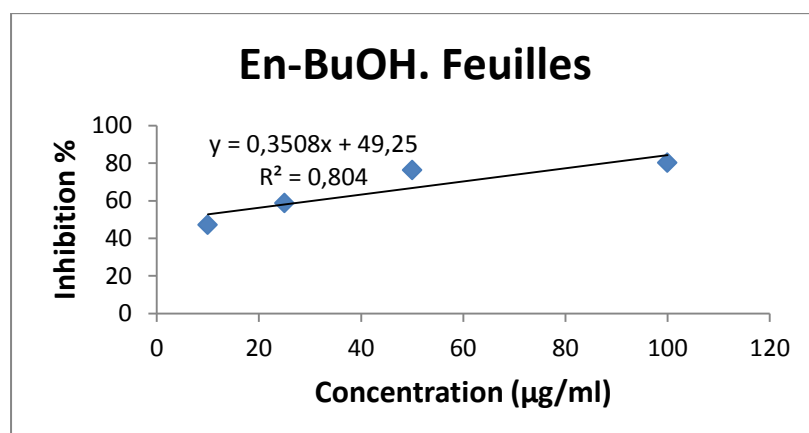
Annex05 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait brut des fleurs de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*



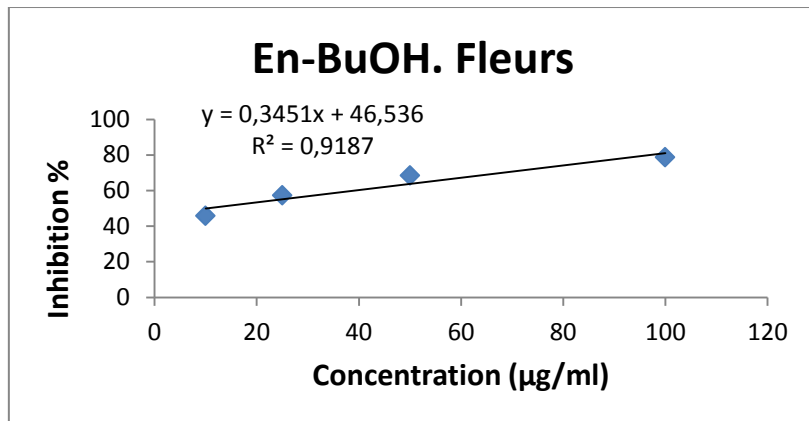
Annex06 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



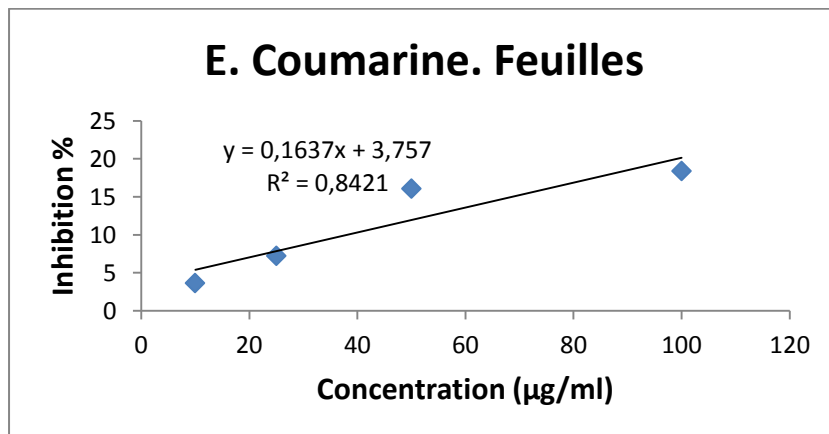
Annex07 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait d'acétate d'éthyle des fleurs de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



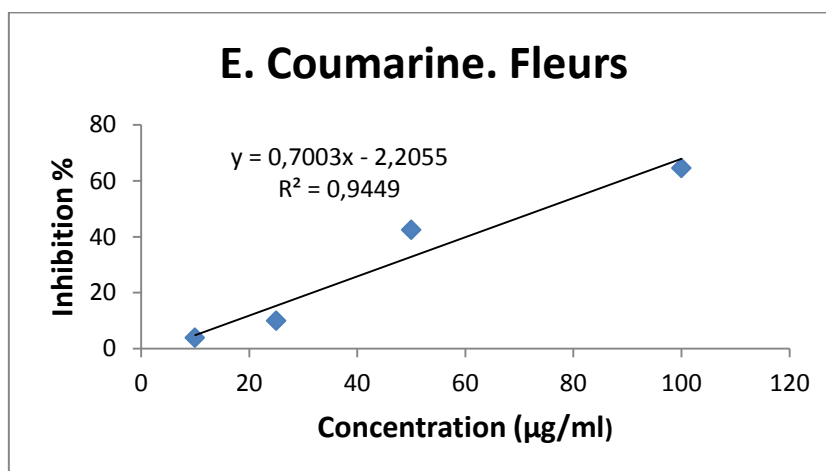
Annex08 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait butanolique des feuilles de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



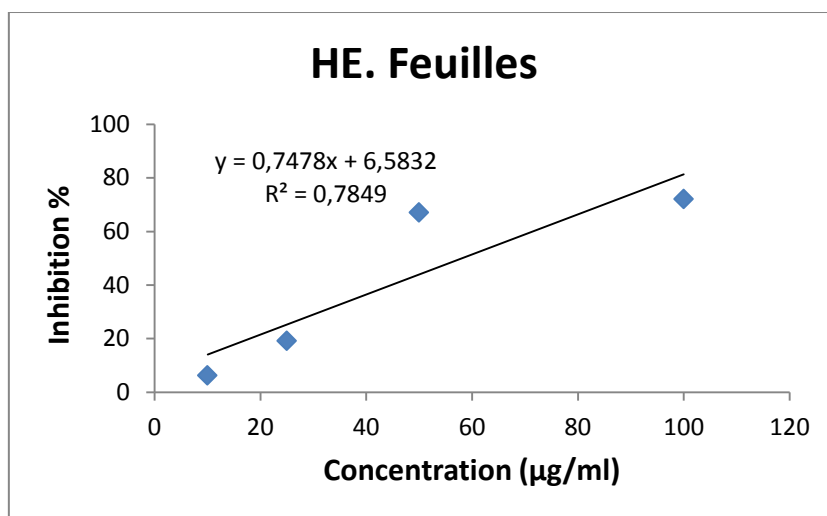
Annex09 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait butanolique des fleurs de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



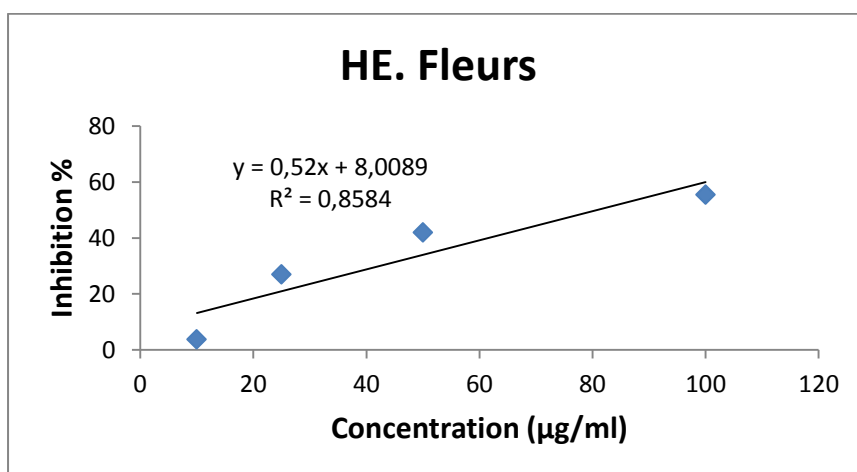
Annex10: Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait de coumarine des feuilles de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



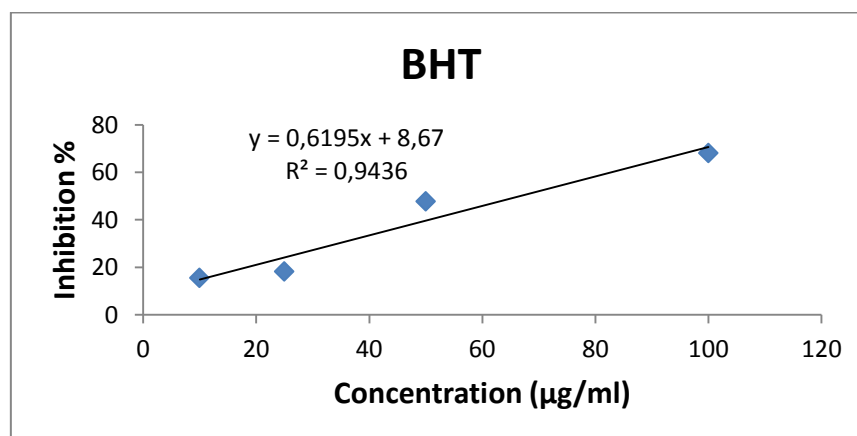
Annex11 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de l'extrait de coumarine des fleurs de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*



Annex12 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant d'huile essentielle des feuilles de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*



Annex13 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant d'huile essentielle des fleurs de la plante *Hedysarum spinosissimum* ssp *Capitatum*



Annex14 : Courbe d'étalon d'activité antioxydant de BHT.

ملخص

هذا العمل جزء من دراسة النشاط الحيوي لنبات *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*. نبات طبي ينتمي إلى عائلة Fabacées، حيث كان الهدف من بحثنا هذا الدراسة الفيتو كيميائية والفعالية البيولوجية (مضادات الأكسدة ومضاد للبكتيريا) للأوراق والزهور. كشفت عمليات الاستخلاص الانتقائية عن مردود كبير وقد قدر بأعلى نسبة عند المستخلصات الخام للأوراق والأزهار، وقدر المردود ب 9.3 % و 1.4 %، باستثناء الزيوت الأساسية للأوراق والأزهار (0.12% و 0.07%)، وتم الحصول على مستخلصات الكومارين من المستخلصات الخام للأوراق والأزهار. يشير التحليل النوعي عن طريق تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM إلى فصل عدة مركبات فينولية مع ثلاثة أنظمة مذيية لمستخلص AcOEt لكلا الجزئين. ويظهر اختبار النشاط الحيوي لمستخلصات هذا النبات أنه يمتلك نشاط مضاد للأكسدة بتقنية DPPH مع IC_{50} بين 2.14 و 17.37 ميكروغرام / مل، في حين أن الزيوت الأساسية والكومارينات تظهر أضعف النشاط. في موازاة ذلك، تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا وفقا لطريقة انتشار القرص على أربع سلالات بكتيرية: *E. coli*، *S. aureus*، *P. aeruginosa*، *E. faecalis*، تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الكومارين وباقي المستخلصات لها نشاط مضاد للبكتيريا جيد ماعدا En-BuOH.

الكلمات الرئيسية: الزيوت الأساسية، الكومارين، النشاط المضاد للبيولوجي *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*

للبيكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'activité biologique de la plante *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*. Plante médicinale, appartenant à la famille des Fabacées, alors il porte sur notre objectif sera alentour l'étude phytochimique et l'activité biologique (Antioxydant et Antibactérienne) des feuilles et des fleurs. Les extractions sélectives ont révélés des rendements importants Il a été estimé au taux le plus élevé d'extraits brut de feuilles et de fleurs, et le taux de rendement était de 9,3% et 1,4%, sauf les huiles essentielles des feuilles et des fleurs (0.12% et 0.07%), les extraits des coumarines a été obtenus a partir des extraits bruts des feuilles et des fleurs, les rendements respectifs sont 9.3% et 1,4%. L'analyse qualitative par la méthode de chromatographie sur couche mince CCM indique une séparation des nombreuses composées phénoliques avec trois systèmes solvant pour l'AcOEt des deux parties. Le teste de l'activité biologique des extraits de cette plante montre qu'ils possèdent une activité antioxydant qui déterminé par la méthode de DPPH avec IC_{50} comprises entre 2.14 et 17.37 $\mu\text{g/ml}$, tandis que les huiles essentielles et les coumarines montrant la plus faible activité. En parallèle, l'activité antibactérienne a été déterminée selon la méthode de diffusion par disque sur quatre souches bactériennes: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis*, les résultats obtenus montrent que les coumarines et les déférents extraits ont de bonne activité antibactérienne sauf l'En-BuOH.

Mots clés : *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*, activité biologique, huile essentielles, les coumarines, activité antibactérienne, activité antioxydant .

Abstract

This work is part of the study of the biological activity of the plant *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*. Medicinal plant, belonging to the Fabacées family, then it relates to our goal will be around the phytochemical study and the biological activity (Antioxidant and Antibacterial) of leaves and flowers. Selective Extractions Revealed Significant Yields It was estimated at the highest rate of crude leaf and flower extracts, and the rate of return was 9.3% and 1.4%, except for leaf and flowers essential oils (0.12% and 0.07%). the extracts of coumarins was obtained from the raw extracts of leaves and flowers, the respective yields are 9.3% and 1.4%. The qualitative analysis by the method of chromatography on thin layer TLC indicates a separation of the many phenolic compounds with three solvent systems for the AcOEt of both parts. The test of the biological activity of the extracts of this plant shows that they possess an antioxidant activity which determined by the method of DPPH with IC_{50} between 2.14 and 17.37 $\mu\text{g} / \text{ml}$, while the essential oils and the coumarins showing the weakest activity. In parallel, the antibacterial activity was determined according to the disk diffusion method on four bacterial strains: *E. coli*, *S. Areas*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis*, the results obtained show that the extracted coumarins and differences have good antibacterial activity except En-BuOH.

Key words: *Hedysarum spinosissimum ssp Capitatum*, biological activity, essential oil, coumarins, antibacterial activity, antioxidant activity.