

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI

CONSTANTINE 1

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE**

N° d'ordre :

N° de série :

MÉMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Master 2 en science de la Nature et de la Vie

Filière de Sciences biologiques

OPTION : Biochimie appliquée

Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante *Ononis Alba Poir.*

Par : AOUATI Lina et ABDENNOUR Asma

Soutenue le : 18/07/2019

Devant le jury composé de :

Président : Mme Maameri Zineb (MCA ; UFM Constantine 1)

Encadreur : Mme Zaak Hadjer (MCB ; CRBT Constantine)

Examineur : Mr Bensouici Chawki (MCB ; CRBT Constantine)

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

C'est avec une grande joie qu'ai débuté ce mémoire et un léger pincement au cœur que nous en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces mois de travail.

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

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur de mémoire Dr. « Zaak Hqdjer », qui nous a guidé dans notre travail, Merci de nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très patiente avec nous, Merci d'avoir mis votre expérience à notre profit, Merci de tout coeur.

Nous remercions l'équipe du Laboratoire de la biochimie, centre de recherche biotechnologique CRBT et pour nous permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions que soient.

Nous remercions aussi, Mme «Maameri Zineb» à l'Université Constantine 1, Nous somme honorées par sa présence comme président du jury.

Nous remercions également Mr «Chawki Bensouici du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine d'avoir accepté examiner ce modeste travail.

Nos vifs et sincères remerciements s'adressent tout particulièrement à tout le personnel du Centre de recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine, qui nous a procuré une bonne formation.

Asma et Lina

Dédicaces

Nous dédions ce mémoire

À nos chers parents

À nos frères et sœurs

À tous nos amis

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITE SUR LE GENRE ONONIS

I. Les Fabaceae	1
I.1. Systématique	1
I.2. Description botanique des Fabaceae	1
I.3. Répartition géographique des Fabaceae	2
I.4. Importance de certaines Fabaceae	3
I.4.1. Thérapeutique	3
I.4.2. Economique	3
I.5. Toxicité de certaines Fabaceae	4
I.6. Le Genre Ononis	4
I.6.1. Description botanique	5
I.6.2. Systématique	5
I.6.3. Propriétés biologiques du genre Ononis	5
I.6.4. Travaux antérieurs réalisés sur le genre Ononis	6
I.7. L'espèce Ononis Alba Poir	8
I.7.1. Description botanique	8
I.7.2. Systématique	9
I.7.3. Position géographique de la plante <i>Ononis Alba</i> Poir	9

CHAPITRE II : METABOLITES SECONDAIRES ET ACITIVITES BIOLOGIQUES

I. Les métabolites secondaires	11
I.1. Les composés phénoliques	11
I.1.1. Généralité et structure.....	11
I.1.2. Classification des polyphénols	12
I.1.2.1. Polyphénols simples	12
I.1.2.1.a. Acides phénoliques.....	12
I.1.2.1.2. Les flavonoïde.....	14
I.1.2.1.2.1. Différentes classes de flavonoïdes	14
I.1.2.2. Polyphénols complexes.....	16
I.1.2.2.1. Tanins.....	16
I.1.3. Localisation des polyphénols dans les plantes et intérêt.....	17
I.1.4. Propriétés des composés phénoliques.....	18
II. Activités biologiques des composés phénoliques.....	19
II.1. L'activité antioxydante	19
II.2. L'activité antimicrobienne	19
II.3. Action sur les enzymes.....	20

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I. Objectif du travail.....	23
II. Matériel et méthode.....	22
II.1. Matériel végétal.....	22
II.2. Préparation de la poudre végétale	22
II.3. Étude phytochimique.....	23
II.3.1 Caractérisation physico-chimique	23
II.3.1.1. Détermination de la de la Matière sèche.....	23
II.3.1.2. Détermination de la matière organique et minérale.....	23
II.3.1.3. Détermination de la matière grasse	24
II.3.1.4. Détermination des matières azotées totales	24
II.3.2. Préparation des extraits.....	25
II.3.2.1. Macération : l'extraction solide-liquide (ESL)	25

II.3.2.2. Séparation : par la technique liquide-liquide (ELL).....	25
II.3.3. Analyse quantitative	27
II.3.3.1. Dosages des polyphénols totaux	27
II.3.3.2. Dosages des flavonoïdes.....	27
II.3.3.4. Dosages des tanins condensés.....	28
II.3.3.5. Dosages des sucres totaux.....	28
II.4. Évaluation des différentes activités biologiques	29
II.4.1. Activité antioxydante	29
II.4.1.1. Test du piégeage du radical libre DPPH	29
II.4.1.2. Test de réduction du cuivre (CUPRAC).....	29
II.4.2. Activités enzymatiques	30
II.4.2.1. Activité inhibitrice de l'α amylase.....	30
II.4.2.2. activité inhibitrice de l'α-glucosidase.....	31
II.4.3. Activité antimicrobienne.....	31
II.4.3.1. Test antifongique	31
II.4.3.2. Test antibactérien.....	32

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude phytochimique.....	34
I.1. Caractérisation physico-chimique	34
I.2. Analyse quantitative.....	34
II. Évaluation des différentes activités biologiques.....	36
II.1. Activité antioxydante	36
II.1.1. Test du DPPH	36
II.1.2. Test de la réduction de cuivre (CUPRAC).....	38
II.2. Activité enzymatique (antidiabétique).....	41
II.3. Activité antimicrobienne	44

II.3.1. Test antibactérien	44
II.3.2. Teste antifongique.....	46

CONCLUSION GENERALE

ANNEXE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Répartition géographique des Fabaceae (Heywood, 1996).....	2
Figure 02 : La plante <i>Ononis Alba</i> Poir (Encyclopedie botanique collaborative, 2018)	9
Figure 03 : Distribution géographique de la plante <i>Ononis Alba</i> Poir (ILDIS, 2011)	10
Figure 04 : Structure générale des polyphénols (Bruneton, 1999)	12
Figure 05 : Structures chimiques (A) des acides hydroxy-benzoïques, (B) des acides hydroxy-cinnamiques (Han et al, 2007; Bruneton, 2008 ; Chira, 2008).....	13
Figure 06 : Squelette de base des flavonoïdes (Crozier, 2003)	14
Figure 07 : Structure chimique de quelques flavonoïdes (Bouchouka, 2016)	15
Figure 08 : Structure chimique (A) Tanin condensé (proanthocyanidine), (B) Tanin hydrolysable (gallotanin) (Derbel et Ghedira, 2005)	17
Figure 09 : Parties aériennes de la plante <i>Ononis Alba</i> Poir.....	22
Figure 10 : Protocole d'extraction.....	26
Figure 11 : Composition phytochimique de l'Ononis.....	35
Figure 12 : Schéma de la plaque de dosage des polyphenols et flavonoides.....	36
Figure 13 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH).....	36
Figure 14 : Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de <i>l'Ononis Alba</i> Poir.....	37
Figure 15 : Activité antioxydante des différents extraits de <i>l'Ononis Alba</i> Poir testée par DPPH (Valeur des IC50).....	38
Figure 16 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (CUPRAC).....	39
Figure 17 : Courbe d'absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration des différents extraits de <i>l'Ononis Alba</i> Poir.....	40

Figure 18 : Activité anti-oxydante des différents extraits de <i>l'Ononis Alba</i> Poir testée par CUPRAC (valeur des A0.50).....	40
Figure 19 : Activité inhibitrice de l'alpha amylase de l'extrait dichlorométhane.....	41
Figure 20 : Activité inhibitrice de l'alpha amylase du standard acarbose.....	42
Figure 21 : Valeurs des IC50 de l'activité inhibitrice de l'alpha amylase classées par ordre croissant.....	43
Figure 22 : Zones d'inhibition résultant de la sensibilité différentes souches aux différentes d'extraits d' Ononis Alba Poir.....	44
Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction de la concentration des trois extraits de <i>l'Ononis Alba</i> Poir.....	46
Figure 24 : Résultats d'incubation de l'agent phytopathogène sur milieu PDA et les trois extraits.....	47

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Exemples de produits isolés à partir des plantes du genre *Ononis* (**Khouni, 2016**)6
- Tableau 2 :** Caractérisation physicochimique d'*Ononis Alba Poir*.....34
- Tableau 3 :** Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de *l'Ononis Alba Poir*.....45

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales sont extrêmement complexes de point de vue 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 l'effet toxique, en constituant de cette manière une source infinie de substances et de composés à activités biologiques et pharmacologiques très variées.

Parmi ces composés on trouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. En effet, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie sur la diversité de métabolites secondaires d'origine végétale pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents.

Le régime méditerranéen caractérisé par une consommation élevée et variée de produits végétaux (légumes, fruits, huile d'olive, thé...etc.) renferme parmi ses diverses espèces végétales une gamme de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques, constituant la flore Algérienne. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la diminution de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives et divers cancers, serait due aux micro-constituants de ce régime riche en produits végétaux dont les polyphénols sont les principaux représentants.

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentent ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant).

Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la saveur

des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires. Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques qui ont montré des effets nuisibles sur la santé humaine.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à une plante endémique dont plusieurs études ont été faites sur le même genre et mais aucune n'a été faite sur cette espèce. La plante choisie est *Ononis Alba* Poir. Cela nous a encouragé à approfondir nos connaissances dans le domaine de la biochimie appliquée tout en recherchant de nouvelles molécules naturelles à activité biologique potentielle et qui peuvent substituer les molécules synthétiques.

Ce travail présente une étude phytochimique de la plante et évaluation de son pouvoir thérapeutique où ses effets antimicrobiens et antioxydants sont l'objectif ciblé.

Afin d'atteindre le résultat voulu, une série de traitement doit la plante subir allant du séchage jusqu'à la dernière étape d'identification de leurs métabolites secondaires dans le filtrat, sur lequel, les activités biologiques vont être testées. Cela aura un impact significatif dans le développement de nouvelles molécules efficace et performante.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GENERALITE SUR LE GENRE

ONONIS

I. Les Fabaceae :

La famille Fabaceae (ou Leguminosae) constitue la troisième plus grande famille des angiospermes en nombre d'espèces après les familles Orchidaceae et Asteraceae (Lee et al, 2003). Les plantes qui forment cette famille sont distribuées à travers le monde et se localisent principalement dans les zones tropicales et tempérées.

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées pour la consommation humaine en raison de leur huile et leurs fibres. Elles sont aussi utilisées comme combustible pour leur bois et remèdes en médecine traditionnelle (Khallouki et al 2000).

La famille Fabaceae renferme 745 genres et plus de 19500 espèces, réparties entre trois sous-familles : Papilionoideae (Faboideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae (Long-Ze et al ,2010) dont la Papilionoideae est la plus importante en incluant plus des deux tiers des espèces légumineuses.

I.1. Systématique :

Classification: APG II (1998)

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Angiospermae

Classe: Eudicotyledonae

Sous classe : Rosidae

Ordre: Eurosidiae I

Sous ordre : Fabales

Famille: Fabaceae (Leguminosae)

Sous Famille : Faboideae, Mimosoideae, Caesalpinioideae (Long-Ze et al, 2010).

I.2. Description botanique des Fabaceae :

Les plantes Fabaceae sont généralement de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (Rhizobium). La longueur des poils

est variable et les feuilles sont généralement alternes. Les folioles sont parfois transformées en vrilles.

Ces plantes sont constituées de 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 (**Spichiger et al 2002**).

Les fleurs sont généralement hermaphrodites, les sépales sont au nombre de 5, libres ou soudés, tous semblables, où le pétale postérieur différent par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10. Les grains de pollen sont généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle est souvent unique, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore. L'ovaire est supère, à placentation pariétale. Le fruit est généralement une gousse, parfois une samare (**Spichiger et al, 2002**).

I.3. Répartition géographique des Fabaceae :

Les Fabaceae constituent la troisième famille des angiospermes. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (figure 01). Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles (**Heywood, 1996**).



Figure 01 : Répartition géographique des Fabaceae (Heywood, 1996).

I.4. Importance de certaines Fabaceae :

I.4.1. Thérapeutique :

Beaucoup d'espèces de fabaceae ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance alimentaire et ayant des propriétés médicinales (**Journet, 2001; Haieb et al 1999**) :

- *Trigonella foenum graecum* (fenugrec) :

C'est une plante herbacée, de nom vernaculaire halba, originaire du Proche Orient largement cultivée. Le fenugrec est utilisé dans le traitement des plaies, diarrhées, acné, déshydratation, anémie, bronchite, rhumatismes, maux d'estomac, hypertension artérielle, constipation. Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement. Les graines ont des propriétés nutritives hypocholestérolémiants, elles sont traditionnellement utilisées comme stimulant de l'appétit et pour la prise de poids (**Mahmoudi, 1980**).

- *Arachis hypogaea* L. (Arachide) :

L'huile d'Arachide est utilisée comme solvant médicamenteux. Il a également des propriétés vitaminiques P (action antihémorragique au niveau des capillaires) (**Mahmoudi, 1980**).

- *Glycine soja* Siebold et Zucc. :

C'est une espèce de très grande richesse en protides. Pour cette raison, la farine de Soja est un élément diététique intéressant et entre dans la constitution de milieux de culture destinés à la production d'antibiotiques. L'huile de Soja d'une très grande importance économique est utilisée en thérapeutique pour l'alimentation parentérale (**Mahmoudi, 1980**).

I.4.2. Economique :

L'importance économique de ces espèces est notable :

- Les industries agroalimentaires sont, de grosses consommatrices. Comme pour le soja, (*Glycine max*), qui est employé sous forme d'huile, lécithine en tant qu'émulsifiant, concentré protéiques et tourteaux. Ou encore l'arachide, (*Arachis hypogaea*), sous forme d'huile et produits dérivés. Les légumineuses fourragères, comme la luzerne, (*Medicago sativa*), les tourteaux de soja ou d'arachide, sont utilisées dans l'agriculture pour l'alimentation animale car elles sont une source de protéines qui ne nécessite pas d'engrais azotés (**Bruneton, 2005 ; Reynaud, 2002**).

- Dans le domaine pharmaceutique, les baumes ont une utilisation très restreinte : le baume du Pérou (exsudats de *Myroxylon balsamum*) possède des propriétés cicatrisantes mais du fait de sa composition riche en dérivés cinnamiques, il peut être à l'origine de dermatites allergiques de

contact. Les molécules actives extraites industriellement sont rares, ce sont beaucoup de produits de synthèse qui sont maintenant utilisés (**Bruneton ,2005 ; Reynaud ,2002**) .

- Dans le domaine industriel, se développe l'utilisation de bois d'œuvre comme le palissandre (*Dalbergia* spp), ou encore de sources exploitables de tanins trouvées dans (*Acacia mearnsii*) et (*Caesalpinia* spp) (**Bruneton ,2005 ; Reynaud ,2002**) .

I.5. Toxicité de certaines Fabaceae :

Un nombre non négligeable de fabaceae est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses. Après avoir cité quelques espèces d'intérêt thérapeutique, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques comme *Tephrosia vogelii*, *Physostigma venenosum* et le genre de Coronilles (**Mekkiou, 2005**).

I.6. Le Genre *Ononis* :

Le genre *Ononis* appartient à la tribu des trifolieae qui constitue une des 31 tribus relevant de la sous-famille Papilionoideae. Ce genre qui compte environ 75 espèces est largement distribué dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale (**Willis, 1973**). En Algérie, on rencontre principalement les espèces suivantes (**Quezel et Santa 1963**).

- | | | |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| ✓ <i>O. cenisia</i> (L.) | ✓ <i>O. antennata</i>
(Pomel.) | ✓ <i>O. crinita</i> (Pomel.) |
| ✓ <i>O. fruticosa</i> (L.) | | ✓ <i>O. avellana</i> (Pomel.) |
| ✓ <i>O. spinosa</i> (L.) | ✓ <i>O. pubescens</i> (L.) | ✓ <i>O. rosea</i> (Dur.) |
| ✓ <i>O. hispida</i> (Desf.) | ✓ <i>O. viscosa</i> (L.) | ✓ <i>O. villosissima</i>
(Desf.) |
| ✓ <i>O. aragonensis</i>
(Asso.) | ✓ <i>O. incisa</i> (Coss.) | ✓ <i>O. serrata</i> (Forsk.) |
| ✓ <i>O. minutissima</i> (L.) | ✓ <i>O. laxiflora</i> (Desf.) | ✓ <i>O. hirta</i> (Desf.) |
| ✓ <i>O. pusilla</i> (L.) | ✓ <i>O. reclinata</i> (L.) | ✓ <i>O. mitissima</i> (L.) |
| ✓ <i>O. serotina</i> (Pomel.) | ✓ <i>O. euphrasiaefolia</i>
(Desf.) | ✓ <i>O. cephalantha</i>
(Pomel.) |
| ✓ <i>O. natrix</i> (L.) | ✓ <i>O. variegata</i> (L.) | ✓ <i>O. diffusa</i> (Ten.) |
| ✓ <i>O. ornithopodioides</i>
(L.) | ✓ <i>O. alopecuroides</i>
(L.) | ✓ <i>O. cossoniana</i>
(Boiss.) |
| ✓ <i>O. biflora</i> (Desf.) | | |
| ✓ <i>O. sicula</i> (Guss.) | ✓ <i>O. alba</i> (Poiret.) | |

I.6.1. Description botanique:

Plantes vivaces ou ligneuses, annuelles comportant : Calice à tube glanduleux en dedans et à 5 divisions profondes et subégales. Etamines monadelphes, à anthères toutes semblables ou 5 grandes et 5 petites. Ovaire poilu, Style subulé, genouillé et ascendant. Gousse sessile ou subsessile, déhiscente, saillante ou incluse, de forme variable mais généralement renflée. Feuilles trifoliolées en général (parfois unifoliolées ou multi-foliolées). Folioles denticulées et des fleurs roses, blanches ou purpurines (Quezel *et al*,1962).

I.6.2. Systématique :

Règne: Plantae

Sous-Règne: Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre: Fabales

Famille: Fabaceae (ILDIS, 2014)

I.6.3. Propriétés biologiques du genre *Ononis* :

La recherche bibliographique menée sur les espèces du genre *Ononis* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes et sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies tel que le traitement de l'ictère, les troubles des voies urinaires, l'herpès et les maladies de la peau (Bellakhdar, 1997; Nawasrehet *al*, 2004; Talib et Mahasneh, 2010). Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de grande importance pharmacologique:

- *Ononis spinosa* :

Cette plante est connue depuis longtemps pour son action diurétique. La racine est efficace contre la goutte et diverses affections de l'appareil urinaire et prévient la formation de calculs rénaux et biliaires (Iserin, 2001).

- *Ononis natrix* :

Les racines et les fleurs sous forme d'infusion, sont utilisées pour le traitement de certains troubles de l'appareil urinaire (Bellakhdar, 1997).

- *Ononis hirta* :

Les parties aériennes de la plante sont employées pour traiter les boutons de fièvre, l'herpès et le cancer de la peau (Talib et Mahasneh, 2010).

- *Ononis arvensis* :

Ses parties aériennes sont utilisées pour traiter les infections des voies urinaires et les maladies de la peau (Al-Qudah et al 2014).

Les études pharmacologiques réalisées sur les extraits de plantes ou de composants appartenant au genre *Ononis* ont montré diverses propriétés : antibactérienne et antimicrobienne (Mahasneh et El-Oqlah, 1999; Elamrani et Benaissa, 2010), diurétique, analgésique et anti-inflammatoire (Bolle et al 1993; Yilmaz, 2006), antioxydante (Al-Qudah et al 2014) et antiprolifératrice (Talib et Mahasneh, 2010).

I.6.4. Travaux antérieurs réalisés sur le genre *Ononis* :

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Ononis* ont mis en évidence la présence de flavonoïdes et isoflavonoïdes (Barrero et al 1997; Wollenweber et al 2003; Nawasreh et al, 2004; Benedec et al 2012), de dérivés du résorcinol (Barrero et al 1989 ; Barrero et al 1997) et de l'acide anthranilique (Barrero et al 1990 ; Barrero et al 1994)) isocoumarines et dihydroisocoumarines (Barrero et al, 1994), ptérocarpanes (Barrero et al 1998), stéroïdes et triterpénoïdes (Rowan, et Dean ,1972) de lactones aromatiques (Barrero,1989).

Dans ce qui suit (Tableau 1), nous allons citer quelques exemples de produits isolés à partir des plantes relevant de ce genre.

Tableau 1: Exemples de produits isolés à partir des plantes du genre *Ononis* (Khouni, 2016).

La plante	Les produits isolés	Références
<i>Ononis natrix</i>	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone 5,7-dihydroxy-8,3',4'-triméthoxyflavone 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine) 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tétraméthoxyflavone (Hyménoxine) 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (Genkwanine) 5,3'-dihydroxy-6,7,8,4'-tétraméthoxyflavone 5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (Xanthomicrol) 5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (Hispiduline) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-8-dihydroxytridecyl) résorcinol 5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol	(San Feliciano et al, 1990 ; Cañedo et al, 1997).

	<p>5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol 5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol 5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-6,8-dihydroxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-6,8-dihydroxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine acide <i>N</i>-arachidylanthranilique acide <i>N</i>-β-hydroxyarachidylanthranilique</p>	
<p><i>Ononis viscosa</i> subsp. <i>breviflora</i></p>	<p>1-<i>O</i>-méthyl-5-(13-hydroxytridecyl) résorcinol 5-(2,13-dihydroxytridecyl) résorcinol 1-<i>O</i>-méthyl-5-(2-acétoxy-13-hydroxytridecyl) résorcinol 1-<i>O</i>-méthyl-5-(10-hydroxytridecyl) résorcinol 5-(2-acétoxytridecyl) résorcinol 5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol 1-<i>O</i>-méthyl-5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxotridecyl) benzoïque acide 2,4-dihydroxy-6-(2-acétoxytridecyl) benzoïque acide 2,4-dihydroxy-6-(13-hydroxy-2-acétoxytridecyl) benzoïque acide 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(13-hydroxy-2-oxotridecyl) benzoïque (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(11-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>S</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(7-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine (3<i>R</i>)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxotridecyl)-3,4-dihydroisocoumarine 11b-hydroxy-11b, 1-dihydromédicarpine 11b-hydroxy-11b, 1-dihydromaakiaine médicarpine maakiaine acide <i>N</i> 13'-docosénylanthranilique</p>	<p>(Barrero <i>et al</i>, 1994). (Barrero <i>et al</i>, 1998).</p>
<p><i>Ononis speciosa</i></p>	<p>Spécionine spécionine 5-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside spécionine 9-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside 5-(pentadec-8<i>Z</i>-ényl) résorcinol (Cardol monoène) 5-(10-acétoxy-pentadec-8<i>Z</i>-ényl) résorcinol acide 2,4-dihydroxy-6-(pentadec-8<i>Z</i>-ényl) benzoïque acide 2,4-dihydroxy-6-(10-acétoxy-pentadec-8<i>Z</i>-ényl) benzoïque</p>	<p>(Barrero <i>et al</i>, 1989a ; Barrero <i>et al</i>, 1989b)</p>

<i>Ononis serrata</i>	2-(<i>p</i> -hydroxyphénoxy)-6-méthoxy-5,7-dihydroxy-chromone (Capillarisine) 2-(<i>p</i> -hydroxyphénoxy)-5,7-dihydroxy-chromone(6-Déméthoxycapillarisine)	(Amer <i>et al</i> , 2004)
<i>Ononis vaginalis</i>	3,4-di- <i>O</i> -β -D-glucopyranosyl-4-hydroxymedicarpine 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroyl-β-D-galactopyranosyl]-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosylkaempférol	(Shaker <i>et al</i> , 2004)
<i>Ononis spinosa</i>	3- <i>O</i> -[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-Dglucuronopyranosyl]- 3β ,22α-dihydroxyoléane-13-ène-11-one	(Shaker <i>et al</i> , 2004 ; Benedec <i>et al</i> , 2012)
<i>Ononis angustissima</i>	5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (alnétine) 5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (6,7-di- <i>O</i> -methylbaicaleine) 5,6-dihydroxy-7-méthoxyflavone (neglétéine) 5,7-dihydroxyflavone (chrysine) 2',4'-dihydroxychalcone 2'-hydroxychalcone 6-hydroxy-4'-méthoxyaurone	(Bouheroum <i>et al</i> , 2009 ; Mezrag <i>et al</i> , 2013)

I.7. L'espèce *Ononis Alba Poir* :

I.7.1. Description botanique:

On peut la trouver sous différents aspects :

-Plante très visqueuse, stipules plus ou moins semi-circulaire assez commun, particulièrement répandu dans le Tell algéro-contantantinois : Ssp. *Monophylla* (Desf.) Murb.

-Plante peu visqueuse, stipules ovales lancéolées assez rare, rarissime Tell constantinois : Ssp. *Poiretinana* Maire.

-Inflorescences en grosses grappes terminales très denses, larges de 3-6 cm

-Inflorescences à fleurs plus ou moins dispersées sur la tige ou en grappes terminales lâches de moins de 2,5 cm de diamètre.

-Fleurs blanches, Fleurs nettement roses ou blanc-rosé, de 17-20 mm longuement dépassées par les feuilles florales trifoliolées et à folioles lancéolés.

-Plante verte, à sépales et pétioles longuement ciliés. Bractées florales laciniées, scarieuses. (Quezel *et al*, 1962b).



Figure 02: La plante *Ononis Alba* Poir (Encyclopedie botanique collaborative, 2018)

I.7.2. Systématique :

Règne: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Fabales

Famille: Fabaceae

Genre: *Ononis* L.

Espèce : *Ononis Alba* Poir (ILDIS, 2014)

I.7.3. Position géographique de la plante *Ononis Alba* Poir :

Parmi la large gamme des légumineuses les plus connues et les plus consommées, une place particulière peut être accordée à l'espèce *Ononis Alba* Poir.

Cette espèce est présente dans les régions de climat méditerranéen telles que le nord de l'Algérie comme Bejaïa. Elle est également et largement distribuée au Maroc, Tunisie et en Italie (ILDIS, 2011). La distribution géographique de cette plante est présentée dans la figure 03.

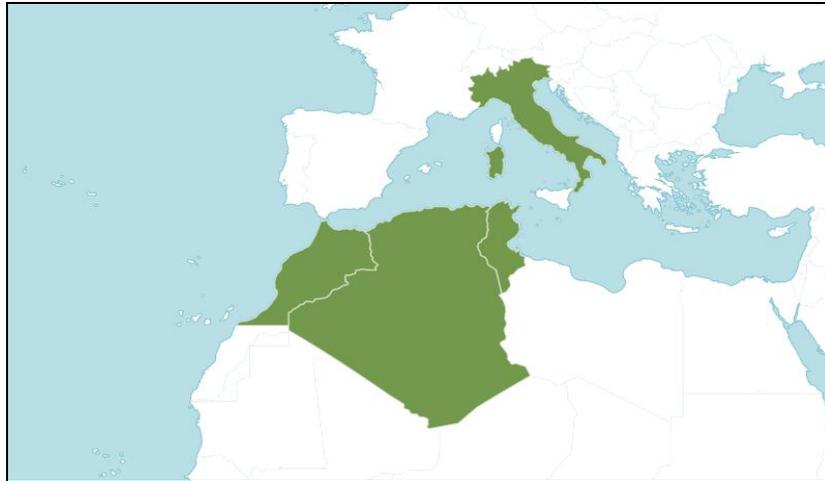


Figure 03: Distribution géographique de la plante *Ononis Alba* Poir (ILDIS, 2011).

CHAPITRE II

METABOLITES SECONDAIRES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

I. Les métabolites secondaires :

Les plantes produisent un grand nombre de composés pour lesquels on ne sait pas toujours le rôle qu'ils jouent pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultants de réactions chimiques ultérieures, on les appelle donc métabolites secondaires (**Chalandre, 2000**).

Beaucoup de métabolites secondaires sont aussi important pour notre alimentation (goût, couleur..) et d'autres parmi eux les alcaloïdes, et les flavonoïdes, ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutique et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et insecticides. Cette appréciation croissante des effets biologiques hautement diversifiés de ces produits naturels a permis une ré-évaluation des rôles joués par ces composés chez les végétaux, surtout dans le contexte des interactions écologiques (**Croteau et al 2000**).

I.1. Les composés phénoliques :

I.1.1. Généralité et structure :

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phyto-micronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai et Mumper, 2010**).

Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et al, 2000**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (Figure 04), libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Ils sont communément subdivisés en acides

phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (Cheynier, 2005).

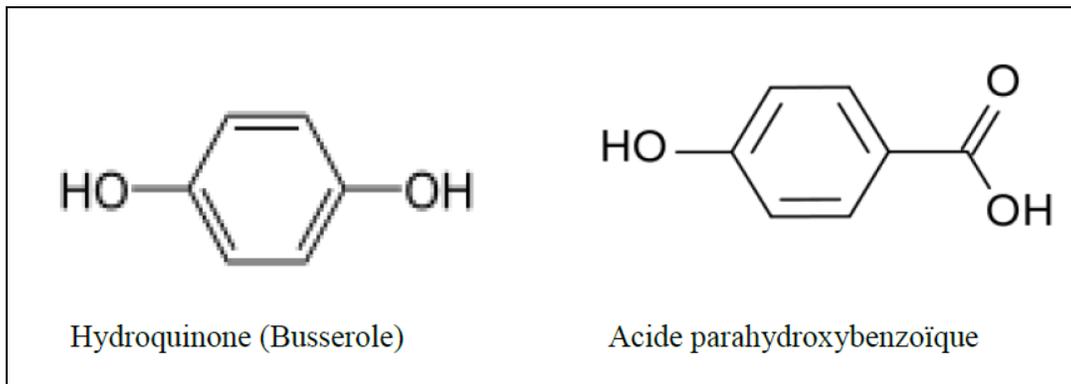


Figure 04: Structure générale des polyphénols (Bruneton, 1999).

I.1.2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Clifford, 1999; D'Archivio et al 2007).

I.1.2.1. Polyphénols simples :

I.1.2.1.1. Acides phénoliques :

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque ou acide hydroxybenzoïque (C_6-C_1) et cinnamique ou l'acide hydroxycinnamique (C_6-C_3) (Bruneton, 2008). (Figure 05).

- *Dérivés de l'acide benzoïque :*

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (Skerget et al, 2005 ; Bruneton, 2008).

Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (Manach et al, 2004) (Figure 05).

- *Dérivés de l'acide cinnamique :*

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés (Skerget *et al*, 2005). et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Bruneton, 2008) (Figure 05).

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique) (Manach *et al*, 2004). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans les pommes (430 mg/kg) (Podsedeck *et al*, 2000) et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg (Manach *et al* 2004).

- *Phénols simples :*

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

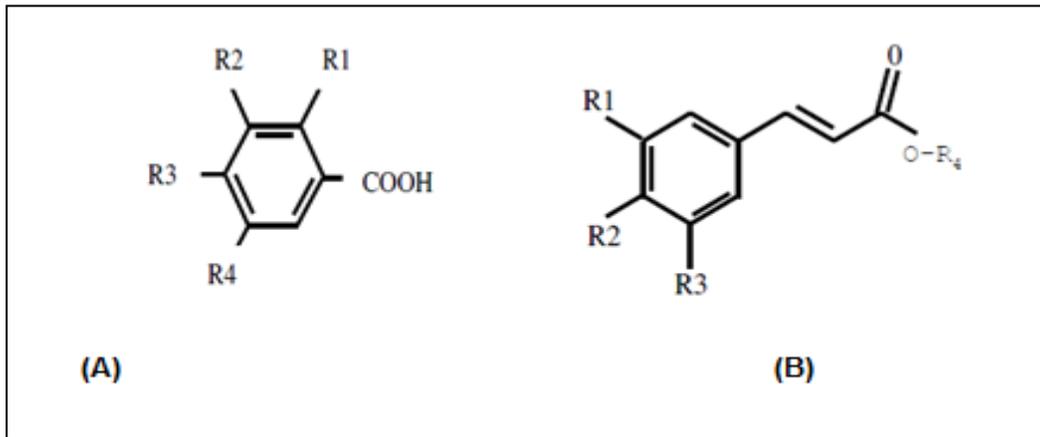


Figure 05 : Structures chimiques (A) des acides hydroxybenzoïques, (B) des acides hydroxycinnamiques (Han *et al*, 2007; Bruneton, 2008 ; Chira, 2008).

I.1.2.1.2. Les flavonoïdes:

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus étudié de polyphénols. Ce groupe a une structure basique commune consistant à un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane (**Pandey et Rizv, 2009**) (Figure 06).

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (**Crozier, 2003**).

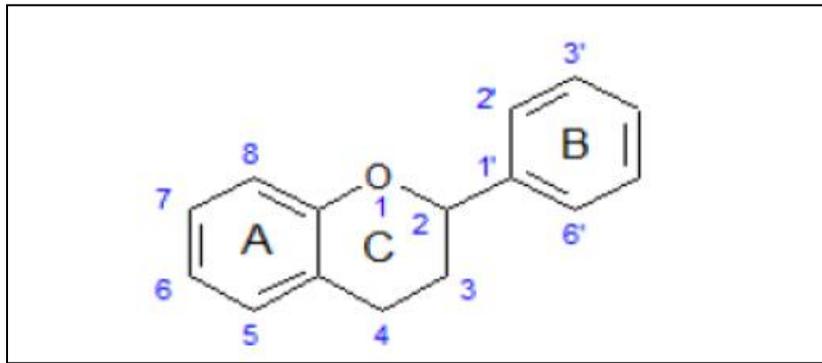


Figure 06: Squelette de base des flavonoïdes (**Crozier, 2003**).

I.1.2.1.2.1. Différentes classes de flavonoïdes :

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes (voir figure 07), dont les principales sont :

- *Flavanones* : Sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C₂ et C₃ et par la présence d'un centre de chiralité en C₂ (**Bruneton, 2008; Chira, 2008**). Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones (**Manach et al, 2004**).
- *Flavanols* : Ils se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C₃ et d'une double-liaison entre C₂-C₃. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides (**Crozier, 2003**). Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche), le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg) de matière fraîche (**Hertog et al 1992 ; Manach 1998**).
- *Flavan-3ols* : Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces Composés vont de simples monomères, (+)-catéchine et son isomère (-)-

épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, ils peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatéchine gallate) (Chira, 2008). Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu'à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l'abricot (Arts et al, 2000; Arts et al, 2000).

- *Anthocyanidines* : Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin (Kořir, 2004). Les composés les plus courants sont la pélargonidine, la cyanidine et la malvidine (Ribeiro, 1999 ; Vitrac et al , 2005). De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélargonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge (Fossen et al ,1996).

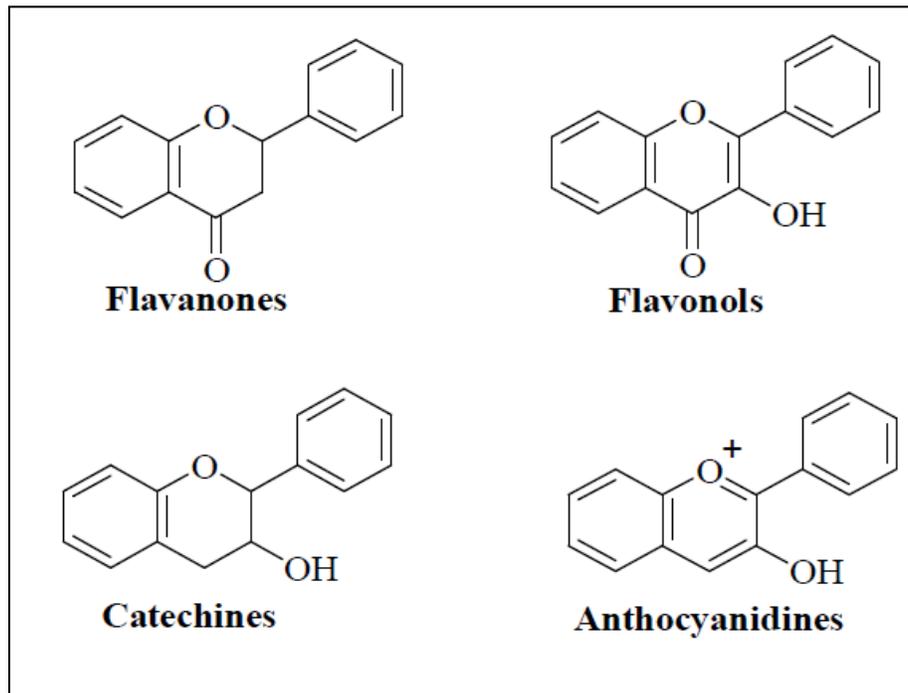


Figure 07 : Structure chimique de quelques flavonoïdes (Bouchouka, 2016).

I.1.2.2. Polyphénols complexes :

I.1.2.2.1. Tanins :

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols. Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés poly-phénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines (**Paris et Hurabeillen, 2008**), d'où leur capacité à tanner le cuir.

On les trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...).

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Sur le plan structurel, les tanins sont formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**). Cette structure divise les tanins en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Figure 08) (**Linden et Lorient, 1994**).

- *Tanins hydrolysables* : Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitanins (**Bruneton, 1993; Cowan, 1999**). Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

- *Tanins condensés (TC)*: Les tanins condensés ou les proanthocyanidines se différencient fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes.

Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (**Bruneton, 1999 ; Bruyne et al, 1999 ; O'Connell et Fox 2001**).

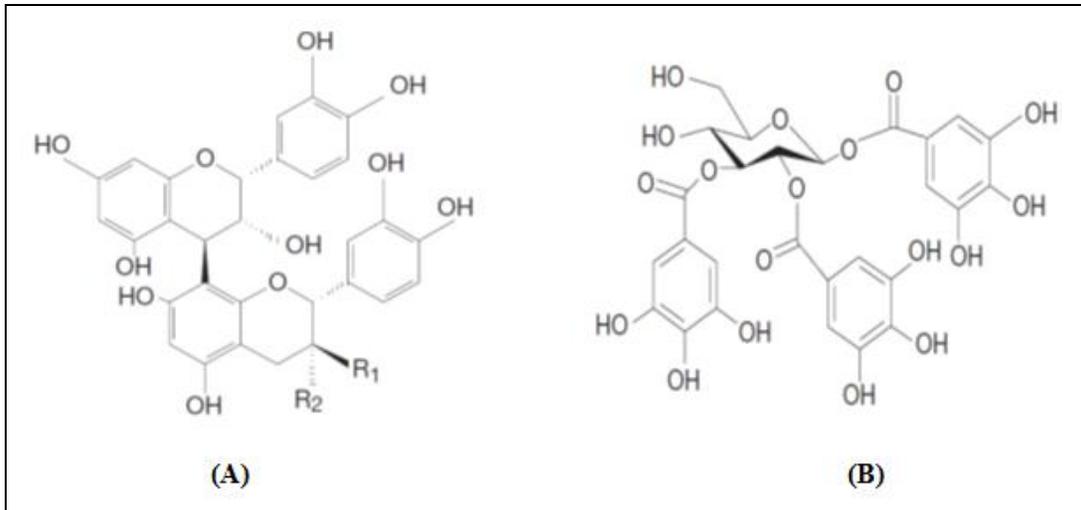


Figure 08: Structure chimique (A) Tanin condensé (proanthocyanidine), (B) Tanin hydrolysable (gallotanin) (Derbel et Ghedira, 2005).

I.1.3. Localisation des polyphénols dans les plantes et intérêt :

Les cellules végétales répondent au stimulus environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression. Lorsque la plante soumise à des blessures mécaniques, des composés phénoliques et phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (Fleurit et Macheix, 1997).

À l'échelle cellulaire, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule.

Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (Bénard, 2009).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des

organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (**Bénard, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (**Dicko et al, 2006**). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux (**Robert et Catesson, 2000**).

I.1.4. Propriétés des composés phénoliques :

Les anciens travaux (**Alibert et al, 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nouveaux processus physiologiques: croissance, différenciation, organogénèse, floraison et tubérisation.

Les flavonoïdes et d'autres polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des besoins dépendent de la teneur en polyphénols (**Lugasi et al, 2003**).

L'astringence est due au tanin catéchétique qui précipitent les protéines salivaires, entraînant avec elles de nombreuses molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale. Les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non murs, les flavanes sont responsables à l'amertume des citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dubois et al, 1977**).

Certaines hypothèses suggèrent que l'investissement métabolique pour la synthèse des tanins, nécessaires en quantité relativement importante pour exercer des effets toxiques significatifs, serait plus important que celui nécessaire aux systèmes de défense allélo-chimique basés sur la production de petites quantités de toxines très actives, comme les alcaloïdes (**Lebreton, 1982**).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs, issus des flavonoïdes, représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que les flavanols et flavanones interagissent avec les anthocyanes pour altérer par co-pigmentation de la couleur des fleurs et des fruits (**Brouillard et al, 1977**).

II. Activités biologiques des composés phénoliques :

Les activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés sont dues essentiellement à la fraction d'huile essentielle et aux composés phénoliques contenues dans les plantes.

L'activité antioxydante, une des activités les plus intéressantes et les plus recherchée dans les extraits de plantes, a constitué la base de nombreuses applications incluant les procédés de conservation des aliments et les thérapies naturelles.

Pour ces raisons, l'étude des activités biologiques des substances issues des plantes en vue de leurs applications à l'alimentation ou la santé humaine demeure une tâche intéressante et utile.

II.1. L'activité antioxydante :

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année une attention et un engouement considérable et plusieurs de leurs propriétés biologiques font l'objet de nombreuses études non exhaustives (**Manach et al, 2004 ; Djeridane et al, 2005**). Une des raisons primordiales est la reconnaissance de leur propriété antioxydante, ainsi qu'à leur implication dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydatif (**Akagawa et Suyama, 2001**). Ils ont une valeur commerciale très importante surtout dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique en tant que puissants antioxydants naturels (**Mompon et al, 1998**) particulièrement les flavonoïdes qui sont des piègeurs efficaces de radicaux libres les plus prooxydants (**Meddleton et al, 2000**).

Leur intervention se fait assez souvent à plusieurs niveaux : piégeages de radicaux libres (**Saint-Cricq de Gaulejac et al, 1999**), chélation de métaux pro-oxydants par les groupements hydroxyles, et par inhibition de certains enzymes (**Pulido et al, 2000**).

II.2. Activité antimicrobienne :

L'intérêt pour l'utilisation des plantes dans des domaines non alimentaires, est de plus en plus affirmé après avoir découvrir leurs vertus thérapeutiques, et le fait que les antibiotiques traditionnels sont devenus inopérants (**Hernandez et al, 2004 ; Zampini et al, 2005**) a ouvert une porte à de nouveaux débouchés et axes de recherche sur des antimicrobiens et d'autres remèdes dérivants des plantes (**Papadopoulou et al, 2004 ; El- Fatimi et al, 2007**).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes, est souvent corrélée avec leur teneur en métabolites secondaires tels les polyphénols (**Bahorun, 1997**).

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques attestent le rôle incontestable des composés phénoliques dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes voir même toxiques, fongicides et antibiotiques (**Mompon et al, 1998 ; Drewnowski et Gomez-Carneros, 2000**). Ces métabolites secondaires peuvent conduire à la diminution de l'activité enzymatique ainsi qu'à la croissance microbienne (**Karou et al, 2004**).

L'étude de certaines activités biologiques des polyphénols (**Choi et al, 2006**) signalent que les composés phénoliques sont même capables à neutraliser des toxines bactériennes grâce à plusieurs travaux entrepris ces dernières années.

-D'après **Cowan (1999)** les acides caféique et cinnamique sont très efficaces contre les virus, les bactéries et les champignons.

-Les propriétés antibactériennes des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont été mises en évidence (**Miller et al, 1995 ; Pupponen-Pimiä et al, 2001**) ils atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire de plusieurs virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (**Middleton et al, 2000**).

-Quant aux tanins plusieurs travaux ont démontré leurs toxicités vis à vis des champignons filamenteux, levures et bactéries et certains d'entre eux sont même capables d'inhiber la réplication de quelques virus (**Henis et al, 1964 ; Scalbert, 1991**).

II.3. Action sur les enzymes :

Les composés phénoliques sont capables d'affecter et d'inhiber le système enzymatique de nombreux enzymes (**Middleton et al, 2000**). Ils sont considérés comme des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de nombreux biocatalyseurs (**Cowan, 1999**). Ils sont capables de se complexer avec les protéines et par voie de conséquence bloquer les sites actifs des enzymes en inhibant ainsi leur activité (**Haslem, 1998 ; Huang et al, 2004**).

Tout comme les tanins condensés, les tanins hydrolysables ont la capacité de se complexer avec les protéines. Ce processus peut inhiber et/ou immobiliser les enzymes microbiennes (**Maie et al, 2003**).

En effet, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase, une source biologique importante du radical superoxyde, et par conséquent régesser la maladie de la goutte en réduisant

à la fois les concentrations en acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains **(Hansaki, 1994)**.

D'autres études ont montré que les polyphénols sont capables à inactiver l'histidine décarboxylase, l'aldose réductase, la NADPH oxydase, la protéine kinase C, des enzymes de l'inflammation telles que la cyclo-oxygénase, la lipo-oxygénase, et la phospholipase A₂ **(Middleton et al, 2000 ; Derbel et Ghedira, 2005)**.

PARTIE II

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I. Objectif du travail :

L'espèce choisie est une plante qui n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et de dépistage d'activités biologiques précédente. La plante est nommée *Ononis Alba* Poir, récoltée de la commune de Chemini de la wilaya de Bejaâ.

Ce travail a pour but de rechercher de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans cette espèce en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes médicinales endémiques.

La présente étude a été effectuée au niveau du Centre de recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine pendant un stage qui a duré environ trois mois (Mars-Mai) répartis entre les différents laboratoires de recherche.

II. Matériel et méthode:

II.1. Matériel végétal:

Les parties aériennes de la plante ont été récoltées au mois de juin 2018 pendant la période de floraison. La récolte de la plante a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. L'identification a été confirmée par le botanicien, en l'occurrence Mr Khellaf Rebbas du département de biologie de l'Université de M'Sila.



Figure 09 : Parties aériennes de la plante *Ononis Alba* Poir.

II.2. Préparation de la poudre végétale :

La plante utilisées dans cette étude a subi un nettoyage et lavage à l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'impuretés, puis séchée à l'air libre pendant 5 jours, ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique (MICROTRON MB 800 B Wiley mill) afin de pouvoir récupérer une poudre

fine et homogène. La poudre obtenue (70g) a été ensuite conservée dans des récipients et stockée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

II.3. Étude phytochimique:

II.3.1. Détermination de la de la Matière sèche:

La méthode utilisée est la méthode de dessiccation par évaporation (**Audigie et al, 1978**). On a procédé à une dessiccation d'un échantillon de 1g à la température de 105°C dans une étuve ventilée (MEMMERT) jusqu'à poids constant. La teneur en eau est définie comme la perte de masse et calculée, dans les conditions expérimentales, selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (H\%)} = ((M_i - M_f) / P) * 100$$

Où :

H% : Teneur en eau ou humidité.

M_i : Masse initiale (avant dessiccation).

M_f : Masse finale (après dessiccation).

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche est calculée comme suit :

$$\text{Matière sèche (MS\%)} = 100 - H\%$$

II.3.2. Détermination de la matière organique et minérale:

La méthode utilisée est la méthode de minéralisation par calcination (**Laurent, 1991**). Elle consiste à un passage au four à moufle (THERMO-SCIENTIFIC -THERMOLYNE) de 1 g d'échantillon broyé dans une capsule tarée à une température de 550°C, jusqu'à destruction totale de toute particule carbonneuse (couleur grise claire ou blanchâtre) pendant 8 heures. La perte de poids, après calcination, représente la matière organique. Cette teneur est calculée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en matière organique (MO\%)} = ((M_i - M_f) / P) * 100$$

Où :

MO% : Teneur en matière organique.

M_i : Masse initiale (avant calcination).

M_f : Masse finale (après calcination).

P : Masse de la prise d'essai.

Le taux des cendres est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Taux de cendres (C\%)} = 100 - \text{MO\%}$$

II.3.3. Détermination de la matière grasse :

La détermination de la teneur en matière grasse a été faite par Soxhlet (SOXTEC™ 2043) suivant la méthode (**méthode officielle AOAC (1997)**). Une quantité de 1 g de l'échantillon est placée dans une cartouche de cellulose préalablement tarée qui est ensuite placée dans un extracteur. Un volume de 25 ml d'hexane est mis dans des creusets préalablement tarés. L'extraction faite par ébullition du solvant et condensation de ses vapeurs par un réfrigérant, a duré environ 1 heures, et l'hexane est récupéré dans le rotavapeur. Les résidus de solvant ont été éliminés complètement par séchage à l'étuve. Ensuite, les creusets sont refroidis dans un dessiccateur et pesés de nouveau. La teneur en matière grasse est calculé par :

$$\text{MG(\%)} = (P_2 - P_1) * 100 / P_0$$

P₀ : Prise d'essai de l'échantillon.

P₁ : poids du ballon à vide.

P₂ : poids du ballon contenant l'extrait gras.

II.3.4. Détermination des matières azotées totales :

La matière azotée de l'Ononis a été déterminée en utilisant l'appareil de Kjeldahl (FOSS TECATOR™ DIGESTOR AUTO) Le dosage de l'azote débute par une étape de minéralisation qui consiste à introduire dans un matras (fiolle) 1 g de poudre de la plante avec 0.2 g de sulfate de cuivre comme catalyseur. Ensuite un volume de 10 ml d'acide sulfurique concentré (95-97%) est ajouté. Après 15 mn, le mélange est placé dans un minéralisateur à une température de 420°C jusqu'à avoir une solution limpide. Ensuite, 50 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 35% et 50 ml d'eau distillée sont ajoutés au mélange après refroidissement du minéralisât.

Une étape de distillation est réalisée dans un distillateur semi-automatique (BUCHI/Distillation Unit K-355) où le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une fiolle de 100 ml contenant 25 ml d'acide borique à 4 % et l'indicateur de Tashiro (indicateur coloré obtenu en mélangeant 0.2 g de rouge de méthyle avec 0.1 g de bleu de méthylène dans 100 ml d'éthanol à 95%). L'excès d'ammoniac est alors neutralisé par l'acide sulfurique 0.05 N.

Le blanc est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales. La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Azote(\%)} = (\text{T-B}) * 14 * \text{N} * 100 / \text{P}$$

T : Volume de l'acide sulfurique lu après titrage de l'échantillon (ml).

B : Volume de l'acide sulfurique dépensé pour le titrage du blanc (ml).

N : Normalité de l'acide sulfurique utilisé pour le dosage.

P : Poids de l'échantillon en mg.

II.4. Préparation des extraits :

Les feuilles et les fleurs de la plante ont fait l'objet de cette partie d'étude. La préparation des extraits est précédée par une phase de macération suivie d'une séparation des différentes fractions.

II.4.1. Macération : l'extraction solide-liquide (ESL) :

L'extrait brut est préparé par la technique de macération (Falleh et al, 2008) en couvrant une quantité bien définie (70g) de la poudre végétale sèche avec système de solvant (MeOH/ H₂O, 70/30, v/v) répété trois fois pendant 72 h avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les extraits ainsi obtenus sont ensuite combinés, filtrés puis concentrés sous pression réduite à 40°C par un évaporateur rotatif (Rotavapor R-215.BUCHI, Switzerland).

II.4.2. Séparation : par la technique liquide-liquide (ELL) :

D'une manière générale, l'extraction liquide-liquide est une technique qui permet la séparation de deux ou plusieurs constituants en tirant profit des différences de leur distribution dans deux liquides pratiquement non miscibles (Outil, 2015). Elle consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique ou inversement (Messikh, 2008).

L'extrait brut issu de l'étape précédente est totalement dissous dans 150 ml de l'eau distillée (1/3, v/v) en utilisant un sonicateur (Ultrasonic GRANT). La solution aqueuse ainsi obtenue a subi une série des séparations par des solvants de polarité croissante, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. La séparation des phases est obtenue par décantation gravimétrique sur la base du coefficient du partage de chaque soluté. Les trois fractions organiques récupérées sont, par la suite, concentrées sous pression réduite à 40°C dans un rotavapeur (Rotavapor R. 215. BUCHI, Switzerland), séchées à l'air libre puis conservées pour les analyses quantitatives.

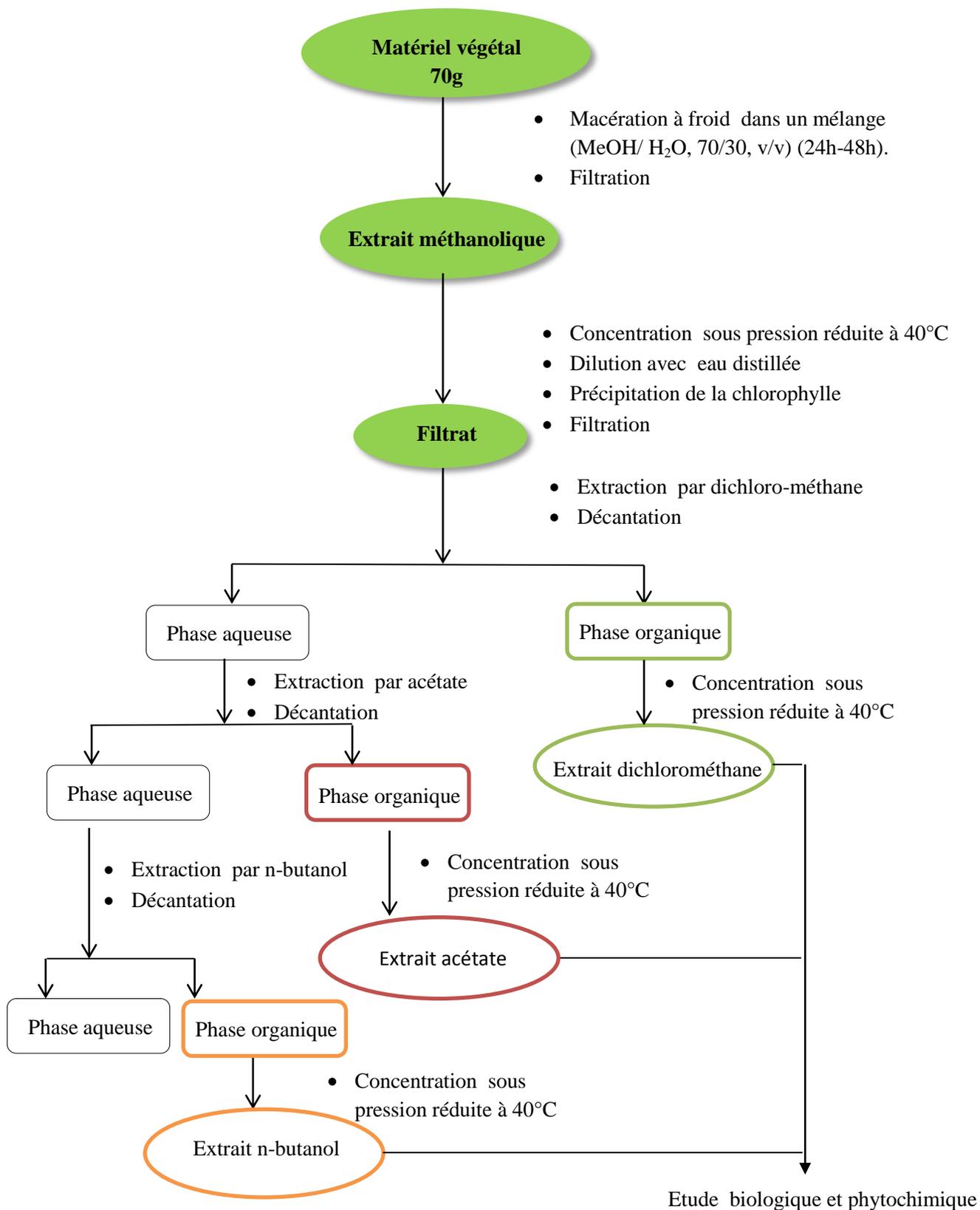


Figure 10 : Protocole d'extraction.

II.5. Analyse quantitative :

II.5.1. Dosages des polyphénols totaux :

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux des extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et celui butanolique) de l'*Ononis Alba* Poir a été faite par la méthode colorimétrique, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**).

L'extrait est préparé par dissolution de 1 mg d'extrait dans un volume de 1 ml d'eau distillée ou du méthanol. Dans un tube eppendorf, 20 µl de chaque extrait préparé est introduit avec 100 µl de la solution de Folin Ciocalteu diluée de 10 fois. Après 3 min, 75 µl d'une solution de Na₂CO₃ (7.5 %) est rajoutée avec agitation. L'ensemble est incubé à l'obscurité à une température ambiante pendant 2 heures.

La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à 760 nm. Les résultats sont repris trois fois et comparés à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique comme étalon dans les mêmes conditions expérimentales (voir annexe 1).

La concentration des polyphénols a été déterminée par la formule suivante (**Singleton et al, 1999**) :

$$T = C \times (V \times D / Ps)$$

T : Teneur en phénols totaux.

C : Concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe.

V : Volume de l'extrait.

D : Facteur de dilution.

Ps : Poids de la matière sèche.

II.5.2. Dosages des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode de Topçu et ses collaborateurs (**2007**) basée sur la formation d'un complexe entre Al⁺³ et les flavonoïdes qui forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Aluminium) (**Ribereau-Gayon, 1968**).

L'extrait est préparé par dissolution de 1 mg d'extrait dans un volume de 1 ml du méthanol . Dans un tube eppendorf, 50 µl de chacun des extraits sont mélangés, sous agitation modérée, avec 130 µl méthanol, 10 µl de la solution d'acétate de potassium (1M), 10 µl de la solution d'Al(NO₃)₃.9H₂O (10% dans de l'eau distillée). Après 40 min d'incubation, l'absorbance est lue

à 415 nm. Les résultats en triplicata sont obtenus en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec de la quercétine comme étalon dans les mêmes conditions expérimentales (annexe 1).

II.5.3. Dosages des tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. La vanilline réagit avec les flavan3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde (**Price et al, 1978**).

Dans une fiole jaugée, 1 ml de l'échantillon, préparé dans le méthanol, est mélangé avec 5ml du réactif d'analyse (2,5 ml de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 ml de la solution du HCl à 8%. Après 1 min d'agitation, 5ml de la solution HCl à 4% est ajoutée. L'erenmeyer est ensuite introduit au bain marie à 30°C et laissé pendant 20 min d'incubation. La lecture des absorbances est faite à 500 nm (**Hagerman, 2002**).

Les résultats obtenus sont comparés à l'équation issue de la courbe d'étalonnage faite avec de la catéchine (annexe 1).

II.5.4. Dosages des sucres totaux :

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode du phénol / acide sulfurique (**Dubois et al, 1956**). Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol.

Dans un tube eppendorf, on introduit 200 µl de chaque extrait, 200 µl de la solution de phénol (5%). 1 ml d'acide sulfurique à 95% sont ajoutés à l'aide d'une pipette graduée. Les tubes sont soigneusement agités et maintenues dans l'étuve pendant 5mnt à 100°C. Après séjour de 30 mn à l'obscurité, les mesures d'absorbance sont effectuées à 490 nm.

Les résultats obtenus sont comparés à l'équation issue de la courbe d'étalonnage faite avec de le glucose (annexe 1).

II.6. Évaluation des différentes activités biologiques :

II.6.1. Activité antioxydante :

II.6.1.1. Test du piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée par la méthode du radical libre DPPH (Blois, 1958). En présence des piègeurs de radicaux libres, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Maataoui et al, 2006).

Pour chaque échantillon, 40 µl d'extrait dilué dans du méthanol est ajouté à 160 µl de solution de 0,4 mM de DPPH. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité. Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH.

Le BHA et le BHT et l' α -tocophérol ont été utilisés comme normes antioxydantes, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés.

-Calcul du pourcentage de l'inhibition I% :

La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. Le pourcentage de l'inhibition du radical DPPH est déterminé par la formule de Miliauskas et al (2004).

$$\%INH = [(Absorbance\ du\ blanc - absorbance\ de\ l'échantillon) / Absorbance\ du\ blanc] \times 100.$$

-Calcul de la concentration IC50 :

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Elle est calculée graphiquement pour chaque extrait par analyse de régression linéaire (Merouane et al, 2014; Shang et al, 2018).

II.6.1.2. Test de réduction du cuivre (CUPRAC):

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée aussi par la méthode de CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) décrite par Apak et al., 2004, elle est basée sur la suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu²⁺) [Nc₂ – Cu²⁺]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al., 2004).

Pour chaque échantillon végétal et pour chaque concentration, 40 µl extrait dans du méthanol est additionné à 60 µl de solution de 1 M de tampon d'acétate dans (pH = 7,0) et 50 µl de solution méthanolique de 7,5 mM de Neocuprine ; 50 µl de solution de 10 mM de chlorure de cuivre Cu(II) ont été ajoutés par la suite. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 1 heure à l'obscurité à température ambiante : à la longueur d'onde de 450 nm. Le contrôle négatif (blanc) a été préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. Le BHAb et le BHTb ont été utilisés comme normes anti-oxydantes, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. Les résultats ont été calculés à titre de A0.5 (µg / ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

II.6.2. Activités enzymatiques :

II.6.2.1. Activité inhibitrice de l'α amylase:

L'activité inhibitrice de l'α-Amylase des différents extraits a été déterminée en utilisant la Méthode de l'Iodine/Iodure de potassium (IKI) (Zengin et al, 2014).

Pour chaque échantillon, Un volume de 25 µl de la solution d'extraits a été mélangée avec 50 µl d'une solution d'α-Amylase (1U) préalablement préparée dans du tampon phosphate (6 mM, pH 6.9), placé dans les puits de la microplaque et incubé pendant 10 min à 37 °C. Après l'incubation, la réaction est déclenchée par l'ajout de 50 µl de solution d'amidon à 0,1%.

Un blanc est préparé et incubé dans les mêmes conditions. La réaction est ensuite arrêtée par l'addition de 25 µl HCl à 1 M. Ensuite, 100 µl de la solution d'iode-iodure de potassium est ajoutée au mélange. L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 630 nm. L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon et l'activité inhibitrice de l'α-Amylase a été exprimée par rapport à celle de l'acarbose. (Randhir et Shetty, 2007 ; Zengin et al, 2014).

Calcul de pourcentage d'inhibition se fait suivant la formule :

$$\%INH=1-[(Ac-Ae)-(As-Ab)/(Ac-Ae)]$$

Où:

Ac : Absorbance (Amidon+IKI+HCl+Solvant +Tampon).

Ae : Absorbance (Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ Solvant).

As : Absorbance (Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl).

Ab : Absorbance (Extrait+IKI+125µl de tampon).

II.6.2.2. Activité inhibitrice de l'α-glucosidase:

L'activité inhibitrice de l' α-glucosidase des différents extraits a été déterminée par la méthode de **Sinéad et al (2014)**.

Pour chaque échantillon, 50 µl de la solution d'extrait a été mélangée avec 100 µl d'une solution d'α-glucosidase (0.1U/ml) dans du tampon phosphate (pH 6,9 ; 100 mM). Ensuite, 50 µl de solution de substrat de 5 mM préparé dans du tampon phosphate (pH 6, 9 ; 100 mM) est ajoutée puis incubé pendant 10 min à 37°C. Après l'incubation. De la même manière, un blanc a été préparé en ajoutant une solution de d'échantillon à tous les réactifs de réaction sans enzyme (α-glucosidase) en solution.

Le contrôle a été préparé en ajoutant solvant de l'extrait à tous les réactifs avec l'enzyme. Les absorbances du blanc et du contrôle ont été lues par spectrophotomètre à 405 nm à 37 °C, chaque 10 min, sur une durée de 30 min. L'absorbance du blanc a été soustraite de celui de l'échantillon et l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase a été exprimée en se référant à l'acarbose.

-Calcul de pourcentage d'inhibition :

$$\% \text{ INH} = [(\text{Abs de l'extrait} - \text{Abs de Blanc}) / \text{Abs de contrôle}] \times 100$$

Contrôle : Enzyme + Substrat + Solvant de l'extrait.

Blanc : Substrat + Extrait + Tampon de l'enzyme.

II.6.3. Activité anti-microbienne

II.6.3.1. Test antifongique :

L'activité antifongique a été testé à l'égard du champignon phytopathogène, *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici qui nous a été fourni par le laboratoire de Mycologie du C.R.Bt sur un milieu de culture PDA après 7 jours d'incubation à 28°C. La méthode du milieu empoisonné est utilisée pour tester la sensibilité de la souche fongique vis-à-vis les différents extraits. Pour préparer 1L de PDA, 200g pomme de terre, 20g dextrose et 20g Agar sont nécessaires.

L'activité inhibitrice des différents composés, sur la croissance du mycélium de l'agent phytopathogène, est déterminée en mesurant la croissance radiale du champignon sur un milieu PDA (pomme de terre, dextrose, Agar) contenant les extraits à tester (1mg d'extrait dilué dans 1ml de la solution DMSO), préalablement stérilisé puis distribué dans 4 boîtes de Pétri.

Le témoin positif est considéré comme étant le milieu contenant 1 ml de DMSO sans extrait alors que le témoin négatif contient que du PDA sans aucune addition (**Song et al, 2004**).

Expérimentalement, un disque de 5 mm de diamètre provenant d'une jeune culture fongique est déposé de manière aseptique au centre de la boîte de Pétri. L'expérience est répliquée 4 fois pour chaque extrait de plante.

Après 7 jours d'incubation à 28 °C, la croissance mycélienne des agents phytopathogènes est mesurée à l'échelle millimétrique. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque champignon pour chaque complexe, par rapport au diamètre moyen des colonies de chaque champignon cultivé dans un milieu témoin. Ainsi, l'activité d'inhibition a été exprimée en pourcentage et a été calculée selon la formule suivante:

$$\%INH = [(C - T) / C] \times 100$$

Où ;

I : Taux d'inhibition en %.

C : Croissance radicale de l'agent pathogène en mm sur milieu PDA avec DMSO (témoin).

T : Croissance radicale, en mm, de l'agent pathogène.

II.6.3.2. Test antibactérien :

Les souches bactériennes utilisées dans ce test sont au nombre de deux : *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

Ce test a été effectué selon la méthode de diffusion des puits décrite **par Cooper et Woodman (1946)**, reprise par **Shroder et Messing (1949)**. Cette méthode consiste à découper des trous circulaires (puits) dans la gélose et y verser l'extrait de concentration connue. L'extrait diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose ensemencée avec la suspension bactérienne (**Eymard, 2003**).

Comme première étape, les souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées.

Ensuite, des colonies bien séparées des souches bactériennes étudiées sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et homogénéisées dans 5 ml d'eau physiologique.

-La gélose Muller Hinton est coulée et répartie dans des boîtes de pétri stériles. Ces dernières sont séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi. Puis, un ensemencement est réalisé par écouvillonnage en stries serrées de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les boîtes.

-Des trous circulaires sont découpés dans la gélose de chaque boîte de pétri formant des puits. Ces derniers sont imbibés de 20µl d'extrait à tester à des concentrations différentes. Des puits imprégnés de diméthylsulfoxyde (DMSO) vont servir comme témoin négatif. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour des puits contenant la substance inhibitrice testée (**Boumaza, 2011**). La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'une règle (mm), ce qui détermine la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (**Benkiki, 2006**).

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude phytochimique :

I.1. Caractérisation physico-chimique :

Afin de valoriser la plante choisie, il faudrait tout d'abord identifier sa composition chimique et estimer la teneur des composés d'intérêt. Pour cela, une caractérisation physico-chimique a précédé l'étude phytochimique et biologique de la plante .

Le tableau 2 présente la composition phytochimique (la matière sèche, grasse, azotée totale, organique et la teneur en cendres) des poudres d'*Ononis Alba* Poir.

La matière sèche d'*Ononis alba* Poir est ($90,96 \pm 0,03\%$ de la matière totale) donc elle est pauvre en eau (soit $9,04 \pm 0,03\%$ en base humide, ces teneurs en eau sont relativement faibles et assurent à la plante une plus grande stabilité et par conséquent un stockage assez long).

Cette plante renferme une faible teneur en matière grasse ($2,68 \pm 0,13\%$) et en matière azotée ($1,94 \pm 0,48\%$) et donc elle peut être pauvre en protéine, par contre elle est très riche en matière organique ($95,62 \pm 0,25\%$), La teneur en cendres totales a été évaluée à $4,37 \pm 0,25\%$ pour la partie aérienne cette analyse permet d'informer sur la teneur en minéraux, ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques.

Tableau 2 : Caractérisation physicochimique d'*Ononis Alba* Poir.

	MS	MG	MAT	MO	Cendres
Teneur (%)	$90,96 \pm 0,03$	$2,68 \pm 0,13$	$1,94 \pm 0,48$	$95,62 \pm 0,25$	$4,37 \pm 0,25$

MS : matière sèche. **MG:** Matière grasse. **MAT :** Matières azotées totales. **MO :** matière organique.

I.2. Analyse quantitative :

Les résultats de l'analyse quantitative des différents extraits bruts, pour leur contenu en flavonoïdes, polyphénols, tanins condensés et sucre totaux sont exprimés respectivement en termes d'équivalents de la quercétine, l'acide gallique, la catéchine et le glucose à l'aide d'une courbe étalon (voir annexe 1). Les résultats de l'analyse sont résumés dans le tableau (3) et sont représentés sur la figure (11).

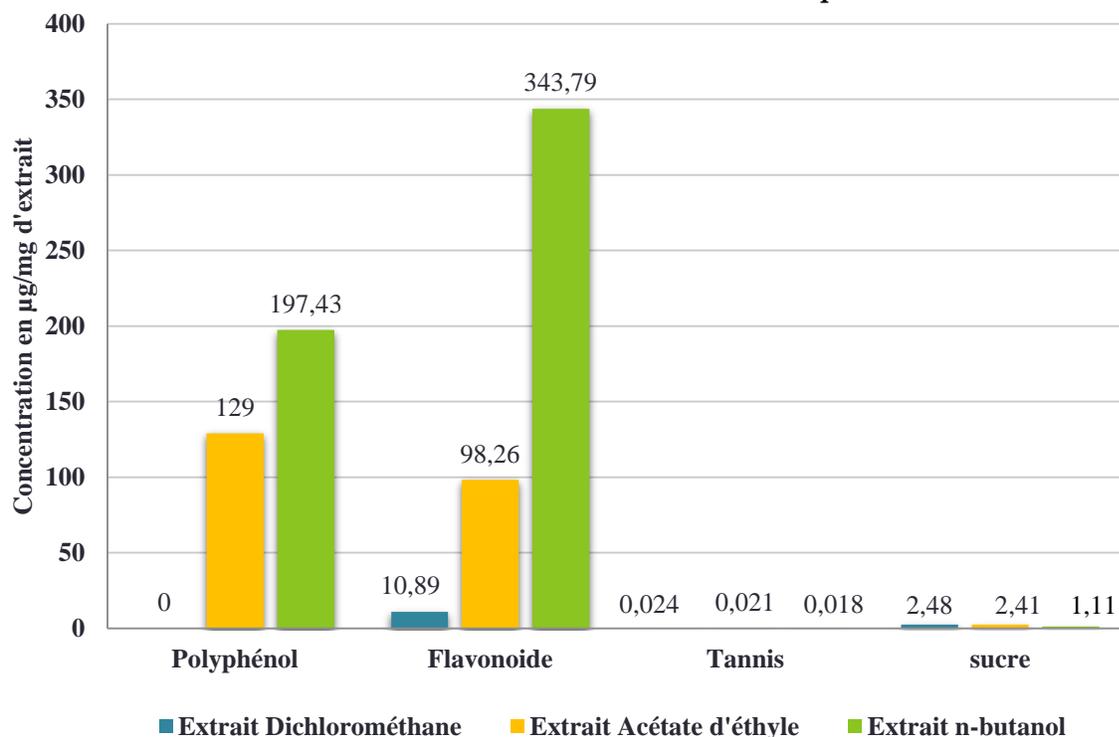


Figure 11 : Composition phytochimique de l'Ononis

L'histogramme montre que l'extrait butanolique est plus riche en flavonoïdes et en polyphénols que l'extrait acétate d'éthyle et celui dichlorométhane, ce dernier est le plus pauvre en flavonoïde et n'a montré aucune trace de polyphénol. Le dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu donne une estimation générale et brute de tous les composés phénoliques d'un extrait et il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha et al, 2007). Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (Prior et al, 2005). De ce fait, les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considérés comme étant les antioxydants les plus performants.

En ce qui concerne les tanins condensés, on peut remarquer que les trois extraits montrent une très faible teneur en TC, représentée sous forme de traces. Le taux des tanins dans une plante dépend de deux facteurs principaux : le stade de développement végétatif et les conditions environnementales. Leur concentration varie considérablement entre les différentes espèces végétales et au sein de la même espèce où elle dépend du degré de maturité, de l'âge des feuilles, des fleurs et de la saison (Skadhauge et al, 1997).

Pour les sucres totaux, on peut constater que cette espèce d'Ononis contient une faible quantité de sucre qu'on peut l'observer légèrement dans le cas d'extrait dichlorométhane et acétate d'éthyle.



Figure 12 : Schéma de la plaque de dosage des polyphénols et flavonoïdes .

II. Activités biologiques :

II.1. Activité antioxydante :

II.1.1. Test du DPPH :

On remarque un changement de couleur du violet au jaune, notamment pour l'extrait n-butanol et acétate d'éthyle en augmentant leur concentration, cela veut dire que le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est réduit en présence d'une substance réductrice qui existe dans ces deux extraits, plus la substance est antioxydante et plus la coloration violette initiale disparaîtra. Le contrôle est de couleur violette car le DPPH est un radical stable de couleur violette en solution.

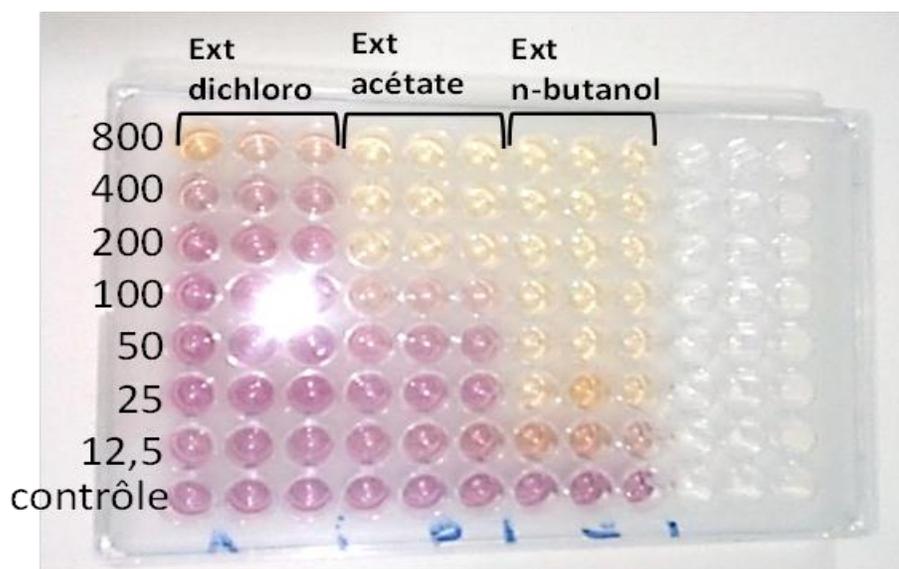


Figure 13: Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH).

Les résultats obtenus, à une longueur d'onde de 540 nm par spectrophotomètre, ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et des standards (Figure). Ces résultats ont permis également de déterminer la valeur de l'IC50 (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard. Les standards utilisés sont : le α -Tocophérol, le BHT et le BHA.

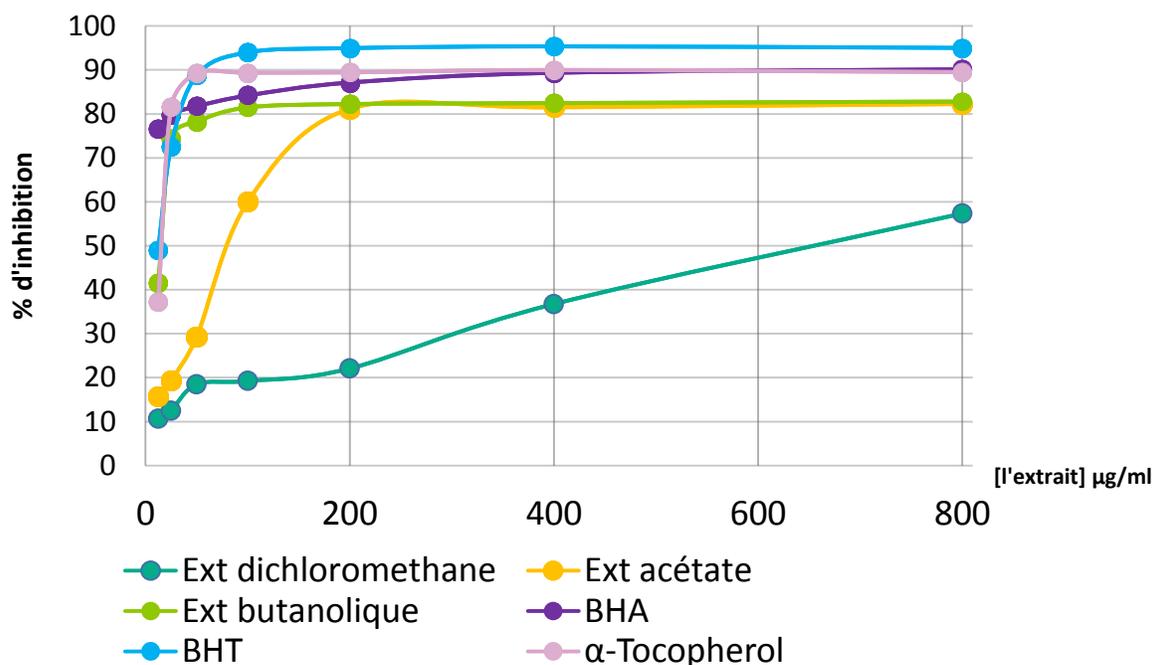


Figure 14 : Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de *l'Ononis Alba* Poir.

Les pourcentages d'inhibitions de l'activité antiradicalaire révèlent que les deux extraits (n-butanolique, acétate d'éthyle) possèdent une meilleure activité antiradicalaire par rapport à l'extrait dichlorométhane en augmentant la concentration. L'extrait n-butanol montre l'activité la plus forte des échantillons étudiés, malgré cela le n-butanol demeure moins actif que les standards. Ces résultats sont identiques à ceux rapportés dans plusieurs études où une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante a été révélée (**Kamal, 2015 ; Berrin et al, 2008**).

D'après les travaux réalisés par **Falleh en 2008** ont montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (**Torres de Pinedo, 2007**).

La valeur de l'IC50 exprimée en $\mu\text{g/ml}$ a été déterminée graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé (Figure 15). Les valeurs de l'IC50 de chaque extrait ainsi que celle de l' α tocophérol, le BHA et le BHT sont classées par ordre croissant sous forme d'histogramme, sachant que la valeur plus faible de l'IC50 (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée.

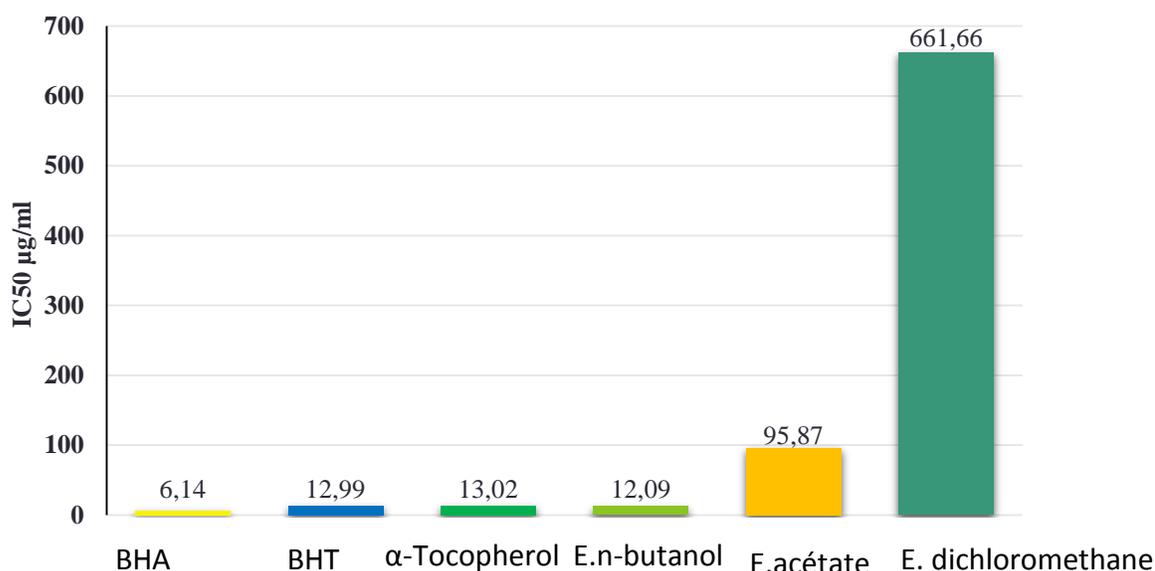


Figure 15 : Activité antioxydante des différents extraits de *l'Ononis Alba* Poir testée par DPPH (Valeur des IC50)

Parmi les extraits testés, l'extrait n-butanol représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de l'ordre de $12.09 \pm 1,02 \mu\text{g/ml}$ suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle avec une IC50 de $95.87 \pm 3,58 \mu\text{g/ml}$. En comparaison avec les standards, l'extrait n-butanol le plus actif avec une IC50 de l'ordre de $12.09 \pm 1,02 \mu\text{g/ml}$ est presque similaire aux BHT et l' α tocophérol avec une IC50 de l'ordre de $12.99 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ et $13.02 \pm 5,17 \mu\text{g/ml}$ respectivement

L'extrait acétate d'éthyle présente une activité antioxydante faible avec une IC50 égale à $95.87 \pm 3,58 \mu\text{g/ml}$. Cependant l'extrait dichlorométhane est le moins actif, avec une IC50 de l'ordre de $661.66 \pm 6,89 \mu\text{g/ml}$. Ces activités sont inférieures aux BHA et BHT et l' α tocophérol pris comme antioxydants de référence.

II.1.2. Test de la réduction de cuivre (CUPRAC) :

On remarque une couleur rouge-orangée, surtout pour l'extrait n-butanol et acétate d'éthyle en augmentant leur concentration cela veut dire que le complexe cuivre-néocuproïne est réduit en présence d'une substance réductrice qui existe dans ces deux extraits, plus la substance est antioxydante et plus la coloration est vers le rouge orangé. Le contrôle n'a pas pris cette couleur ce qui veut dire que le complexe reste stable.

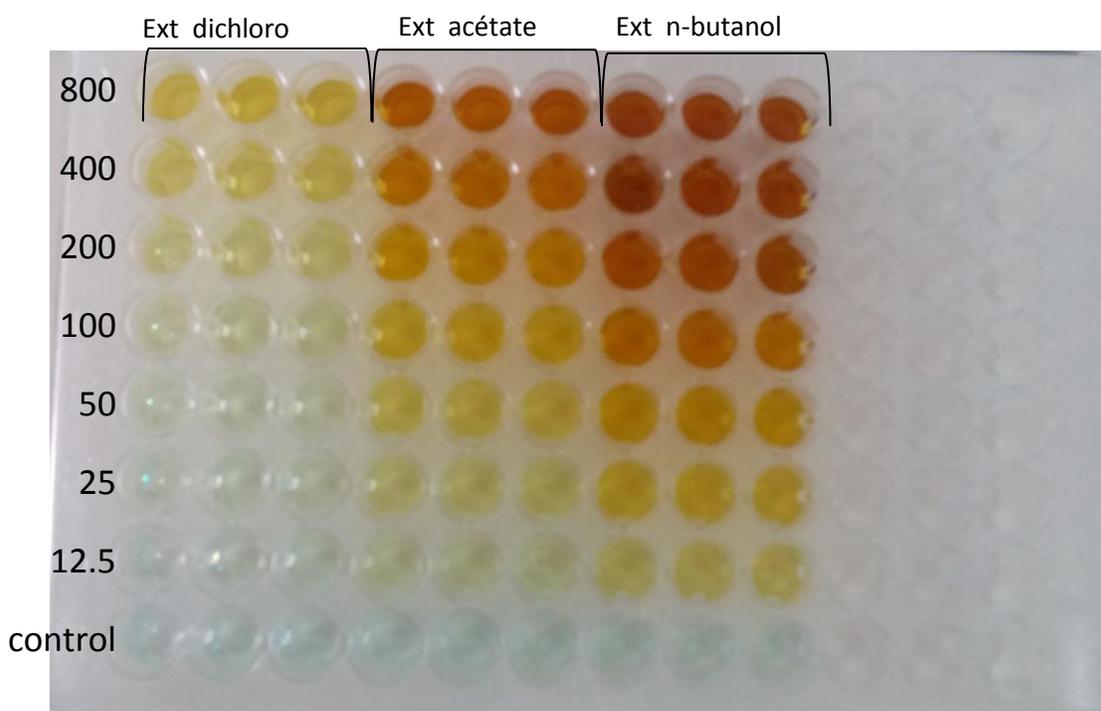


Figure 16 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (CUPRAC).

Les résultats obtenus grâce à lecture par spectrophotomètre à une longueur de 540 nm, ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'absorbance en fonction des concentrations des extraits et des standards. Ces résultats ont permis également de déterminer la valeur de l'A0.50 (la concentration qui correspond à 0.5 d'absorption) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard. (BHT et BHA).

La figure (17) présente les courbes de l'absorbance en fonction de la concentration des standards et des extraits on peut déduire que l'extrait n-butanol et l'extrait acétate d'éthyle montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que l'extrait dichlorométhane. Toutefois, l'extrait n-

butanol montre l'activité la plus forte des échantillons étudiés, malgré cela le n-butanol demeure moins active que le BHT et le BHA.

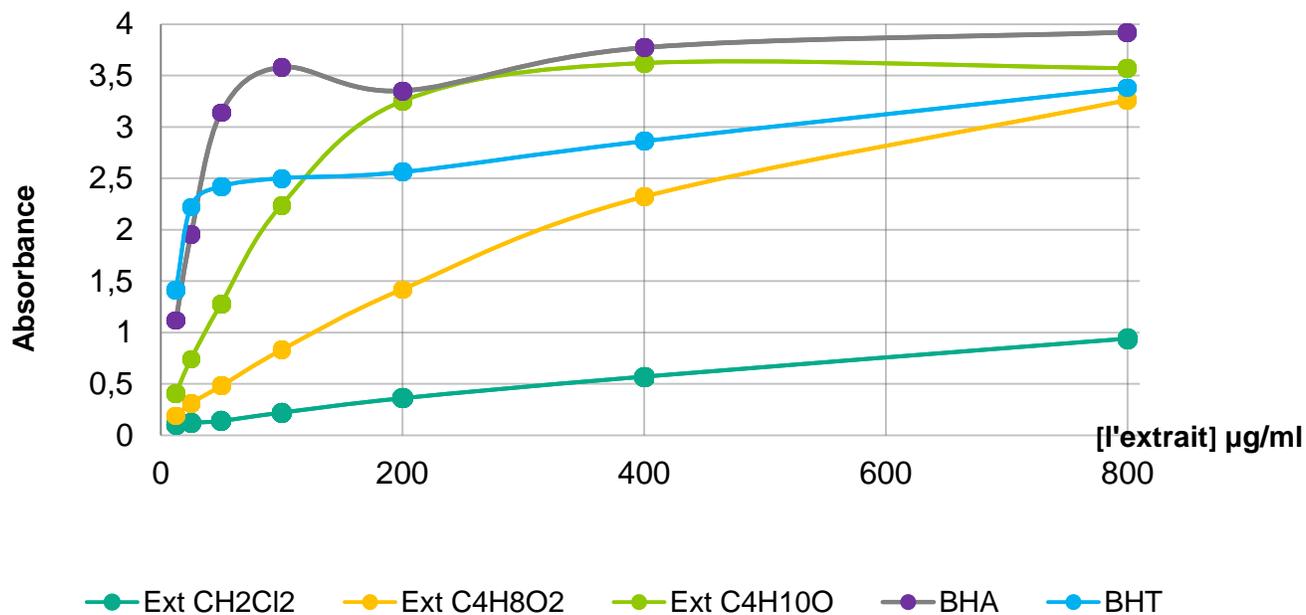


Figure 17 : Courbe d'absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration des différents extraits de *l'Ononis Alba Poir*.

Les valeurs A0.50 sont déterminées à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration. Les valeurs d'A0.50 de chaque extrait ainsi que celle de BHA et BHT sont classés par ordre croissant sous forme d'histogramme. La valeur plus faible de l'A0.50 (la concentration du substrat qui cause absorbance de 50 % de l'activité de CUPRAC) indique une activité antioxydante plus élevée.

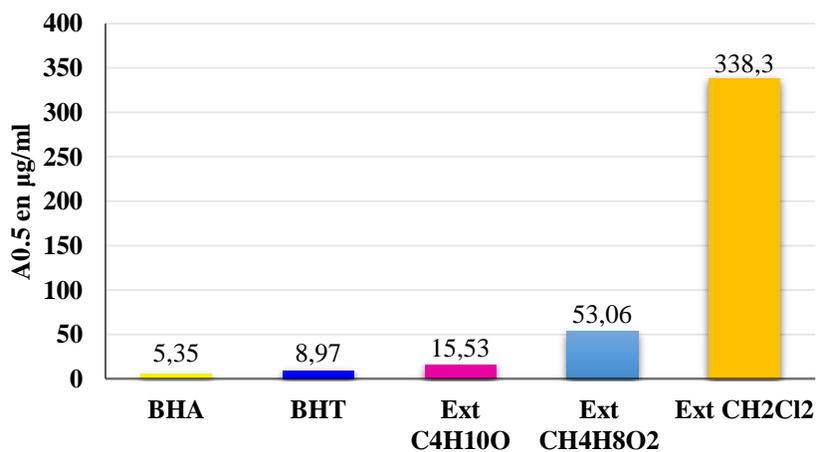


Figure 18 : Activité anti-oxydante des différents extraits de *l'Ononis Alba* Poir testée par CUPRAC (valeur des A0.50).

Parmi les trois extraits de la plante, l'extrait butanolique a montré une meilleure activité inhibitrice du CUPRAC ($15.53 \pm 1.32 \mu\text{g/ml}$) malgré qu'elle est moins faible par rapport au standard BHA ($5,35 \pm 0,71$) et BHT (8.97 ± 3.94); tandis que l'extrait acétate d'éthyle et dichlorométhane représente respectivement une activité inhibitrice du CUPRAC moins faible ($53,06 \pm 3,49$ et $338,3 \pm 10,96 \mu\text{g/ml}$ respectivement) . Sur une échelle plus faible l'extrait dichlorométhane est le moins actif. Ces résultats confirment les résultats précédents du test de DPPH.

II.2. Activité enzymatique (antidiabétique):

Les composés phénoliques sont connus par leur pouvoir inhibiteur de certaines enzymes hydrolysant les glucides, telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, en raison de leur capacité à se lier aux protéines (Mai et al, 2007). Comme les antidiabétiques alternatifs, plusieurs inhibiteurs de l' α -amylase et de l' α -glucosidase ont récemment été isolés à partir de plantes médicinales (Xiao et al, 2013).

Les activités inhibitrices de l' α -amylase de l'extrait dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle et du celui butanolique sont présentés dans la figure 19 ci-dessous, tandis que l'activité inhibitrice de l' α -amylase du standards acarbose est illustrée dans la figure 20.

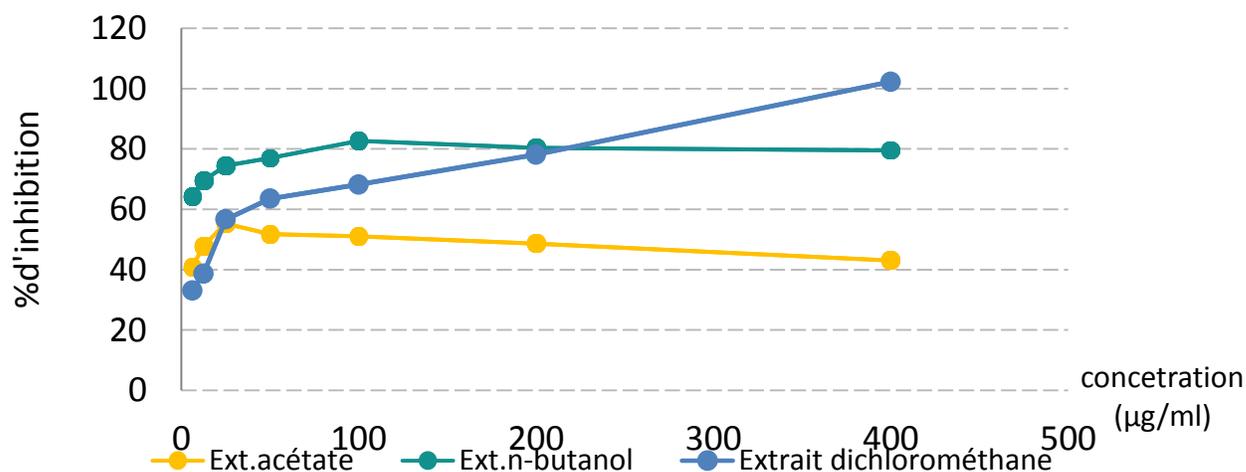


Figure 19 : Activité inhibitrice de l'alpha amylase des extraits.

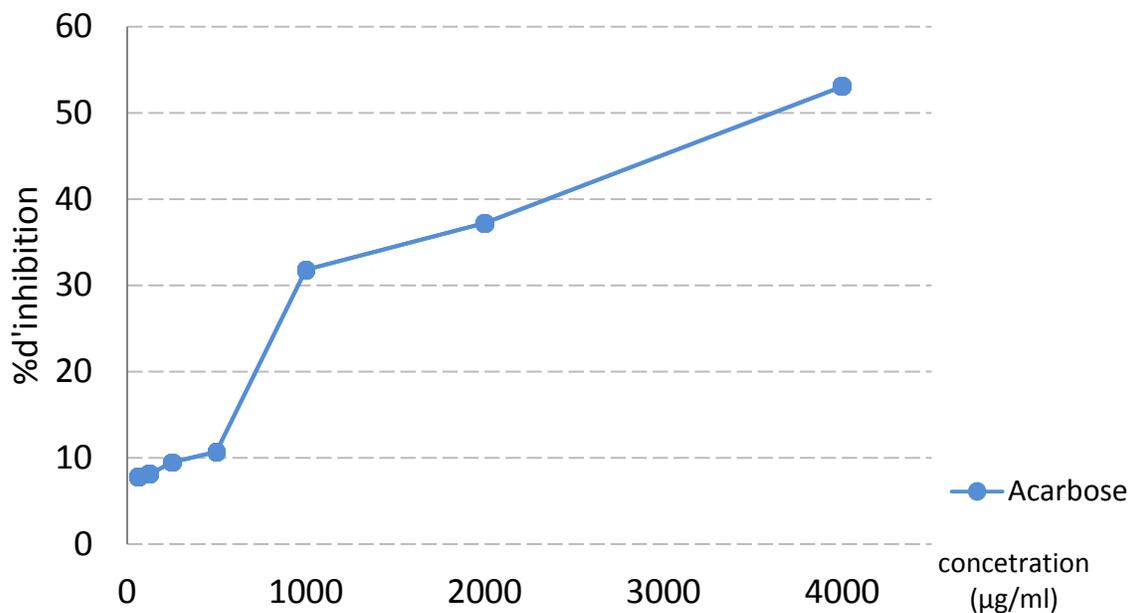


Figure 20 : Activité inhibitrice de l'alpha amylase du standard acarbose.

À une concentration de 100µg /ml d'échantillon, 83% d'inhibition de l'alpha-amylase ont été observés par l'extrait butanolique comparée à l'Acarbose présentant une inhibition de 8,08% seulement à une concentration plus proches de l'ordre de 125 µg /ml .

D'autre part, une concentration de 400µg/ml de l'extrait dichlorométhane a donné 103% d'inhibition de l'alpha-amylase, où le standard Acarbose présentait une inhibition de 10,7% seulement à une concentration plus proche de l'ordre de 500 µg/ml.

Alors que l'extrait acétate d'ethyle n'a pas montré une bonne activité.

Ces résultats suggèrent que l'extrait dichlorométhane possède des propriétés antidiabétiques plus élevées que celle du standard l'acarbose qui pourraient être utilisées pour préparer des agents pharmaceutiques pour le traitement de l'hyperglycémie.

Des études précédentes faites sur d'autres plantes de la famille des Fabaceae ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis l'enzyme alpha amylase telles que *Galega Officinalis*, *Phaseolus Vulgaris* et

Tamarindus indica qui présentait 35, 45-75, 90% d'inhibition de l' α -amylase respectivement. L'activité inhibitrice de l' α -amylase et de l' α -glucosidase dépend du profil phénolique (Kwon et al, 2008; Kang et al, 2014).

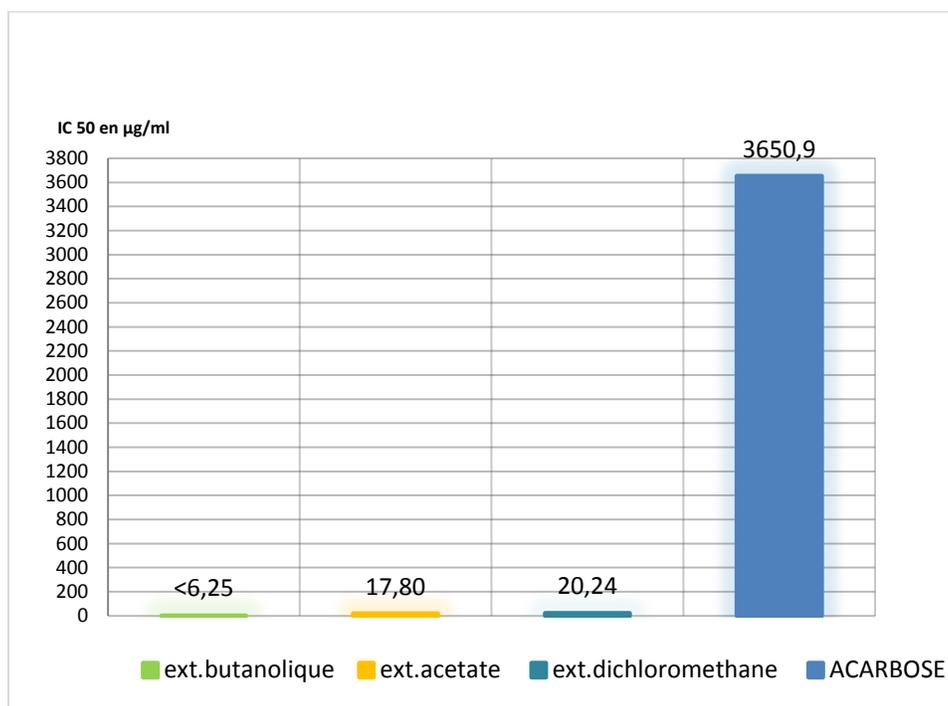


Figure 21 : Valeurs des IC₅₀ de l'activité inhibitrice de l'alpha amylase classées par ordre croissant.

La forte inhibition de l' α -amylase par l'extrait butanolique de *Ononis Alba*, démontrée par la IC₅₀ la plus basse (moins de 6.25 µg/ml), suggère que cet extrait contient un puissant inhibiteur de l' α -amylase, ce qui indique un rôle potentiel en tant que source naturelle antidiabétique. En effet, toute plante fortement inhibitrice de l' α -amylase pourrait constituer un traitement efficace contre l'hyperglycémie postprandiale avec un minimum d'effet secondaire. Ainsi que l'effet des extraits butanolique (IC₅₀ < 6.25µg/ml), acétate (IC₅₀ = 17.8 ± 4,32µg/ml) et dichlorométhane (IC₅₀ = 20,24±0,3µg/ml) semble être respectivement environ 584, 205 et 180 fois plus actif que le standard acarbose (IC₅₀ = 3651±10,7mg / ml). Ces résultats suggèrent que les bioactifs exerçant un effet inhibiteur sur l' α -amylase peuvent être présents dans tous les extraits de plantes à des concentrations différentes.

Selon certaines études (Kim et al, 2000; Tadera et al, 2006; Williams, 2013), ces bioactifs peuvent être des flavonoïdes ; car ils constituent un groupe majeur de composés polyphénoliques qui ont été signalés comme des composés possédant une activité inhibitrice contre l' α -amylase en dépendant de leur structure, nombre et la position de leurs groupes hydroxyles dans la molécule qui sont des facteurs déterminants pour l'inhibition des enzymes.

II.3. Activité antimicrobienne :

II.3.1. Antibactérienne :

Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne de nos échantillons, les différents extraits ont été testés sur des souches de référence; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), où nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque.

Les résultats de la sensibilité des deux souches sont résumés dans le tableau suivant.

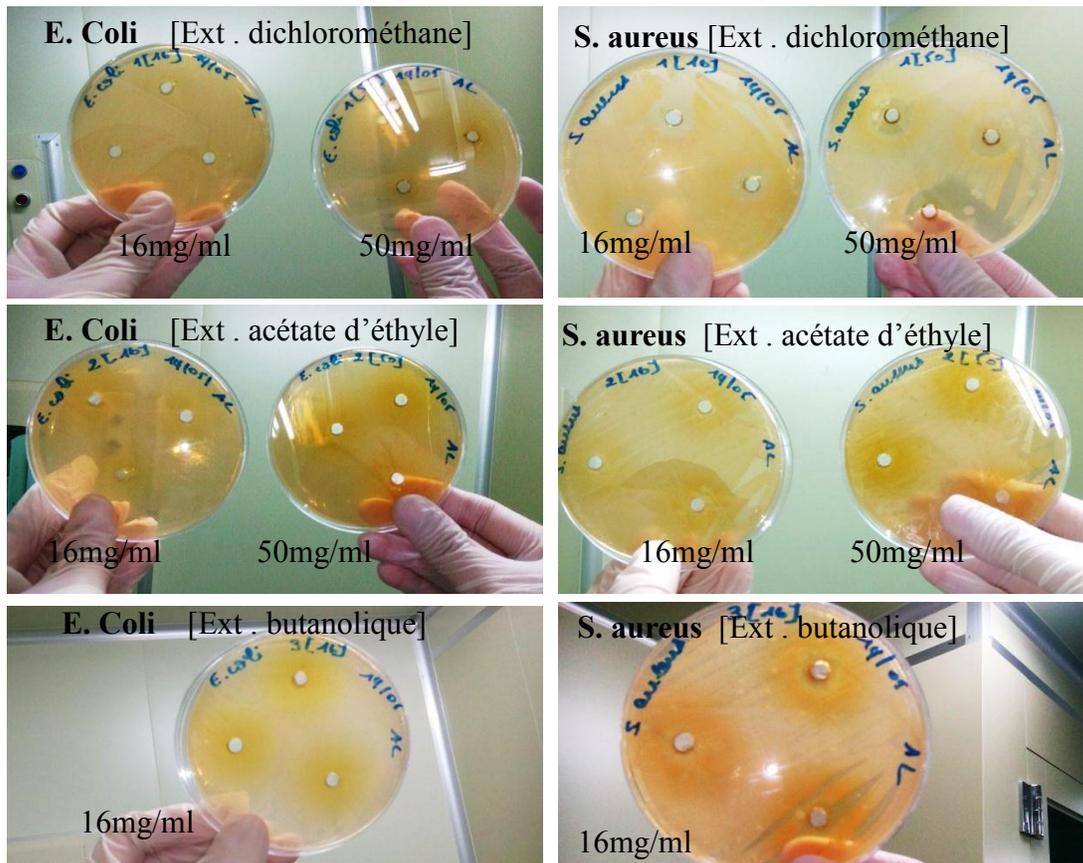


Figure 22: Zones d'inhibition résultant de la sensibilité différentes souches aux différents extraits d'*Ononis Alba Poir*.

Tableau 3 : Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de *l'Ononis Alba* Poir.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	16 mg/ml	50mg/ml	16 mg/ml	50 mg/ml
E. Dichlorométhane	-	-	+	+
E. acétate d'éthyle	-	-	-	-
E. n-butanolique	-	NT	+	NT

(-): non sensible ou résistante. (+) : sensible. NT : non testé.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau (3), l'extrait dichlorométhane a révélé une forte activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* à une concentration de 16mg/ml et 50mg/ml, où le diamètre de la zone d'inhibition pour cet extrait augmente en augmentant la concentration à 50 mg/ml. Bien que l'extrait butanolique n'a été testé qu'à une concentration de 16mg/ml suite à sa faible quantité, son effet inhibiteur est remarquable. D'autre part, le diamètre de la zone d'inhibition pour l'extrait dichlorométhane était plus grand que celui de l'extrait butanol. Pour l'extrait acétate d'éthyle aucune activité n'a été observée pour les deux concentrations contre *Staphylococcus aureus*.

Concernant *Escherichia coli*, aucune zone d'inhibition de croissance n'a été constatée autour des disques de tous les extraits, ce qui est traduit par la résistance de ces souches. En fait, selon une étude de l'activité antibactérienne de certaines plantes les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles aux extraits de plantes que les bactéries à Gram négatif (**The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran J Med Life. 2015**).

II.3.2. Antifongique :

Afin de tester la sensibilité de la souche fongique vis-à-vis des différents extraits l'activité inhibitrice des différents extraits sur la croissance du mycélium de l'agent phytopathogène *Fusarium Oxysporum* a été déterminée en mesurant la croissance radiale du champignon sur un milieu PDA contenant les différents extraits, les résultats obtenus sont présentés dans la figure 22 et 23.

À partir des résultats présentés à la figure (22). Il est noté qu'il existe une diminution de la croissance radiale du champignons *Fusarium Oxysporum* par tous les extraits. La croissance radiale est inversement proportionnelle à la concentration des extraits, le pourcentage d'inhibition de la croissance de *Fusarium Oxysporum* augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. A une concentration de 16 mg/ml les extraits dichlorométhane, n-butanol et acétate d'éthyle ont présentés des pourcentages d'inhibition de 9.84, 6.81 et 3.78 % respectivement, puis à la concentration plus élevée, de l'ordre de 50 mg/ml, les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de la plante ont présenté des pourcentages d'inhibition de 25.75 et 11.36 % respectivement (figure 22).

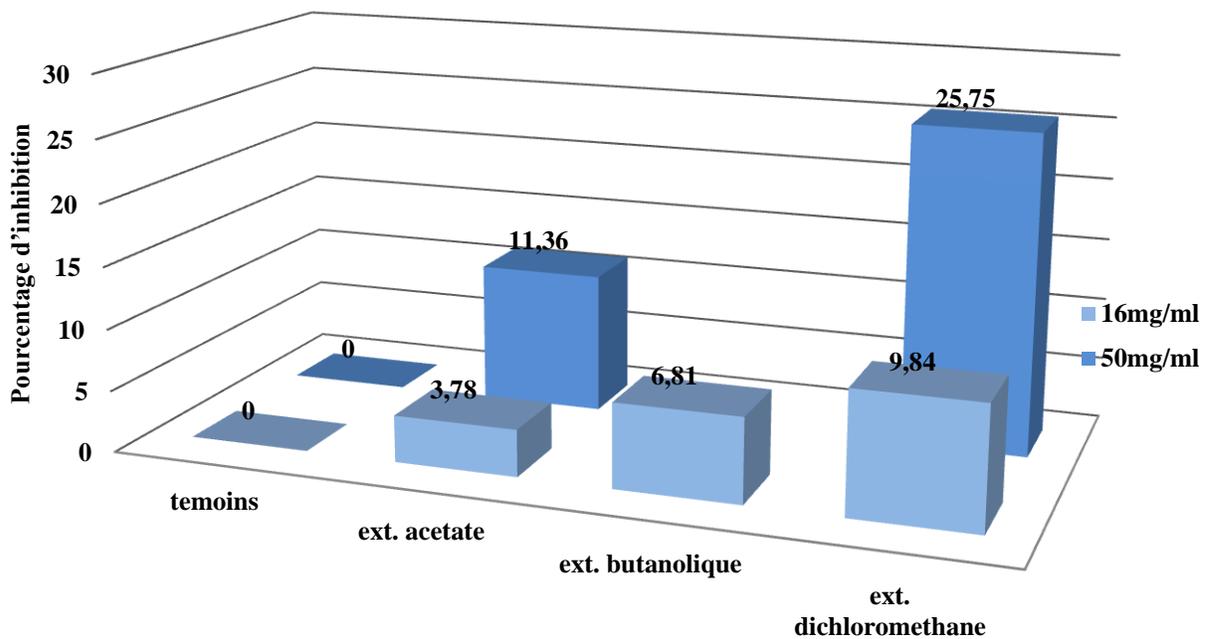


Figure 23: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction de la concentration des trois extraits de *l'Ononis Alba Poir*.

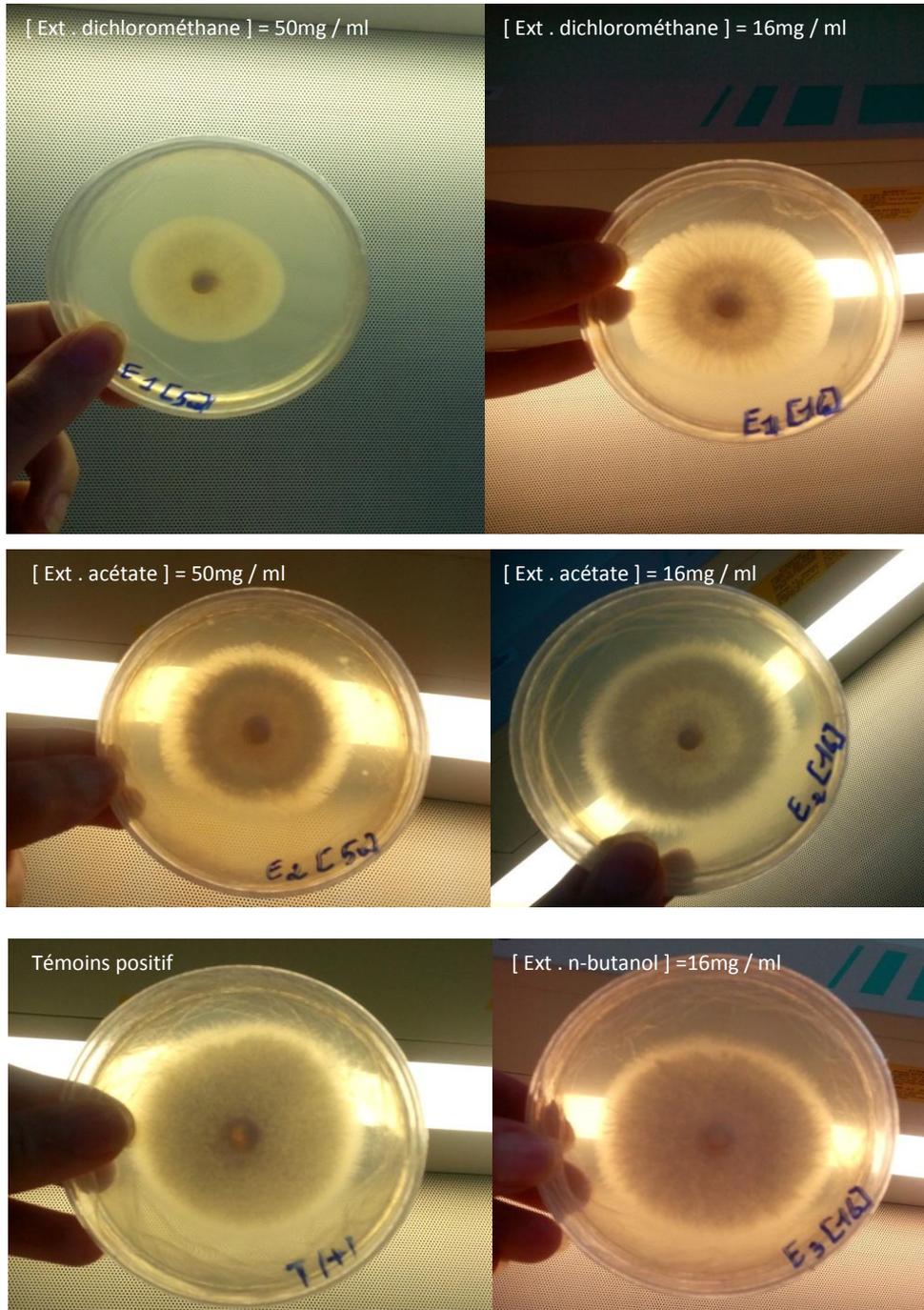


Figure 24: Résultats d'incubation de l'agent phytopathogène sur milieu PDA et les trois extraits.

Par comparaison, le diamètre des colonies du *Fusarium Oxysporum* a été réduit en augmentant la concentration des extraits de la plante. Cette réduction a été plus prononcée avec les extraits dichlorométhane qu'avec l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol. Les différentes concentrations d'extraits ont influencé de façon significative la croissance radiale du champignon dont les concentrations élevées étant plus inhibitrices.

Ces extraits contiennent des substances qui retardent la croissance du champignon. Cependant, il a été rapporté que les extraits végétaux d'un certain nombre de plantes contiennent des composés tels que les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes qui sont dotés de propriétés fongicides (**Lhoste et al, 1993 ; Ling et al, 2003 ; Pamo et al, 2003**).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Le présent travail porte sur l'investigation chimique et biologique d'une plante médicinale endémique Algérienne appartenant à la famille des Fabaceae (Legumineuses). Cette famille est connue par sa richesse en divers composés, tels que les flavonoïdes, les polyphénols, les sucres et les tanins.

L'analyse des extraits a été essentiellement fondée sur l'évaluation des activités biologiques en vue de la valorisation d'une telle espèce. Dans ce contexte, plusieurs tests ont été réalisés dont les plus révélateurs ont été sélectionnés.

L'activité antioxydante des extraits de cette espèce a été évaluée à différentes échelles par le test DPPH et CUPRAC, ce qui nous a permis de confirmer leurs pouvoir scavenger de radicaux libres. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

Les trois extraits ont montré une forte inhibition de l'enzyme alpha amylase, la meilleure inhibition a été provoquée par l'extarit butanolique confirmté par sa faible IC 50.

L'extrait dichlorométhane a montré une forte activité antibactérienne vis-à-vis les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus*) alors que l'extrait n-butanol n'a montré aucune activité antibactérienne. Pour *Escherichia coli*, une grande résistance a été observée dont aucune activité inhibitrice n'a été constatée pour tous les extraits.

Leur activité antifongique a été également évaluée grâce au test de sensibilité de la souche fongique *Fusarium oxysporum*, ces extraits contiennent des substances qui retardent la croissance du champignon .

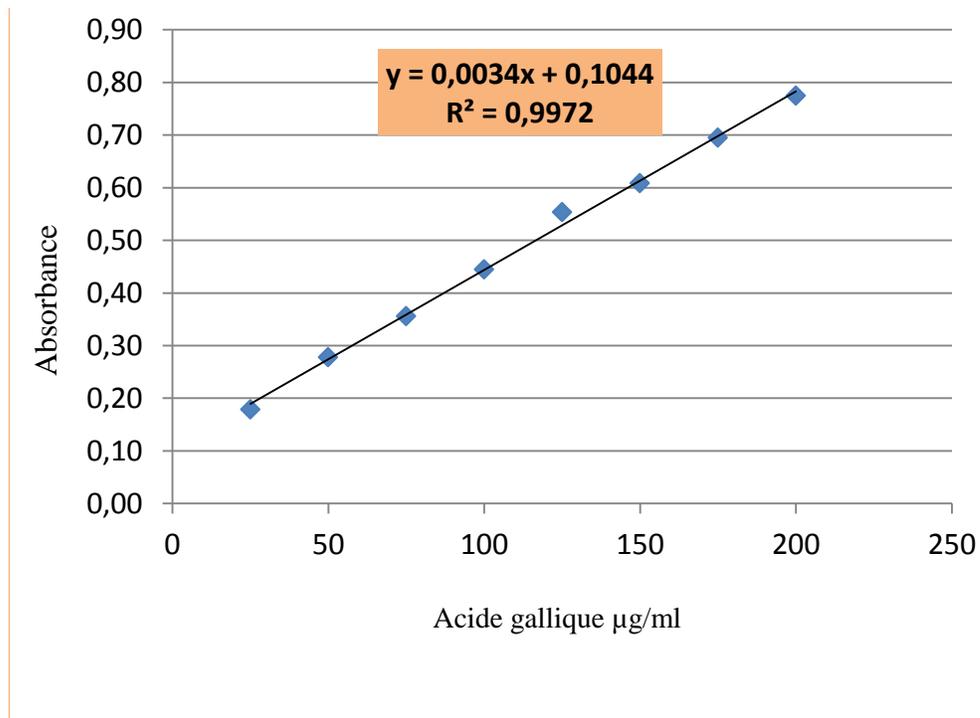
Enfin, l'ensemble des résultats obtenus ouvre la possibilité pour plusieurs perspectives en termes d'identification et d'application de cette plante dans différents domaines.

La présente étude n'est qu'une initiation à la recherche dans ce vaste domaine des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence, identification plus fine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des composé d'intérêt de cette plante, aussi les essais précliniques et cliniques d'un futur antidiabétique et/ou antibiotique basé sur les composés de cette plante.

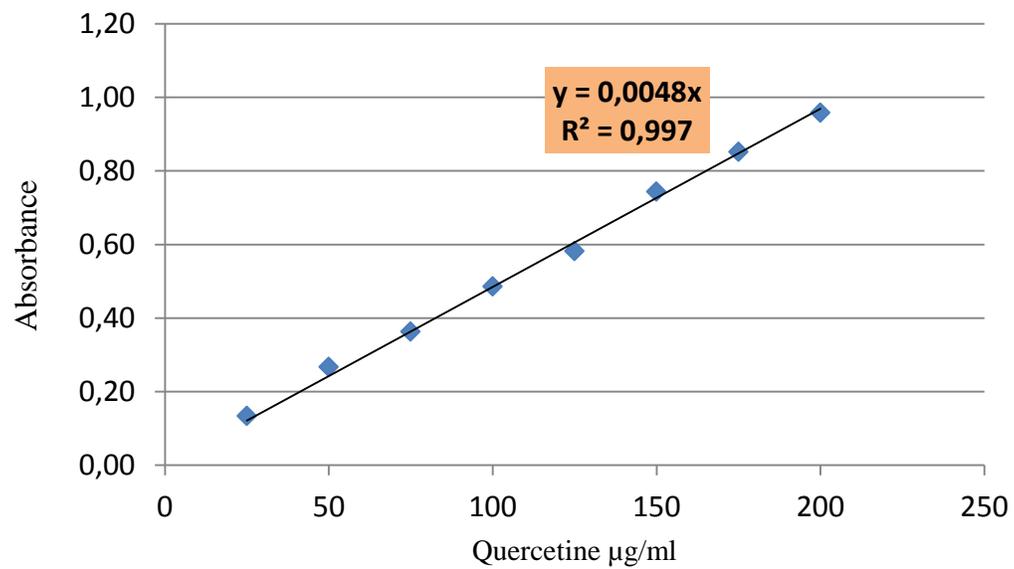
ANNEXE

ANNEXE 1 :

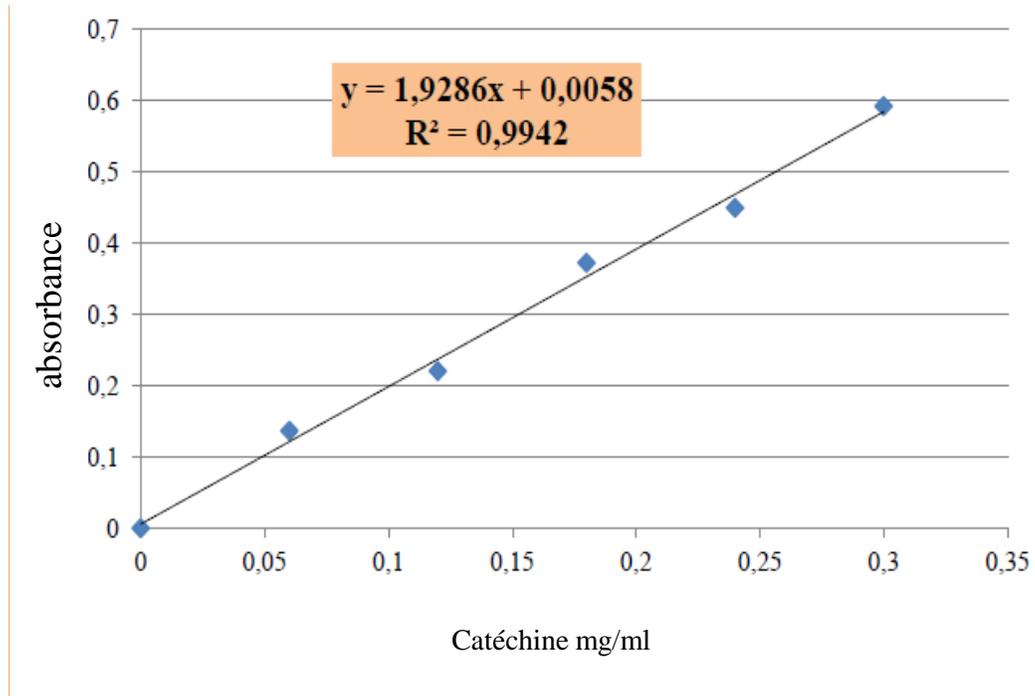
- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique :



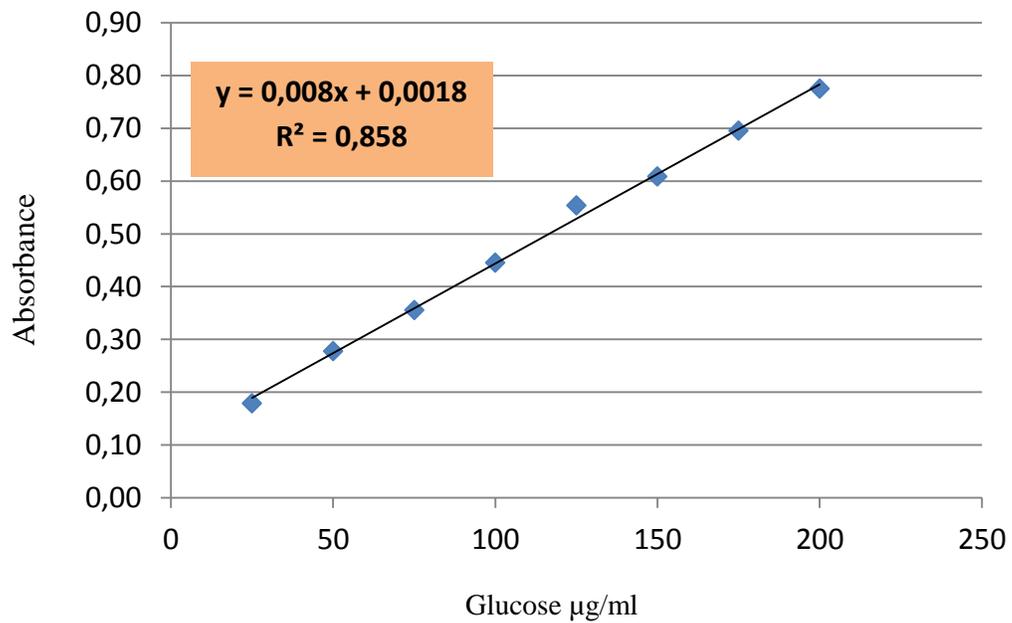
- Courbe d'étalonnage de la quercétine :



- Courbe d'étalonnage de la catéchine:



- Courbe d'étalonnage du glucose :



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES

1. **Akagawa M., Suyama K. 2001.** Amine oxidase-like activity of polyphenols Mechanism and properties. Eur. Journal of Biochemistry, 268: 1953-1963.
2. **Al-Qudah M. A., Al-Ghoul A. M., Trawenh I. N., Al-Jaber H. I., Al Shboul T. M., Abu Zarga M. H., Abu orabi S. T. 2014.** Antioxidant Activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis Natrrix L.* and *Ononis Sicula Guss.* Journal of Biologically Active Products from Nature 4, 52–61.
3. **Alibert G, Ranjeva R. et Boudet M.A (1997).** organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. Physiol .Veg,15,279 .
4. **Amer M. E., Kassem F. F., Abdelkader M. S. 2004.** Rare 2-Phenoxychromones from *Ononis serrata* growing in Egypt. Nat. Prod. Sci. 10, 1–3. 52.
5. **AOAC. 1997.** Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
6. **Apak R., Guclu K., Ozyurek M., & Karademir S. E. 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970–7981.
7. **Arts I.C.W, Van de Putte B., Hollman P.C.H. 2000.** Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit juices and chocolate milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 1752-1757.
8. **Audigie C., Figurearella J., Zonszain F. 1978.** Manipulations d'analyses biochimiques. Doin (Ed). Paris, 274 p.
9. **Bahorun T. 1997.** Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council, 83-94.
10. **Barrero A. F., Sanchez J. F., Barron A., Corrales F., Rodriguez I. 1989a.** Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. Phytochemistry 28, 161–164.
11. **Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Barron, A., Rodriguez, I., 1989b.** Specionin and speciosides A and B: new aromatic lactones from *Ononis speciosa*. J. Nat. Prod. 52,1334–1337.

12. **Barrero, A. F., Sanchez, J. F, Rodriguez, I., 1990.** N- Δ 13-Docosenoylanthranilic acid and alkylresorcinols from *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. *Phytochemistry* 29,1967–1969.
13. **Barrero A. F., Cabrera E., Rodriguez I., Fernandez-Gallego E. M. 1994a.** Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* 36, 189–194.
14. **Barrero A. F., Cabrera E., Rodriguez I., Planelles F., 1994b.** Alkylresorcinols and isocoumarins from *Ononis pubescens*. *Phytochemistry* 35, 493–498.
15. **Barrero A. F., Herrador M. M., Arteaga P., Rodriguez-Garcia I., Garcia-Moreno M. 1997.** Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subsp. *ramosissima*. *J. Nat. Prod.* 60, 65–68.
16. **Barrero A. F., Cabrera E., Rodriguez Garcia I. 1998.** Pterocarpans from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* 48, 187–190.
17. **Beghidja, N., Khalfaoui, A., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., 2013.** More flavonoids from the ethyl acetate extract of *ononis angustissima* species. *Chem. Nat. Compd.* 49, 749–750.
18. **Bellakhdar J. 1997.** *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press, Paris, France.
19. **Bénard C. 2009.** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat : Université de NANCY
20. **Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Toiu, A., Tămaș, M., Tiperciuc, B., 2012** Isoflavonoids from *Glycyrrhiza sp.* and *Ononis spinosa*. *Farmacia* 60, 615–620.
21. **Benkiki N., 2006.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat, Univ. HaDj Lakhdar, Batna.
22. **Berrin B., Goksel T., and Derya O., (2008).** Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food chemistry.* (209): 426-430 p.
23. **Blois M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
24. **Bolle P., Faccendini P., Bello U., Panzironi C., Tita B. 1993.** *Ononis spinosa* L.: Pharmacological effect of ethanol extract. *Pharmacol. Res.* 27, 27–28.
25. **Bouchouka E. 2016.** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar –Annaba

26. **Bouheroum, M., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Bermejo, J. B., Leon, F., Garcia, V., 2009.** Four flavonoids from the aerial part of *ononis angustissima* species. *Chem. Nat. Compd.* 45, 874–875.
27. **Boumaza D., 2011.** Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : *Inula viscosa*, *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran. Mémoire de magister, Univ. Mohamed Boudiaf, Oran. 39 p.
28. **Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M et Dangles O. 1997.** Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the color of fruits and vegetables. in: phytochemistry of fruit and vegetables proceedings of the phytochemical society of Europe. Oxford, UK: clarendon press, pp 30-49
29. **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, p233.
30. **Bruneton, J. 2005,** Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. 3eme édition revue et augmentée. Paris : Editions Tec & Doc ; Cachan : Editions Medicales internationales,. 618 p.
31. **Bruneton J. 2008.** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.
32. **Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. et Vlietink A. 1999.** Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology.* 27: 445- 459.
33. **Cañedo L. M., Miguel del Corral J. M., San Feliciano A. 1997.** 5-Alkylresorcinols from *Ononis natrix*. *Phytochemistry* 44, 1559–1563.
34. **Cavin A. 1999.** Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, 241 P
35. **Cheynier V. 2005.** Polyphenols in foods are more complex than often thought 1–3. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (suppl), 223S-229S.
36. **Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., Kim J.M. 2006.** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39: 756-761.
37. **Clifford M.N. 1999.** Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida. 41 (5): 393-397.
38. **Cowan M.M. 1999a.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582

39. **Cowan M.M. 1999b.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582.
40. **Croteau R. Kutchan T.M. Lewis N.G. 2000.** Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1251.
41. **Crozier A. 2003.** Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health*". Ed. Goldberg. pp: 27- 48.
42. **D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R. 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. 43(4) : 348-361.
43. **Dai J. et Mumper R. J. 2010.** Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Properties. *Molecules* 15(10), 7313-52.
44. **Dennis C. et We Bstert J. 1971.** Antagonintic properties of species-groups of *Trichoderma* 3 .hyphal interaction. *Trans.Br, mycol, Soc.* 57 (3) : 363-369.
45. **Derbel S., Ghedira K. 2005.** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, 1: 28-34.
46. **Dicko M. H., Gruppen H., Traoré A. S., Voragen A. G. J. ,Van Berkel W. J. H. 2006.** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1 (1), 21-38.
47. **Djeridan A., Yousfi M., Nedjmi D., Boutassouna D.,Stoker P.,Vidal N., 2006.**Antioxidant activity of some medical plants extracts containing phenolic compounds *foodschemistry*; 97; 654-660.
48. **Drewnowski A., Gomez-Carneros C. 2000.** Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72:1424-35.
49. **Dubois G.E, Grosby GA et Saffron P. 1997.** Non nutritive sweeteners: taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *science*.195,397-399
50. **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Pebers P.A and Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, p: 350-356.
51. **Elamrani A., Benaissa B. 2010.** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ononis natrix* from Morocco. *J. ESSENT. OIL. BEAR. PL.* 13, 477–488. 6.
52. **Encyclopedie botanique collaborative. 2018.** <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-83990-illustrations>

53. **Eymard. Y., 2003.** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de doctorat, Univ. Nantes, France, 28-38 p.
54. **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. (331): 372-379 p
55. **Fleuriet A. et Macheix J.J .1997.** Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates cerise (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*).*phys.veg*,15, 239-250
56. **Fossen T., Andersen O.M., Ovstedal D.O., Pedersen A.T., Raknes A. 1996.** Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*61: 703-706.
57. **Habibtani S.2005.** Etude phytochimique et pharmacologique des algues rouges de l'espèce *Jania rubens*. thèse de magistère pp. 61-62.
58. **Hagerman, A.E. 2002.** Tannin Hand book. Miami University, Oxford OH 45056
59. **Haieb I., Harzallah-Skhiri F., and Chemli R. 1999.** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore en Tunisie (cas de la région de Sfax); travaux de fin d'études E.S.H.E.
60. **Hambaba L., Boudjellal K., Abdeddaim M., Aberkane M.C., Boudiaf K., 2012.** Étude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d '*Elaeagnus angustifolia* L .*Phytochemistry*, 350–356.
61. **Han X.H., Hong S.S., Hwang J.S., Lee M.K., Hwang B.Y., Ro J.S. 2007.** Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacol Research*. 30: 07-13.
62. **Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. 1994.**The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical of Biology Medecine*,16: 845-850.
63. **Haslam E. 1974.** Polyphenol-Protein Interactions. *Biochemistry Journal*. 139:285-288.
64. **Hemingway R W. 1992.** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande*. Hemingway R W, Laks P. E. New York.
65. **Henis Y., Tagari H., Volcani R. 1964.** Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid, and Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms. *Applied Microbiology*,12(3):204-209.

66. **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. (1992).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 2379-2383.
67. **Heywood V.H. 1996.** *Flowering Plants of the World*. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152.
68. **Hostettmann K., Hostettmann M et Marston A. 1986.** *Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation*, Springer-Verlag, Berlin.
69. **Huang H.H., Kwok K.C., Liang H.H. 2004.** Effect of tea polyphenols on the activities of soybean trypsin inhibitors and trypsin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 121-126.
70. **Huang C.L., Sumpio B.E. 2008.** Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. 207 (03): 408–416.
71. **Hubert D. 2005.**the chemistry begind Antioxydant Capacity Assys.*journal of Agricultural and Food Chemistry*, ,vol,53;n°6,pp.8141-1856
72. **International Legume Database and Information Service. 2011.** *Ononis alba* Poir. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:510184-1>
73. **International Legume Database and Information Service. 2014.** *Ononis alba* Poir. <https://www.gbif.org/species/2977141>
74. **Iserin P. 2001.** *Encyclopédie des plantes médicinales*. édition Larousse, Paris, 241.
75. **Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. 2008.** Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasoundassisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7231–7235.
76. **Journet E.P. 2001.** *Ecole thématique Biologie végétale*
77. **Kana J.R. 2003.** Effet des huiles essentielles des feuilles et des extrémités fleuries de *Cupressus lusitanica* sur la tique (*Rhipicephalus lunulatus*) à l'Ouest-Cameroun. *Revue de l'Académie des Sciences du Cameroun*3(3): 169-175.
78. **Kang B.H, Racicot K., Pilkenton S.I. 2014.** Aporroldis E. Evaluation of the in vitro antihyperglycemic effect of *Cinnamomum cassia* derived phenolic phytochemicals via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. *Plant Foods Hum Nutr*. 69:155-160.
79. **Karou F.D., Dicko M.H., Simpore J., Traore A.S. 2004.**Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina African *Journal of Biotechnology*, 4 (8): 823-828.

80. **Khallouki F., Hmamouchi M., Younos C., Soulimani R., Essassi E.M. 2000.** A new flavonoid from the aerial parts of *Chrysanthemum iniscidehirtum*. *Fitoterapia*, 71, p 413-416.
81. **Khouni I. 2016.** Métabolites secondaires de *Ononis pusilla* L.(Leguminosae). Thèse de doctorat 3ème cycle. Université Hadj Lakhdar-Batna
82. **Kim J.S, Kwon C.S, Sou K.H. 2000.** Inhibition of alpha glucosidase and amylase luteolin, a flavonoid. *Bioscience Biotechnol Biochem*,; 64: 2458-2461.
83. **Košir I-J., Lapornik B., Andrenšek S., Wondra A., Vrhovšek U et Kidric J. 2004.** Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta* . 513: 277-282.
84. **Kwon Y. I., Apostolidis E., Shetty K. 2008.** Inhibitory potential of wine and tea against α -Amylase and α -Glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*,; 32(1), 15-31.
85. **Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. 2011.** Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. 127: 1521-1525.
86. **Laurent L. 1991.** Eléments minéraux. In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Volume 4. Lavoisier (Ed). Paris, pp78-98.
87. **Lebreton P. 1982.** Tanins ou alcaloïdes : deux tactiques de dissuasion des herbivores. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)*, 52, 221-238.
88. **Lee J., Kim H., Lee Y. 2003.** New anti-HIV flavonoid glucuronid from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Medica*, 69, 859–861.
89. **Lhoste P., Dolle V., Rousseau J. & Soltner D. 1993.** Manuel de Zootechnie des régions chaudes. Les systèmes d'élevage. Collection précis d'élevage. Ministère de la Coopération, Paris, France. 288 p.
90. **Linden et Lorient D. 1994.** Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed : Masson. 338-340.
91. **Ling B., Zhang M., Kong C., Pang X. & Liang G. 2003.** Chemical composition of volatile oil from *Chromolaena odorata* and its effect on plant, fungi and insect growth. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 14(5): 744-6.
92. **Long-Ze L., James M, Harnly L. 2010.** Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Food Chemistry*, 120, 319–326.
93. **Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L. 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 119-125.

94. **Maataoui B S., HMYENE A., HILALI S., 2006.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. (1):3-8.
95. **Mahasneh A. M., El-Oqlah A. A. 1999.** Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 64, 271–27
96. **Mahmoudi Y. 1980.** La thérapeutique par les plantes communes en Algerie. Palais de livre Blida.
97. **Mai T.T., Thu N.N., Tien P.G. 2007.** Chuyen Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*; 53: 267–276.
98. **Maie N., Behrens A., Knicker H. Kögel-Knabner I. 2003.** Changes in the structure and protein binding ability of condensed tannins during decomposition of fresh needles and leaves. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 577-589.
99. **Manach C. 1998.** Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse: Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal.
100. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
101. **Mekkiou R. 2005.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabacées) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat d'Etat: Chimie Organique. Constantine: Université Mentouri. 9 p.
102. **Merouane A., Noui A., Medjahed H., Nedjari benhadj ali K., Saadi A. (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8 (4): 1865-1870.
103. **Messikh, N. 2008,** Application des réseaux de neurones pour prédire le rendement de l'extraction liquide-liquide du phénol, thèse de doctorat en génie des procédés, Université Badji Mokhtar-Annaba.
104. **Mezrag A., Bouheroum M., Chira K., Such J., Saucier C., Teissèdre L. 2008.** Les polyphénols du raisin. Ed :Springer.6 :75-8273.
105. **Middleton E. JR., Kandaswami C., Theoharides T. C. 2000.** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Review*, 52 (4):673–75198. Cricq de Gaulejac et al, 1999
106. **Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek T.A., (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food chem.*, 85, 231-237.

- 107. Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C. A. 1995.** Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 1794-1801.
- 108. Mompon B., Lemaire B., Mengal P., Surbled M., 1998.** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, (Paris): 145-149.
- 109. Nitsch J.P et Nitsch C .(1961).** Synergistes naturels des auxines et des gibberlines. *Bull.soc.fr.*,26,2237-2240.
- 110. O'Connell J.E., Fox P.F. 2001.** Signification and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 11(3): 103-120.
- 111. Organisation internationale de normalisation (ISO 8968-1). 2001.** Détermination de la teneur en azote -- Partie 1: Méthode Kjeldahl et calcul de la teneur en protéines brutes.
- 112. Outil N. 2015,** Etude Experimentale et modélisation d'une colonne d'extraction, thèse de doctorat en science en génie des procédés, Université de Saïda
- Randhir R. et Shetty K. 2007.** Improved α -amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus. *Asia Pac J Clin Nutr* 16 (3),382-392.
- 113. Pandey K.B et Rizv S.I. 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Nov-Dec; 2(5): 270–278
- 114. Papadopoulou A., Frazier R. A. 2004.** Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 186-190.
- 115. Paris M., Hurabeillen M. 1981.** Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. Ed: Masson. 210-215.
- 116. Podsedek A., Wilska-Jeszka J., Anders B., Markowski J. 2000.** Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. 210: 268-272.
- 117. Price, M.L; Van scoyoc, S; et Butler, L.G. 1978.** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *J. Agric. Food Chem*, 26: 1214-1218.
- 118. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. 2000.** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 3396-3402.
- 119. Pupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M. 2001.** Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (4): 494.

- 120. Quezel P., Snata S., Schotter O., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition du centre national de la recherche scientifique 15, quai Anatole-France-Paris 7. pp 477.
- 121. Quezel P., Santa, S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France
- 122. Rahman. 2004.** A new anthranilic acid derivative from *Ononis natrix* of Jordanian origin. *Alex. J. Pharm. Sci.* 18, 165–170.
- 123. Reynaud J. 2002.** La Flore du pharmacien. Paris : Tec & Doc, Cachan : Ed. Médicales Internationales.
- 124. Ribéreau-Gayon P. 1968a.** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris. pp : 173-201.
- 125. Ribéreau-Gayon P. 1968b.** Notions générales sur les composés phénoliques. In: les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. PP : 1-27.
- 126. Ribeiro MT., Waffo-Teguo P., Teissèdre PL. 1999.** Determination of stilbenes (transstringin, cis and trans piceid, and cis and trans resvératrol) in portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47: 266-267 .
- 127. Robert D. Catesson A. M. 2000.** Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative. Wolters Kluwer France Edition, Volume 2, p 320 .
- 128. Saint-Cricq de Gaulejac N., Provost C., Vivas N. 1999.** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* 47: 425-431.
- 129. San Feliciano A., Miguel Del Corral J. M., Cañedo L. M., Medarde M. 1990.** 3,4-Dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochemistry* 29, 945-948. Dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochemistry* 29, 945–948.
- 130. Scalbert A. 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry,* 30(12): 3875-3883.
- 131. Shaker K. H., Dockendorff K., Bernhardt M., Seifert K. 2004.** A new triterpenoid saponin from *Ononis spinosa* and two new flavonoid glycosides from *Ononis vaginalis*. *Z. Naturforsch.* 59b, 124–128.;
- 132. Shang H. M., Zhou H. Z., Yang J. Y., Li R., Song H., Wu H. X. (2018).** In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE* 13(2): 1-12.
- 133. Sinéad Lordan, Thomas J. Smyth, Anna Soler-Vila, Catherine Stanton, R. Paul Ross. 2013.** The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry* 141 (2013) 2170–2176.

- 134.Singleton V.L and Rossi J.A.J. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- 135.Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.*299 : 152-178
- 136.Skadhauge B., GruberM.Y., Thomsen K.K., Von Wettstein D., 1997.** Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissue. *Am. J. Bot.* Pp494-503.
- 137.Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 89: 191-198.
- 138.Song .W, Zhou L ., Yang C., Cao X., Zhang L. , Liu X .2004.** Tomato fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop. Protect.*23,243-247.doi : 10.1016/j.cropro.2003.08.007
- 139.Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmoned D. 2002.** Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH –Lausanne
- 140.Tadera K, Minami Y, Takanatsu K, Matsuoka T. 2006.** Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids.*J. Nutr Sci Vitamol.*; 52: 99-103.
- 141.Talib W. H., Mahasneh A. M. 2010.** Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.* 78, 33–45.
- 142.Tawaha K., Alali .F.Q.,Gharaibeh M.,Mohamed M.,EL-ElimatT. 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species.*Food Chemistry.*,Vol .104.n°4? PP 1372-1378.
- 143.Torres de pinedo A., Pen alver, P., and Morales J.C., (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structureactivity relationship.*Food Chemistry.* (103) :55-6 p.
- 144.Touria Z. 2015 .** Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc : *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. (17): 24-33p.
- 145.Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.
- 146.Visioli F., Borsani L. Galli C. 2000.** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.

- 147. Vitrac X., Borneo A., Vanderlinede R. 2005.** Determination of stilbenes (Delta-viniferin, trans-ascitrin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-niferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (14): 5664-5669 .
- 148. Waksmondzka-Hajnos M., Sherma J. 2011.** High Performance Liquid Chromatography in Phytochemistry. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- 149. Williams G. 2013.** Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res*. 57:48-57.
- 150. Willis J. C. 1973.** A dictionary of the flowering plants and ferns, 8th Ed. Cambridge University Press.
- 151. Wollenweber, E., Dörr, M., Rivera, D., Roitman, J. N., 2003.** Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z. Naturforsch.* 58c, 771–775.
- 152. Xiao J., Kai G., Yamamoto K., Chen X. 2013.** Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure–activity relationship aspect *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 53: 818–836.
- 153. Yilmaz B. S., Özbek H., Çitoğlu G. S., Uğraş S., Bayram İ., Erdoğan E. 2006 .** Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. *Phytother. Res.* 20, 500–503.5. Talib, W. H., Mahasneh, A. M., 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.* 78, 33–45.
- 154. Zampini I.C., Vattuone M. A., Isla M.I. 2005.** Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 450–456.
- 155. Zengin G. et al. 2014.** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251.

Phytochemical study and biological activities evaluation of *Ononis Alba* Poir plant.

Abstract

This work consists in a phytochemical study of the species *Ononis alba* poir belonging to the Fabaceae family as well as the evaluation of the antioxidant, enzymatic and the antimicrobial activity of plant extracts. The species of this Algerian plant has not been the subject of a phytochemical study and previous biological evaluation.

The present study consists in an extraction of the compounds of this plant then the evaluation of their different biological activities (antioxidant, antidiabetic, antimicrobial).

The results obtained show a great antioxidant power, different extracts (ethyl acetate, dichloromethane, n-butanol), evaluated by DPPH and CUPRAC methods. Strong enzymatic inhibition was further demonstrated against alpha amylase.

The dichloromethane extract also showed a strong antibacterial activity against the bacterial strain *Staphylococcus aureus* as well as a strong antifungal activity against the *Fusarium oxysporum* champignon compared to the other two extracts.

Such results encourage an enhancement of this plant species for use in the pharmaceutical field.

Key words: Ononis, phytochemistry, antioxidant activity, enzymatic activity, antimicrobial activity.

دراسة الكيمياء النباتية و تقييم الفعالية البيولوجية لنبات *Ononis Alba Poir*.

ملخص

يكرس هذا العمل للدراسة الكيميائية النباتية لنوع الشبرق الأبيض (أبيض الزوج) *Ononis Alba Poir* من فصيلة البقوليات وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة، الانزيمي، ومضاد للجراثيم والفطريات في المستخلصات النباتية. هذا النبات المستوطن في الجزائر لم يكن موضوع دراسة كيميائية نباتية وتقييم بيولوجي من قبل. تتكون الدراسة الحالية من استخراج مركبات هذا النبات ثم تقييم أنشطتها البيولوجية المختلفة (مضادات الأكسدة ومضادات السكري ومضادات الميكروبات). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها فعالية كبيرة مضادة للأكسدة ، مستخلصات مختلفة (أسيتات إيثيل ، ثنائي كلورو ميثان ، ن-بيوتانول) ، تم تقييمها بواسطة اختبار DPPH ، CUPRAC. كما تم إثبات تثبيط إنزيم قوي ضد ألفا الأميليز. أظهر مستخلص ثنائي كلورو ميثان أيضًا نشاطًا مضادًا قويًا للجراثيم ضد السلالة البكتيرية المكورات العنقودية الذهبية ، بالإضافة إلى نشاط مضاد للفطريات قوي ضد فطريات فوزاريوم (مغزلي حاد الأبواغ) مقارنة بالمستخلصين الآخرين. النتائج التي تم الحصول عليها واعدة للغاية لاستخدام هذا النبات في المجال الصيدلي.

كلمات مفتاحية: الشبرق *Ononis* ، الكيمياء النباتية ، نشاط مضادات الأكسدة ، النشاط الانزيمي، النشاط المضاد للمكروبات.

Année universitaire : 2018/2019

Réalisé Par : **Aouati Lina**

Abdennour Asma

Thème : Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de plante *Ononis Alba Poir.*

Mémoire présenté en vue de l'obtention de Diplôme de Master

Specialité : Biochimie Appliquée

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Ononis Alba Poir.*, appartenant à la famille des Fabaceae ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, enzymatique, et antimicrobienne des extraits végétaux. L'espèce de cette plante algérienne n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique précédente.

La présente étude consiste à une extraction des composés de cette plante puis l'évaluation de leurs différentes activités biologiques (antioxydante, antidiabétique, antimicrobienne).

Les résultats obtenus montrent un grand pouvoir antioxydant, des différents extraits (acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol), évalué par les méthodes de DPPH, CUPRAC. Une forte inhibition enzymatique a été encore démontré contre l'alpha amylase.

L'extrait dichlorométhane a montré également une forte activité antibactérienne contre la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* ainsi qu'une forte activité antifongique contre le champignon *Fusarium oxysporum* par rapport aux deux autres extraits.

De tels résultats encouragent pour une valorisation de cette espèce de plante pour une utilisation dans le domaine pharmaceutique.

Mots clés : Ononis, phytochimie, activité antioxydante, activité enzymatique, activité antimicrobienne.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie, microbiologie, mycologie...de centre de recherche de biotechnologie - constantine

Devant le jury :

Président du jury : Mme Maameri Z. (MCA ; UFM Constantine 1)

Encadreur : Mme Zaak H. (MCB ; CRBT Constantine)

Examineur : Mr Bensuici C. (MCB ; CRBT Constantine)

Date de soutenance: 18 juillet 2019