



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : علوم الأحياء الدقيقة

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aériens et racinaires de la plante *Medicago sativa*

Présenté par : BENGUESMIA Imene Boutheina

Le : 13/06/2024

CHELLOUF Ikram

Jury d'évaluation :

Présidente : LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA - E N S de Constantine).

Encadrante : LEGHLIMI Hind (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinatrice : DJAMAA Ouahiba (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : علوم الأحياء الدقيقة

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aériens et racinaires de la plante *Medicago sativa*

Présenté par : BENGUESMIA Imene Boutheina

Le : 13/06/2024

CHELLOUF Ikram

Jury d'évaluation :

Présidente : LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA - E N S de Constantine).

Encadrante : LEGHLIMI Hind (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinatrice : DJAMAA Ouahiba (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Allah le Tout-Puissant, qui nous a donné la force, le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

Tout d'abord, nous exprimons notre gratitude, notre appréciation et notre respect envers notre chère encadrante, Mme **LEGLIMI Hind**, maître de conférences A à U Constantine 1 Frères Mentouri, pour son aide, son soutien et ses conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Tous nos remerciements vont à Mme **LABBANI Fatima-Zohra Kenza**, maître de conférences A à l'E N S de Constantine, pour l'honneur d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et d'évaluer notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à Mme **DJAMAA Ouahiba**, maître de conférences B à U Constantine 1 Frères Mentouri, qui nous fait l'honneur d'examiner ce travail.

Un grand merci à la directrice du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Mme **KABOUCHE Zahia**, pour nous avoir permis de réaliser ce travail au sein de ce laboratoire et pour la grande aide qu'elle nous a apportée pour accomplir ce travail.

Un grand remerciement également à Mme **BOUTHAGHANE Naima** (Professeur à U Constantine 1) pour sa gentillesse, son aide, ses conseils et le temps qu'elle nous a consacré durant notre travail.

Merci également aux doctorantes **Nour, Hadjer et Nesrine** pour toutes leurs aides, leurs conseils, leur soutien moral et leurs encouragements.

Dédicaces

Je dédie humblement ce modeste travail

*À mes plus chers compagnons de vie, ceux qui ont toujours été à mes côtés, et n'ont jamais refusé mes demandes : ma maman, **YOUBI Cherifa** et mon papa, **Lazher**, Merci pour Votre amour inconditionnel, vos sacrifices, pour chaque instant de soutien et pour toute la vie que vous avez consacré à me guider et à m'aimer.*

*À **MEZIRI Youcef** pour ses encouragements, ses soutiens moraux qui ont été des piliers solides dans les moments difficiles et pour tout ce qu'il a fait pour moi.*

*À la mémoire de mes oncles **YOUBI Mohammed** et **MEZIRI Ammar** disparus trop tôt.*

*À ma meilleure amie et mon binôme **Ikram** qui a partagé avec moi tous les hauts et les bas, Merci d'avoir été là à chaque étape de notre parcours commun.*

*À mes chères meilleures amies **Sirine** et **Kaouther** qui sont toujours là pour moi.*

Imene Boutheina

Dédicaces

Je souhaite dédier mon mémoire de fin d'études à :

À ma mère, mon ange pur, ma force après Dieu, mon soutien initial et éternel, je te remercie pour tes sacrifices, ton amour et tes prières constantes. Je suis reconnaissante que Dieu t'ait choisie parmi les humains.

À mon père, mon premier amour, celui qui m'a soutenue sans limite, et m'a donné sans attendre en retour, celui qui m'a enseigné la patience et le dévouement dans le travail, Que Dieu te protège de tout mal.

*À ma petite sœur **Oumnia**, celle qui a cru en mes capacités et m'a soutenue comme mon ombre, celle qui m'a inspiré la force et la volonté. Je t'aime et je te souhaite le meilleur.*

*À mes frères **Anis**, **Amine** et **Abderrahmane**, mes meilleurs soutiens.*

*.À mes chères tantes, **Meriem** et **Leila**, merci infiniment pour votre amour et votre soutien sans faille. Vous êtes irremplaçables.*

*À mes amies en microbiologie, **Sirine**, **Imene** et **Kaouther**, vous êtes un don divin pour moi.*

À mes amies proches et à toutes les personnes qui me sont chères.

Ikram

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source précieuse de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires. La présente étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules naturelles à partir d'une plante de la région de Constantine. Il s'agit de la plante *Medicago sativa* appartenant à la famille des Fabaceae, largement utilisé en médecine traditionnelle. Le screening phytochimique et le fractionnement par CCM révèlent la présence de substances bioactives, à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les saponines et les tanins. L'activité antimicrobienne a été estimée par une étude qualitative (diffusion sur disques et les puits) et les résultats obtenus ont été confirmés par une étude quantitative en déterminant les CMI et les CMB des extraits étudiés vis-à-vis trois souches fongiques (*Aspergillus brasiliensis*, *Fusarium oxysporum* et *Candida albicans*) et quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*). Les extraits de CHCl₃, d'AcOEt et de C₃H₆O ont montré une activité antibactérienne puissante contre les souches testées, en particulier les bactéries à Gram positif, avec des diamètres d'inhibition compris entre 8 et 17 mm à une concentration de 100 mg/ml. De plus, le meilleur taux d'inhibition (53,33%) a été enregistré avec l'extrait acétate d'éthyle contre *Fusarium oxysporum*. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont montré un large éventail de valeurs (jusqu'à 12,5 mg/ml) en comparaison avec les zones d'inhibition (17 mm). Cette étude permet de justifier les vertus antimicrobiennes accordées à cette plante.

Mots clés : *Medicago sativa*, métabolite secondaire, activité antibactérienne, activité antifongique, CMI, CMB.

Abstract

Medicinal plants constitute a valuable source of bioactive molecules, which are generally part of secondary metabolites. The present study falls within the scope of searching for new natural molecules from a plant native to the Constantine region. It concerns *Medicago sativa*, belonging to the Fabaceae family, widely used in traditional medicine. Phytochemical screening and fractionation by TLC reveal the presence of bioactive substances, namely polyphenols, flavonoids, saponins, and tannins. Antimicrobial activity was assessed through qualitative study (disk diffusion and well methods), and the results were confirmed by quantitative study determining MIC and MBC of the extracts against three fungal (*Aspergillus brasiliensis*, *Fusarium oxysporum* and *Candida albicans*) and four bacterial (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*) strains. CHCl₃, AcOEt, and C₃H₆O extracts showed potent antibacterial activity against the tested strains, especially GRAM-positive bacteria, with inhibition diameters ranging from 8 to 17 mm at a concentration of 100 mg/ml. Additionally, the highest inhibition rate (53.33%) was recorded with ethyl acetate extract against *Fusarium oxysporum*. Minimum inhibitory concentration (MIC) values showed a wide range of values (up to 12.5 mg/ml) compared to inhibition zones (17 mm). This study provides justification for the antimicrobial virtues attributed to this plant.

Keywords : *Medicago sativa*, secondary metabolite, antibacterial activity, antifungal activity, MIC, MBC.

الملخص

النباتات الطبية تشكل مصدرا قيما للجزيئات الحيوية النشطة، والتي عموما ما تكون جزءا من الأيض الثانوي. تندرج الدراسة الحالية ضمن نطاق البحث عن جزيئات طبيعية جديدة من نبات موطنه إقليم قسنطينة. وتتعلق هذه الدراسة بنبات الدرسيم الذي ينتمي إلى عائلة البقوليات والذي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي. فحص التركيب الفيتوكيميائي والتقسيم بواسطة تقنية CCM يكشف عن وجود مواد حيوية نشطة، وهي البوليفينولات والفلافونويدات والصابونين والتانينات. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من خلال دراسة نوعية (طريقة الانتشار على الأقراص وطريقة الأبار)، وتم تأكيد النتائج من خلال دراسة كمية لتحديد CMI و CMB للمستخلصات ضد ثلاث سلالات فطرية بكتيرية (*Aspergillus brasiliensis*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*) (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*). أظهرت مستخلصات CHCl₃ و AcOEt و C₃H₆O نشاطاً مضاداً فعالاً ضد السلالات التي تم اختبارها، خاصة البكتيريا الإيجابية الغرام، مع قطرات تثبيط تتراوح بين 8 و 17 مم عند تركيز 100 ملغ/مل. بالإضافة إلى ذلك، تم تسجيل أعلى معدل للتثبيط (53.33%) مع مستخلص أسيتات الإيثيل ضد *Fusarium oxysporum*. أظهرت قيم التركيز الحد الأدنى المثبط (CCM) مجموعة واسعة من القيم (تصل إلى 12.5 ملغ/مل) مقارنة بمناطق التثبيط (17 مم). تقدم هذه الدراسة تبريراً للفضائل المضادة للميكروبات المنسوبة إلى هذا النبات.

الكلمات المفتاحية : *Medicago sativa*، مركب ثانوي أيضا، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد

للفطريات، CMI، CMB.

Liste des abréviations

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : La Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : La Concentration Minimale Bactéricide

UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre

PDA : Potato dextrose agar

BuOH : Butanol

CHCl₃ : Chloroforme

AcOEt : Acétate d'éthyle

C₃H₆O : Acétone

FOL : *Fusarium oxysporum .sp. lycopersici*

A : *Aspergillus*

S : *Staphylococcus*

E : *Escherichia*

B : *Bacillus*

C : *Candida*

P : *Pseudomonas*

Liste des tableaux

Tableau 1: Description botanique des différentes parties de la plante <i>Medicago sativa</i>	4
Tableau 2: Structure et composition chimiques des polyphénols	11
Tableau 3 : Structure et composition chimiques des flavonoïdes	13
Tableau 4 : Structure et composition chimiques des saponines et des alcaloïdes	14
Tableau 5 : Série des dilutions de l'extrait brut pour la mesure de l'indice de mousse	25
Tableau 6 : Rendement des extraits de la plante <i>Medicago sativa</i>	32
Tableau 7 : Résultats de screening phytochimique	34
Tableau 8 : Résultat de plaque CCM des extraits avec les deux systèmes après la révélation	37
Tableau 9 : Taux d'inhibition des extraits de <i>Medicago sativa</i> vis-à-vis aux souches fongiques testés	39
Tableau 10 : Diamètre d'inhibition des extraits de <i>Medicago sativa</i> vis-à-vis des souches testés par la méthode des puits	41
Tableau 11 : Diamètre d'inhibition des extraits de <i>Medicago sativa</i> vis-à-vis des souches testés par la méthode des disques	42
Tableau 12 : Les concentrations minimales inhibitrices des extraits de <i>Medicago sativa</i> vis-à-vis des souches testées.....	45

Liste des figures

Figure 1 : les différentes parties de <i>Medicago sativa</i> (Consulté le 25/04/2024)	4
Figure 2 : Les métabolites secondaires et l'activité biologique de <i>Medicago sativa</i> (Nimaan, 2021).....	15
Figure 3 : La localisation géographique du site de prélèvement (Google Maps) consulté le 23/02/2024	18
Figure 4 : Le champ de la luzerne cultivée (photo réelle).....	18
Figure 5 : La préparation du matériel végétal pour l'extraction.....	19
Figure 6 : La macération au froid	20
Figure 7 : L'étape de la filtration.....	20
Figure 8 : Extraction par Soxhlet.....	21
Figure 9 : Évaporation par le Rotavapor	21
Figure 10 : Ampoule à décanter.....	22
Figure 11 : Schéma illustratif du protocole de l'extraction de la partie aérienne de <i>Medicago sativa</i>	23
Figure 12 : les différentes solutions des extraits végétaux	27
Figure 13 : les boîtes contenant les disques de champignon (a), <i>Fusarium oxysporum</i> (b), <i>Aspergillus brasiliensis</i> (c)	28
Figure 14 : les étapes de l'évaluation de l'activité antibactérienne	31
Figure 15 : Les rendements d'extraction des parties aériennes et racinaires de <i>Medicago sativa</i>	33
Figure 16 : Plaques CCM développées dans le 1 ^{er} système éluant (chloroforme / méthanol) (9,5 /0,5)	36
Figure 17 : Plaques CCM développées dans le 2 ^{ème} système éluant (chloroforme / méthanol / eau) (7/3/0,5)	37
Figure 18 : Taux d'inhibition des extraits vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	39
Figure 19 : Activité antifongique de Chloroforme, Acétate d'éthyle et Acétone contre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (photo réelle)	40
Figure 20 : Test de sensibilité de <i>B. subtilis</i> et <i>S. aureus</i> à l'Acétate d'éthyle, Chloroforme et Acétone par la méthode des puits (photo réelle)	42
Figure 21 : Test de sensibilité des trois souches au disque de Chloroforme (photo réelle).....	43
Figure 22 : Détermination de la CMI sur des microplaques (photo réelle).....	45

Figure 23 : La CMB de l'extrait Chloroforme sur *C. albicans* (a) et de l'extrait acétate d'éthyle conte *S. aureus* (b) (photo réelle) 47

Table des matières

Remerciements	i
Dédicaces.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	v
الملخص.....	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Introduction	1
Partie Synthèse bibliographique	
chapitre I :La description de la plante <i>Medicago sativa</i>	
I.1 Généralité sur la plante <i>Medicago sativa</i>	3
I.2 Description botanique	3
I.3 Origine et répartition géographique	4
I.3.1 Répartition dans le monde	5
I.3.2 Répartition en Algérie.....	5
I.4 Classification taxonomique.....	5
I.5 Utilisation traditionnelle	6
I.5.1 Alimentation humaine	6
I.5.2 Élevage des animaux	6
I.5.3 Agriculture	6
I.5.4 Médecine.....	6
chapitre II : Les métabolites Secondaires	
II.1 Les métabolites secondaires.....	8
II.1.1 Les polyphénols	8
II.1.1.1 Les acides phénoliques	8
II.1.1.2 Les stilbénes	9
II.1.1.3 Les lignines.....	9
II.1.1.4 Les lignanes	9

II.1.1.5	Les coumarines.....	9
II.1.1.6	Les flavonoïdes.....	10
II.1.1.7	Les tanins.....	10
II.1.2	Les saponines.....	10
II.1.3	Les alcaloïdes.....	11
II.2	Intérêt et activités biologiques de <i>Medicago sativa</i>	14
II.2.1	L'activité antimicrobienne.....	15
II.2.1.1	L'activité antibactérienne.....	15
II.2.1.2	L'activité antifongique.....	16
II.2.1.3	Le mode d'action antimicrobien des métabolites secondaires.....	16
II.2.2	L'activité antioxydante.....	16
II.2.3	L'activité antiinflammatoire.....	17

Partie expérimentale

chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1	Matériel végétal.....	18
I.2	Préparation du matériel végétal pour l'extraction.....	19
I.3	Extraction de la partie aérienne (macération à froid).....	19
I.4	Extraction de la partie racinaire (Soxhlet).....	20
I.5	Extraction liquide-liquide.....	21
I.6	Calcul du Rendement de l'extraction.....	24
I.7	Screening Phytochimique de la plante étudié.....	24
I.7.1	Test des polyphénols.....	24
I.7.2	Test des flavonoïdes.....	24
I.7.3	Test des tanins.....	24
I.7.4	Test des alcaloïdes.....	24
I.7.5	Test des saponosides.....	25
I.8	Chromatographie sur couche mince.....	25
I.9	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	26
I.9.1	Matériel biologique.....	26
I.9.2	Préparation des solutions des extraits.....	27
I.9.3	L'activité antifongique.....	27

I.9.4	L'activité antimicrobienne	28
I.9.4.1	Repiquage des souches testées	28
I.9.4.2	Préparation de l'inoculum	29
I.9.4.3	Ensemencement.....	29
I.9.4.4	Etude qualitative des extraits analysés	29
	a) Méthode des puits	29
	b) Méthode de diffusion sur disques d'extraits	29
I.9.4.5	Etude quantitative des extraits analysés	30
	a) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	30
	b) Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide	31
chapitre II : Résultats et Discussion		
II.1	Rendement	32
II.2	Screening phytochimique par réactions colorées.....	33
II.3	Fractionnement des extraits par Chromatographie sur Couche Mince	35
II.4	Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits testés	38
II.4.1	L'activité antifongique des extraits	38
II.4.2	L'activité antimicrobienne.....	41
II.4.2.1	Etudes qualitative des extraits analysés.....	41
II.4.2.2	Etude quantitative des extraits analysés	44
	a) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	44
	b) Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide	47
Conclusion		49
Références bibliographiques		
Annexe		

Introduction

Introduction

Actuellement, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire. À l'origine, ces ressources étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, la préparation d'extraits et de concentrés ont permis d'en intensifier l'effet médicinal (Gagnon, 2006).

Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels. Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Gagnon, 2006). De plus, face à l'émergence grandissante à l'échelle mondiale du phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques, la découverte de nouveaux composés antimicrobiens est devenue un objectif primordial dans la lutte contre les infections causées par des souches bactériennes résistantes.

La résistance aux antibiotiques constitue un important défi en médecine, rendant difficile sa lutte. Il y a quelques décennies, on croyait que les antibiotiques pouvaient efficacement contrôler de nombreuses maladies. Cependant, les micro-organismes deviennent de plus en plus résistants, et de nouveaux agents infectieux apparaissent régulièrement, compliquant ainsi le traitement des infections. Au cours des vingt dernières années, de nombreux facteurs de résistance ont été identifiés, et il est désormais évident que pratiquement toutes les bactéries ainsi que les antibiotiques sont concernés par ce phénomène de résistance (Barchan *et al.*, 2015). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 4,95 millions de décès en 2019 étaient directement liés à l'antibiorésistance dans les pays à revenu faible et intermédiaire.

Face à ce problème, de nombreuses recherches ont été menées pour trouver des alternatives efficaces aux antibiotiques contre les maladies infectieuses. En effet, depuis l'Antiquité, les gens utilisent des plantes et leurs extraits riches en métabolites secondaires, dans la médecine traditionnelle (Bouyahya *et al.*, 2017).

En effet, les métabolites secondaires sont des molécules bioactives qui jouent un rôle crucial dans de nombreux domaines, notamment en pharmacie. Ces composés phytochimiques sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, d'antibiotiques, d'insecticides et d'herbicides (Crozier *et al.*, 2006).

Ce travail s'inscrit dans cette thématique, notre choix c'est porté sur la plante médicinale *Medicago sativa*, cette espèce est largement reconnue comme une source économique de protéines précieuses, non seulement pour le bétail mais aussi pour l'alimentation humaine dans les régions les plus pauvres et en voie de développement (Rafinska *et al.*, 2016). Traditionnellement, *M. sativa* a été utilisée pour améliorer la mémoire, traiter les douleurs rénales, la toux et les muscles endoloris, ainsi que pour ses propriétés antidiabétiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antiasthmatiques et antimicrobiennes (Bora et Sharma, 2010). De nombreuses études ont démontré que *M. sativa* produit une gamme de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes et les terpénoïdes, qui ont montré des effets antibactériens contre divers agents pathogènes (Ahmed, 2023).

L'objectif de cette étude consiste à extraire, les composés bioactifs des parties aériennes (feuilles et tiges) et racinaires de *Medicago sativa*, avec plusieurs solvants de polarité croissante ainsi qu'à évaluer leur activité antimicrobienne.

Le manuscrit est scindé en deux parties distinctes :

La première partie comprend une synthèse bibliographique qui décrit la plante, les métabolites secondaires et leur intérêt biologique.

La deuxième partie détaille la partie expérimentale, comprenant les protocoles utilisés pour extraire les molécules bioactives, identifier les métabolites secondaires par caractérisation qualitative, évaluer l'activité antimicrobienne et enfin discuter les résultats obtenus.

Ce travail se termine par une conclusion générale et des perspectives.

Partie
Synthèse bibliographique

chapitre I: **La description de la plante**

Medicago sativa

I.1 Généralité sur la plante *Medicago sativa*

La luzerne cultivée également connue sous le nom scientifique de *Medicago sativa* ou الفصصة en arabe (Trabut et Marès, 1902), appelé aussi Alfalfa ou la reine des plante fourragère (Summers et Putnam, 2008), est une plante herbacée vivace appartient à la famille des Fabaceae (Vahidipour *et al.*, 2023), qui se positionnant en troisième place en termes d'importance dans le règne végétal, après les Astéracées et les Orchidacées (Messioughi, 2015).

La luzerne possède la capacité de capturer l'azote atmosphérique par symbiose avec des bactéries du sol, particulièrement *Rhizobium meliloti* Dangeard, qui forment des nodules sur les racines de cette plante et en s'y développant (Heinrichs, 1969).

Cette espèce végétale est capable de s'ajuster à une variété de sols grâce à son système racinaire pivotant. Son enracinement, qui peut s'étendre jusqu'à dix mètres de profondeur, lui confère une remarquable adaptabilité en lui permettant de survivre aux périodes de sécheresse (Mauriés, 2003).

C'est une plante polyvalente avec des utilisations variées dans l'agriculture, l'alimentation animale, la médecine et la nutrition humaine (Mielmann, 2013).

I.2 Description botanique

Medicago sativa, appelée encore la reine des plantes fourragères est une plante dicotylédone, émerge avec deux cotylédons lors de sa germination. Sa première feuille est simple, avec une seule foliole, tandis que les feuilles suivantes sont composées de trois folioles reliées à la tige par un pétiole, appelés trifoliées. Au fur et à mesure que la luzerne se développe, la première tige principale s'allonge en produisant des feuilles alternées. La tige secondaire est formée par le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée. Elle est suivie de deux autres tiges secondaires qui commencent au niveau des cotylédons. Ce sont ces tiges qui vont constituer le collet. Simultanément, la luzerne développe une racine pivotante principale ainsi que des racines secondaires plus ou moins articulées (Mauriés, 2003), (**Figure 1**).

Les feuilles et les fleurs d'Alfalfa sont comestibles. (Paniagua Zambrana *et al.*, 2020).

plateaux du Caucase, de l'Iran et de la Turquie, avant de se propager à travers le monde entier. (Mauriès, 2003).

I.3.1 Répartition dans le monde

Actuellement, la luzerne est largement répandue à travers le monde, avec une présence notable aux États-Unis, au Canada, en Italie, en France, en Chine, en Russie du Sud, en Afrique du Nord et du Sud, en Australie ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (Michaud *et al.*, 1988).

I.3.2 Répartition en Algérie

Dans le Nord de l'Afrique, la luzerne était reconnue par les populations locales, mais elle n'était pas largement cultivée avant la colonisation. Cependant, dans les oasis du sud, on trouve une variété de luzerne qui semble avoir été introduite depuis longtemps. Une variante spontanée de *Medicago sativa* est courante en Algérie, particulièrement dans les régions montagneuses et les hauts plateaux, ce qui suggère qu'elle est indigène et ne résulte pas de cultures anciennes. En outre, sur les sommets de l'Aurès en Algérie, ainsi que sur les crêtes et les versants nord de cette chaîne montagneuse, on trouve de nombreuses variétés de *Medicago sativa* (Trabut et Marès, 1902).

I.4 Classification taxonomique

Selon (Nimaan, 2021) Alfalfa appartient à la famille des Fabacées, au genre *Medicago* caractérisé par une grande variation d'espèces très proche les unes des autres.

Règne : Plantae

Sous-règne : Viridiplantae

Infra-règne : Streptophyta

Sous-embranchement : Embryophyta

Embranchement : Tracheophyta

Infra-embranchement : Spermatophytina,

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Medicago*

Espèce : *Medicago sativa*

I.5 Utilisation traditionnelle

I.5.1 Alimentation humaine

Les champs de multiplication des semences de luzerne représentent un tiers de la production annuelle de miel aux États-Unis. Dans certains pays, les jeunes pousses de luzerne sont également utilisées pour l'alimentation humaine. Des recherches ont été menées afin d'utiliser des extraits de feuilles de luzerne comme aliments pour des populations qui souffrent d'une carence alimentaire importante, notamment pour les enfants. Cette plante est utilisée en raison de ses propriétés telles que sa teneur élevée en protéines, ses extraits foliaires et sa richesse en vitamines et en minéraux (Doré et Varoquaux., 2006).

I.5.2 Élevage des animaux

La luzerne est une plante cultivée pour la fourragère, car elle constitue une bonne source en protéines par hectare. Elle possède une composition intéressante en minéraux facilement assimilable par les ruminants. Elle renferme aussi au moins dix vitamines essentielles. Ces propriétés font de la luzerne un excellent complément aux céréales pour l'alimentation des animaux. En outre, elle est extrêmement appétissante et facilement digérée (Doré et Varoquaux., 2006). Les tiges et les feuilles de cette plante sont employées comme alimentation pour nourrir une variété d'animaux, notamment les cochons, les lapins, les chevaux, le bétail et d'autres mammifères quadrupèdes (Jan *et al.*,2021).

I.5.3 Agriculture

La luzerne cultivée est utilisée comme engrais vert dans l'agriculture. En tant que légumineuse fixatrice d'azote, elle a la capacité de capturer l'azote atmosphérique et de le fixer dans le sol, ce qui enrichit naturellement le sol en nutriments essentiels pour les cultures suivantes. Elle est bénéfique pour réduire l'érosion et augmenter le rendement des cultures ultérieures (Paniagua Zambrana *et al.*, 2020).

I.5.4 Médecine

La luzerne est traditionnellement utilisée en médecine alternative pour ses propriétés médicinales. Elle a été utilisée par diverses cultures à travers les siècles, notamment par les Chinois, les Indiens, les premiers Américains et d'autres peuples, comme remède pour traiter des problèmes de santé, entre autres le traitement des calculs rénaux, de la fièvre, du gravier, de la dysurie, ainsi que le soulagement de la rétention d'eau, de l'enflure, des ulcères, des douleurs arthritiques et d'autres problèmes intestinaux. De plus, au Mexique, elle est réputée pour améliorer la mémoire, soulager les muscles endoloris et l'inflammation (Nimaan,

2021). La luzerne est bénéfique pour la santé du tube digestif, aide à réguler l'hypertension artérielle et favorise le nettoyage du sang (Busmann *et al.*.,2018).

chapitre II : **Les métabolites**
Secondaires

II.1 Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des plantes sont définis comme des substances qui ne participent pas directement à la croissance régulière, au développement ou à la reproduction, mais ils jouent un rôle essentiel dans l'interaction de la plante avec son environnement. La majorité de ces composés sont associés à la protection des plantes contre les herbivores et les agents pathogènes. Récemment, l'importance des métabolites secondaires des plantes a connu une augmentation en raison de leur utilisation fréquente en tant que médicaments, pesticides et additifs alimentaires (Rafinska *et al.*, 2016).

La luzerne a une teneur élevée en tanins, saponine, flavones et composés phénoliques (Caunii *et al.*, 2012). C'est une source importante de phytoestrogènes, en raison de l'abondance d'alcaloïdes, de phénols, de flavonoïdes et d'isoflavonoïdes dans cette plante (Vahidipour *et al.*, 2023).

II.1.1 Les polyphénols

Les polyphénols, également connus sous le nom de composés phénoliques, sont des métabolites secondaires très répandus dans le règne végétal, présents dans tous les fruits et légumes. Plus de 8000 structures ont été découvertes, allant des molécules simples telles que les acides phénoliques à des substances extrêmement polymérisées telles que les tanins. L'ensemble des végétaux les synthétisent et ils jouent un rôle dans les réactions de défense contre divers stress biotiques ou abiotiques (Dai et Mumper, 2010).

La qualité organoleptique des aliments provenant des végétaux est influencée par les polyphénols (couleur, astringence, arôme, amertume). Ils sont couramment classés en acides phénoliques, coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines et tanins (**Tableau 02**). Les divers composés poly phénoliques contribuent à la protection des plantes contre les agresseurs extérieurs (les microorganismes nuisibles et les ravageurs) et les stress environnementaux (Boubekri, 2014).

II.1.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent la deuxième classe la plus répandue de polyphénols après les flavonoïdes (Amawi *et al.*, 2017). Ils représentent la principale catégorie de composés phénoliques d'origine végétale, bénéficiant de propriétés antioxydantes. Parmi les sources alimentaires à base de plantes, on retrouve notamment les graines, la peau des fruits et les légumes à feuilles, qui sont les principaux pourvoyeurs d'acides phénoliques (Prabhu *et al.*, 2021). Les acides phénoliques se divisent généralement

en deux grands groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Boubekri, 2014).

II.1.1.2 Les stilbènes

Les stilbènes représentent une classe de composés polyphénoliques non flavonoïdes présents dans diverses familles de plantes supérieures. Bien qu'ils se retrouvent dans plusieurs sources alimentaires, notamment les graines, la peau et les tiges du raisin ainsi que dans le vin, leur présence dans l'alimentation humaine est généralement limitée (Boubekri, 2014). Ces composés ne sont synthétisés qu'en réponse à une invasion par des agents pathogènes (Amawi *et al.*, 2017).

II.1.1.3 Les lignines

La lignine est un polymère hautement ramifié, constitué de trois types d'alcools phénoliques simples. Elle se trouve principalement dans les parois cellulaires, notamment dans les parois secondaires des vaisseaux conducteurs, où elle joue un rôle essentiel dans la résistance mécanique et la rigidité des tiges lignifiées. Après la cellulose, la lignine est l'un des biopolymères les plus répandus et accessibles dans la nature (Boubekri, 2014). Des aliments riches en lignine comprennent les graines de lin, les tomates, les pêches, les pommes et diverses baies (Prabhu *et al.*, 2021).

II.1.1.4 Les lignanes

Les lignanes sont des phytoestrogènes (Amawi *et al.*, 2017), des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs et non caloriques. Ils sont présents en concentration plus élevée dans les graines de lin et de sésame, et en concentrations plus faibles dans les fruits et les légumes. Ces substances phénoliques sont liées aux lignines, mais elles ont peu de valeur nutritionnelle pour les humains. Ils se présentent dans la plante sous forme de glucosides (Boubekri, 2014).

II.1.1.5 Les coumarines

Les coumarines ont des effets variables sur le développement des plantes en fonction de leur concentration et de l'espèce. Dans les cellules, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée, ce qui semble être une stratégie de stockage visant à prévenir les effets toxiques de ces composés sur la cellule et sa croissance. Elles sont également classées comme des phytoalexines, des molécules de faible poids moléculaire (Boubekri, 2014). En médecine, certaines coumarines sont utilisées pour leurs propriétés photodynamiques dans le traitement de la psoriasis, et d'autres sont incorporées dans des produits solaires (Krief, 2003).

II.1.1.6 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans notre alimentation (Dai et Mumper, 2010). Ces derniers regroupant plus de 6 000 composés naturels, et sont largement répandus chez les plantes vasculaires. Ils sont composés de quinze atomes de carbone : deux cycles aromatiques A et B, chacun avec six atomes de carbone reliés, accompagnés d'une unité de trois atomes de carbone (Boubekri, 2014). Ils agissent comme pigments responsables des teintes jaunes, oranges et rouges observées dans divers organes végétaux. On les trouve dans une grande variété de fruits et de légumes, ainsi que dans des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière. En outre, de nombreuses plantes médicinales renferment des flavonoïdes, qui ont été utilisés dans la médecine traditionnelle à travers le monde (Ghedira, 2005). Ces composés polyphénoliques sont classés en six sous-groupes : les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanes (Dai et Mumper, 2010).

II.1.1.7 Les tanins

Les tanins sont des composés secondaires végétaux, situés dans les parois cellulaires ou sont stockés dans les vacuoles des tiges, de l'écorce, des feuilles, des fleurs ou des graines, principalement dicotylédones. Historiquement, ils étaient connus et employés pour le tannage des peaux en raison de leur capacité à se fixer sur les protéines et à réticuler les peaux. Les tanins sont des substances phénoliques hydrosolubles dont le poids moléculaire se situe entre 500 et 3000 Da, et ils peuvent précipiter les alcaloïdes et les protéines. Les tanins peuvent être hydrolysables ou condensés (McMahon *et al.*, 1999).

II.1.2 Les saponines

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents surtout chez les plantes supérieures, notamment les Dicotylédones, que l'on retrouve dans différentes parties de la plante telles que les racines, les fruits, les écorces, les tiges, les feuilles et les graines. Elles sont également produites par certains animaux marins comme les concombres de mer et les étoiles de mer. Le terme "saponoside" est dérivé du latin "sapo", signifiant "savon", faisant référence à leur capacité à produire une mousse dans une solution aqueuse. Ces composés sont généralement très polaires et se présentent souvent sous forme de mélanges complexes dans la plante. De plus, elles ont une variété étendue de caractéristiques biologiques et pharmacologiques, telles que des propriétés immunomodulantes, immunoadjuvantes, cytotoxiques, antitumorales et hypocholestérolémiantes (Boutghane, 2013).

II.1.3 Les alcaloïdes

Le terme alcaloïdes (de l'arabe al kaly : la soude, et du grec eidos : aspect) a été introduit par W. Meissner au début du XIX^{ème} siècle" (Jaber, 2017). Il s'agit des éléments azotés simples, naturels, dont l'atome d'azote fait partie d'un système hétérocyclique (Krief, 2003). Trois catégories d'alcaloïdes sont généralement identifiées : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes. En médecine moderne, les alcaloïdes sont largement exploités pour leurs propriétés pharmacologiques. Certains composés sont utilisés comme analgésiques, antipaludiques, anticancéreux, et même comme antibiotiques (Krief, 2003).

Les **Tableaux 2, 3 et 4** présentent la structure et la composition chimique des métabolites secondaires cités précédemment.

Tableau 2: Structure et composition chimiques des polyphénols

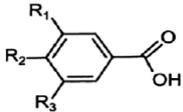
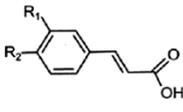
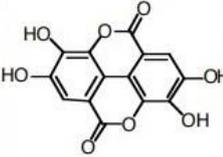
Métabolites secondaires		Composition chimique	Structure chimique
Acides phénoliques	Acide hydroxybenzoïque	Les acides hydroxybenzoïques dérivent de l'acide benzoïque et présentent une formule de base de type C ₆ -C ₁ (Boubekri, 2014).	 <p>(Cutrim et Cortez, 2018)</p>
	Acide hydroxycinnamique	L'acide hydroxycinnamique est un type d'acides aromatiques qui ont une structure de base C ₆ -C ₃ et sont dérivés de l'acide cinnamique (Prabhu <i>et al.</i> , 2021).	 <p>(Cutrim et Cortez, 2018)</p>
Tanins	Hydrolysables	"Les tanins hydrolysables sont des esters de l'acide gallique ou ellagique estérifiés avec le glucose dont le pentagalloyl-D-glucose est le précurseur. reformuler"(Faurie, 2014).	 <p>Acide ellagique 22(Krief, 2003).</p>

Tableau 2: Structure et composition chimiques des polyphénols (suite)

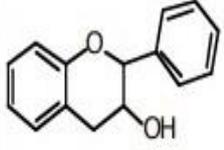
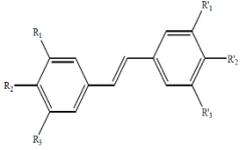
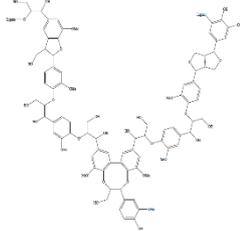
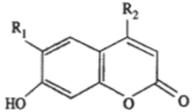
	Condensés	"Les tanins condensés ont pour unité de base le noyau flavan. Ce sont des procyanidines ou des polymères de flavan-3-ol avec la (+) catéchine ou la (-) épicatechine comme unité structurale"(Faurie, 2014).	 <p>flavan-3-ol 23(Krief, 2003).</p>
	Stilbènes	Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, comprenant une fraction centrale d'éthylène et un groupe phényle. Les groupes phényles sont positionnés aux extrémités des doubles liaisons carbonées (Prabhu <i>et al.</i> , 2021).	 <p>(Boubekri, 2014)</p>
	Lignine	La lignine se forme à partir de trois alcools phénoliques simples qui subissent une oxydation en radicaux libres. Ces derniers réagissent ensuite de manière spontanée et aléatoire pour former la lignine (Boubekri, 2014).	 <p>(Boubekri, 2014)</p>
	Lignane	Les lignanes sont des composés qui répondent à une structure de type (C6-C3) ₂ . Ce sont des dimères de phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C6-C3 sont liées par leur carbone 8 (Boubekri, 2014).	 <p>(Amawi <i>et al.</i>, 2017)</p>
	Coumarines	Les coumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés qui ont pour structure fondamentale le benzo-2 pyrone (Boubekri, 2014).	 <p>(Collin <i>et al.</i>, 2011)</p>

Tableau 3 : Structure et composition chimiques des flavonoïdes

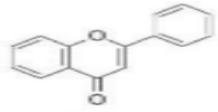
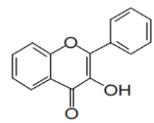
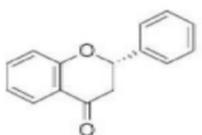
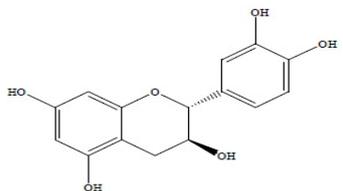
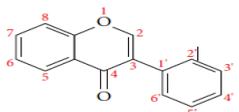
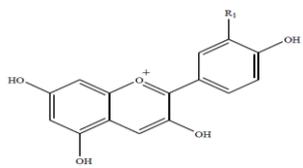
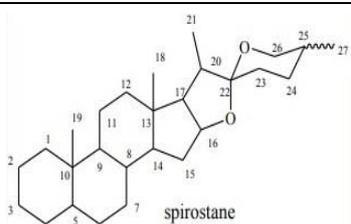
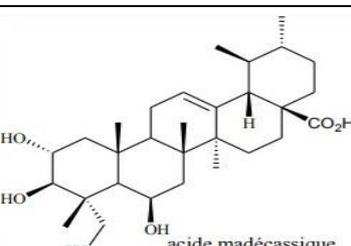
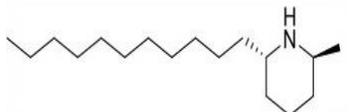
Type de Flavonoïdes	Composition chimique	Structure chimique
Flavones	Les flavones présentent une structure très similaire aux flavonols, leur différence réside uniquement dans l'absence d'hydroxylation en position 3 (Boubekri, 2014).	 (Prabhu <i>et al.</i> , 2021)
Flavonols	Les flavonols se distinguent par leur double liaison en position 2-3 et la présence d'un groupe hydroxyle en C3 (Boubekri, 2014).	 (Daglia, 2012)
Flavanones	Les flavanones se démarquent par l'absence de double liaison en position 2 et 3, ainsi que par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (Boubekri, 2014).	 (Prabhu <i>et al.</i> , 2021)
Flavanols	Flavanols présentent toujours une hydroxylation en C3 et se distinguent par l'absence du groupe carboxyle en C4 (Boubekri, 2014).	 (Boubekri, 2014)
Isoflavones	Les isoflavones, étant des dérivés des flavones, se démarquent par la fixation du cycle B à la position C3 plutôt qu'à la position C2 (Boubekri, 2014).	 (Roy <i>et al.</i> , 2022)
Anthocyanes	Les anthocyanes, des pigments hydrosolubles, proviennent du cation 2-phénylbenzopyrylium, souvent désigné sous le nom de cation flavylum (Boubekri, 2014).	 (Boubekri, 2014)

Tableau 4 : Structure et composition chimiques des saponines et des alcaloïdes

Métabolites secondaires		Composition chimique	Structure chimique
Saponines	Les saponines à génines stéroïdiques	"Les génines stéroïdiques sont constituées d'un squelette à 27 atomes de carbone qui comportent habituellement six cycles" (Andriamasinoro, 2018).	 <p>spirostane (Jaovita, 2013)</p>
	Les saponines à génines triterpéniques	"Les sapogénines triterpéniques sont des molécules pentacycliques de squelette oléanane (dérivés de la β amyrine), ursane (dérivés de la α -amyrine) et lupane" (Andriamasinoro, 2018).	 <p>acide madécassique (Jaovita, 2013)</p>
Alcaloïdes		Les alcaloïdes contiennent un atome d'azote inclus dans un hétérocycle (Krief, 2003)	 <p>La solenopsine (Jaber, 2017)</p>

II.2 Intérêt et activités biologiques de *Medicago sativa*

Les métabolites secondaires sont recherchés en raison de leur grande variété d'activités biologiques. Il y a différentes activités qui sont utilisées dans les domaines industriels de l'agriculture, de l'alimentation et de la pharmacie, telles que des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques et antioxydantes (Marouf et Tremblin, 2009).

Medicago sativa est une plante médicinale qui possède plusieurs activités biologiques, notamment des propriétés antidiabétiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, anti-asthmatiques et antimicrobiennes (Vahidipour *et al.*, 2023), (**Figure 2**).

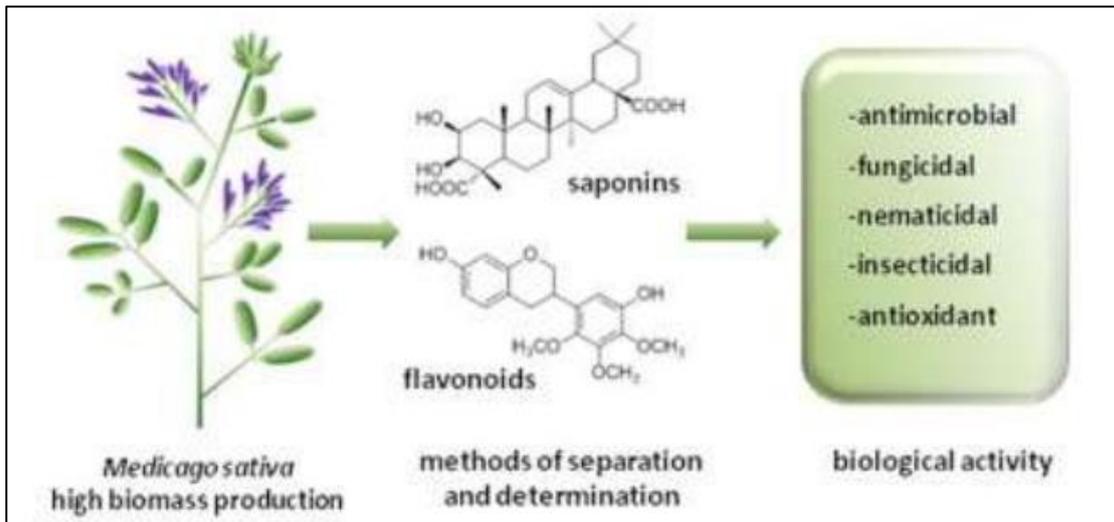


Figure 2 : Les métabolites secondaires et l'activité biologique de *Medicago sativa* (Nimaan, 2021).

II.2.1 L'activité antimicrobienne

Actuellement, l'utilisation inappropriée et irrationnelle des antibiotiques a conduit à l'émergence de populations microbiennes résistantes. Les bactéries pathogènes utilisent différentes stratégies telles que la modification des sites cibles, l'expulsion active des médicaments et la dégradation enzymatique pour développer une résistance intrinsèque aux antibiotiques. Par conséquent, il y a eu un intérêt croissant pour exploitation plantes médicinales, car 25 à 50% des produits pharmaceutiques actuels en sont dérivés. Les extraits bruts de plantes médicinales offrent une source alternative d'agents modifiant la résistance en raison de la diversité des métabolites secondaires qu'ils contiennent, y compris les alcaloïdes, les tanins et les polyphénols. Ces métabolites présentent des propriétés antimicrobiennes potentielles et peuvent modifier la résistance. Par conséquent, les plantes médicinales peuvent non seulement tuer les micro-organismes, mais également interférer avec des événements clés du processus pathogène, réduisant ainsi la capacité des bactéries, des champignons et des virus à développer une résistance aux plantes médicinales (Gupta et Birdi, 2017).

II.2.1.1 L'activité antibactérienne

L'efficacité antimicrobienne de l'extrait aqueux des graines de luzerne a été examinée vis-à-vis des espèces bactériennes notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Ces extraits ont révélé une activité modérée contre les bactéries à GRAM positif, mais aucune action notable contre les bactéries à GRAM négatif (Al-Snafi *et al.*, 2021).

L'activité antimicrobienne des saponines de *Medicago sativa* contre des levures d'importance médicale ainsi que des bactéries à Gram positif et à GRAM négatif, a montré une forte efficacité contre les bactéries à GRAM positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* (Avato *et al.*, 2006).

II.2.1.2 L'activité antifongique

L'extrait méthanolique de *Medicago sativa* à différentes concentrations (de 1% à 5%) montre une inhibition de la croissance de la moisissure *Rhizoctonia solani*. Les concentrations les plus efficaces étaient 5 % et 4%, puisqu'ils ont limité la croissance de *Rhizoctonia solani* à 77% et 75 % respectivement (Anwaar *et al.*, 2020).

L'effet antifongique des fractions riches en saponine de *Medicago sativa*, provenant tant des parties aériennes que des racines, contre *Candida albicans*. Les extraits riches en saponine peuvent agir soit par inhibition de la formation du tube germinatif de *Candida albicans*, par ralentissement la croissance des hyphes, par diminution de l'adhérence des levures et ainsi par élimination du biofilm mature de *Candida* en 24 heures (Al-Snafi *et al.*, 2021).

II.2.1.3 Le mode d'action antimicrobien des métabolites secondaires

Le mode d'action antimicrobien des métabolites secondaires (les polyphénols, les alcaloïdes, les tanins...) peut être dû à l'inactivation de l'enveloppe cellulaire, l'augmentation de la perméabilité et la perturbation de la membrane plasmique, la capacité de s'intercaler avec l'ADN de ce fait entraînant une altération de la division cellulaire et par conséquent la mort cellulaire (Gupta et Birdi, 2017).

II.2.2 L'activité antioxydante

De nombreux organismes déploient un système de défense antioxydant, qui comprend la capture des radicaux libres, diverses enzymes et antioxydants non enzymatiques, ainsi que des agents chélatants métalliques pour contrer les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène. De nombreuses plantes médicinales et aliments, tels que les légumes, les fruits et les céréales, regorgent d'antioxydants naturels. De plus, des composés phytoestrogéniques ainsi que divers types de vitamines sont des antioxydants bien connus présents dans de nombreuses plantes. Dans ce contexte, *Medicago sativa* (luzerne) se distingue comme l'une des herbes riches en composés phytoestrogéniques, tels que l'apigénine, la lutéoline, le coumestrol, la quercétine, le medicarpin, la daidzéine et la génistéine, ainsi que diverses vitamines, en particulier la vitamine C (Raeeszadeh *et al.*, 2022).

II.2.3 L'activité antiinflammatoire

Les extraits de feuilles de *Medicago sativa* (à des concentrations allant de 7,8 à 500 µg/ml) ont été évalués pour leur capacité à inhiber la libération de Monoxyde d'azote (NO) par les cellules 264,7 BRUTES, stimulées par le Lipopolysaccharides (LPS) bactérien et Interféron gamma (l'IFN- γ). Les résultats ont montré que l'extrait possédait une activité anti-inflammatoire modérée, avec une inhibition de 50% de la production de NO par les cellules 264,7 BRUTES évaluée observée à une concentration de 147,24 µg/ml d'extrait de luzerne (Al-Snafi *et al.*, 2021).

Partie expérimentale

chapitre I: **Matériel et Méthodes**

Ce projet de fin d'étude a été effectué au niveau de Laboratoire de l'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) située au Chaab-Ersas, puis au niveau du Laboratoire de Mycologie du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.B.T), ainsi au niveau du Laboratoire de Microbiologie de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, Algérie.

L'objectif de ce travail est d'extraire les composés bioactifs des extraits obtenus des parties aériennes (feuilles et tiges) et racinaires de *Medicago sativa* et d'évaluer leur activité antimicrobienne.

I.1 Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur la partie aérienne (tiges et feuilles) et la partie racinaire de la plante *Medicago sativa*.

La récolte de la plante a été effectuée le 23 Février 2024, à partir d'une ferme (**Figure 3 et 4**) affilié à la station expérimentale de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de la région de Baaraouia El Khroub Constantine. Algérie. Les différentes parties ont été bien nettoyées et séchées pendant huit jours à température ambiante dans un endroit sec et aéré.



Figure 3 : La localisation géographique du site de prélèvement (Google Maps) consulté le 23/02/2024



Figure 4 : Le champ de la luzerne cultivée (photo réelle)

I.2 Préparation du matériel végétal pour l'extraction

Les différentes parties de la plante ont été lavées avec de l'eau de robinet, et bien nettoyées des particules du sol et d'argile, et sont ensuite soumis à un séchage pendant huit jours dans un endroit aéré sec et à l'abri de la lumière à température ambiante. Après le séchage complet du matériel végétal, les feuilles, les tiges ainsi les racines ont été coupées en petits morceaux et broyées finement à l'aide d'un mortier traditionnel et un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre végétale fine (**Figure 5**).



Figure 5 : La préparation du matériel végétal pour l'extraction

I.3 Extraction de la partie aérienne (macération à froid)

La macération est un procédé où la poudre d'un matériel végétal est laissée en contact prolongé avec un solvant pour extraire ses principes actifs (Feknous *et al.*, 2014). 362,32 grammes de la poudre de la partie aérienne a été pesé à l'aide d'une balance. Cette quantité est mise à une macération dans un mélange hydro-méthanolique (30%/70%) (**Figure 6**), à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 48 heures. Ce processus est répété deux fois avec renouvellement du solvant, mais pendant seulement 24 heures à chaque fois. Le mélange est ensuite filtré à travers un coton hydrophile à l'aide d'un entonnoir dans un Erlenmeyer (**Figure7**).



Figure 6 : La macération au froid



Figure 7 : L'étape de la filtration

I.4 Extraction de la partie racinaire (Soxhlet)

L'extraction par Soxhlet représente une méthode simple et appropriée pour l'extraction solide-liquide (Penchev, 2010). Dans un ballon de 2000 ml, nous avons ajouté 1500 ml de solvant d'extraction (acétone). Parallèlement, nous avons placé 48,24 grammes de matière végétale sèche (racines broyées) dans une cartouche en papier filtre (Wattman N°3), conçue pour être perméable aux solvants, que nous avons insérée dans l'extracteur (**Figure 08**). Une fois le système de réfrigération chauffé, des vapeurs de solvant se sont condensées au niveau du réfrigérant et sont tombées goutte à goutte sur la cartouche. Après un certain temps, le solvant a commencé à extraire la matière végétale, formant ainsi un cycle fermé d'extraction, comprenant plusieurs étapes : ébullition, vaporisation, condensation et extraction. Lorsque le niveau du solvant d'extraction a atteint le sommet du siphon, celui-ci s'est amorcé et la solution est retombée dans le ballon à travers le tube de siphonage pour se concentrer. Nous avons effectué plusieurs siphonages (plusieurs cycles) jusqu'à ce que le solvant devienne clair. Après refroidissement, l'extrait accumulé dans le solvant est récupéré.

Le filtrat de la partie aérienne et le solvant de la partie racinaire ont été soumis à une évaporation à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R-300, BUCHI) (**Figure 09**), afin d'obtenir un extrait brut.



Figure 8 : Extraction par Soxhlet



Figure 9 : Évaporation par le Rotavapor

Le résidu de la partie racinaire a été récupéré et laissé sécher à température ambiante, tandis que l'extrait brut de la partie aérienne a été dissous dans d'eau distillée pendant quelques minutes. Il a été laissé à décanter à froid pour éliminer les cires et les graisses.

La matière végétale racinaire restante dans la cartouche a été récupérée et macérée dans un mélange hydro-méthanolique (30%/70%) afin de récupérer le maximum de composés. Nous avons appliqué les mêmes étapes de filtration et d'évaporation que pour la partie aérienne.

I.5 Extraction liquide-liquide

La technique d'extraction liquide-liquide consiste à combiner les deux phases liquides (aqueuse et organique) dans une ampoule à décanter. Après un mélange énergique, les phases sont autorisées à se séparer naturellement. Ensuite, la phase inférieure, généralement aqueuse, est vidangée par le robinet situé dans la partie inférieure de l'ampoule, suivie par la récupération de la phase supérieure, souvent organique (solvant) (Thi Kieu Tiên Do, 2016).

L'extrait aqueux obtenu a été soumis successivement à une série d'extractions de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter (**Figure 10**), en utilisant des solvants de polarité croissante allant de l'apolaire au très polaire. Les solvants utilisés étaient l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol. Initialement, l'éther de pétrole est utilisé pour éliminer les lipides. Ensuite, le chloroforme est ajouté pour extraire les molécules apolaires. Par la suite, trois extractions à l'acétate d'éthyle ont été effectuées pour récupérer la majorité des composés phénoliques et flavoniques. Enfin, un épuisement quatre fois avec le butanol a été assuré pour récupérer les molécules polaires. Les quatre phases organiques ainsi obtenues ont été évaporées à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, à des températures comprises entre 40°C et 50°C (**Figure 11**).

Les masses récupérées par évaporation ont été diluées dans le méthanol et laissées séchées complètement à l'abri de la lumière et à température ambiante.

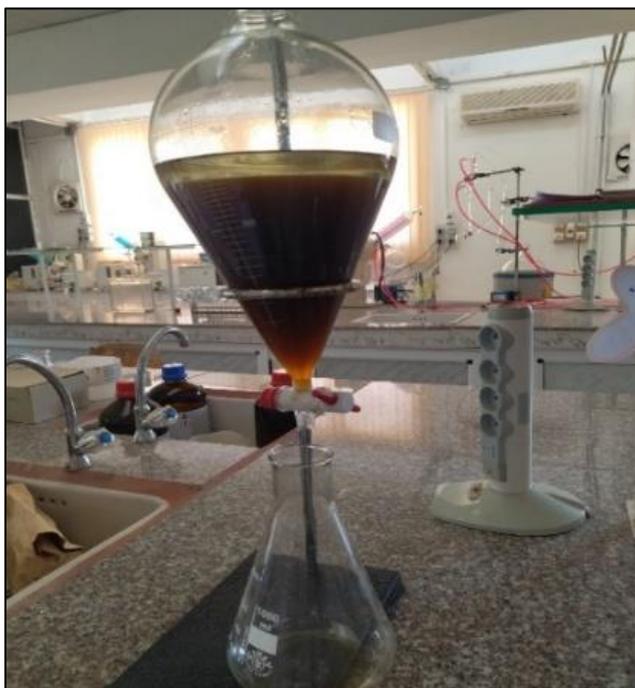


Figure 10 : Ampoule à décanter

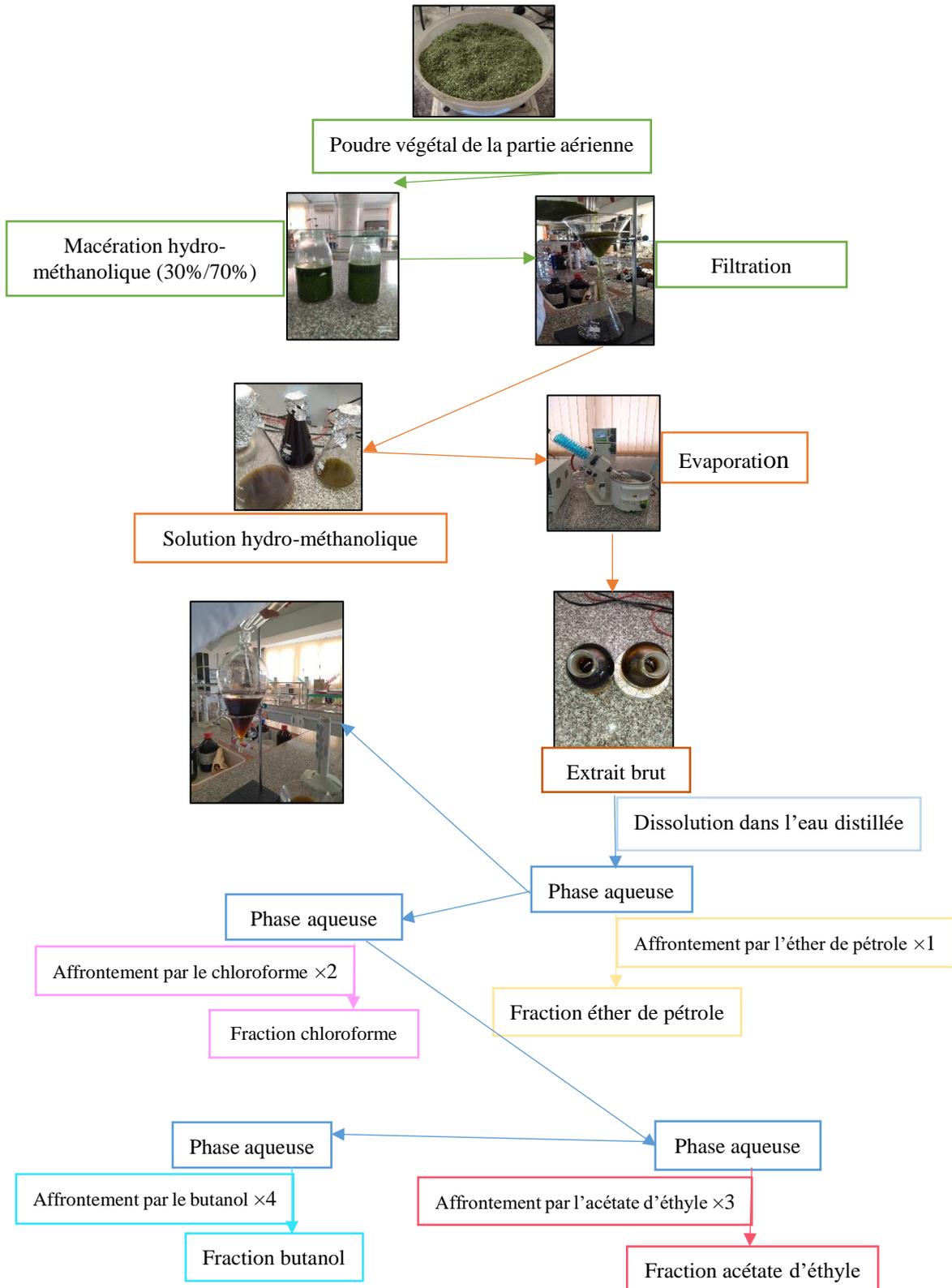


Figure 11 : Schéma illustratif du protocole de l'extraction de la partie aérienne de *Medicago sativa*

I.6 Calcul du Rendement de l'extraction

$$R(\%) = (M_{\text{ext}}/M_s) \times 100$$

-**R (%)** : Rendement exprimé en %.

-**M_{ext}** : La masse en gramme de l'extrait sec résultant.

-**M_s** : La masse initiale en gramme de la plante sèche.

I.7 Screening Phytochimique de la plante étudié

Les tests phytochimiques consistent à identifier les différentes familles des métabolites secondaires existant dans les parties aériennes de *Medicago sativa*, et ceci par une caractérisation qualitative.

I.7.1 Test des polyphénols

La caractérisation des polyphénols a été réalisée en utilisant la réaction au chlorure ferrique (FeCl₃). Pour ce faire, 2 ml de l'extrait ont été mélangés avec une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 %. L'observation d'une coloration bleu-noirâtre ou verte, dont l'intensité varie, indique la présence de polyphénols (N'Guessan *et al.*, 2009).

I.7.2 Test des flavonoïdes

La méthode la plus couramment utilisée pour caractériser les flavonoïdes est la réaction de cyanidine. En présence de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et de quelques copeaux de magnésium sur 2 ml d'extrait brut, les flavonoïdes provoquent un dégagement d'hydrogène et induisent une coloration variant de l'orange au rouge pourpre (Najjaa *et al.*, 2010).

La présence de flavones est généralement indiquée par une coloration rose-orangée, tandis que les flavanones produisent une coloration rose-violacée. Quant aux flavonols et aux flavanonols, leur présence est mise en évidence par une coloration rouge (Mouellet, 2004).

I.7.3 Test des tanins

Les tanins ont été identifiés grâce à la réaction de Bate-Smith : quelques milligrammes d'extrait brut ont été ajoutés à 1 ml de HCl concentré, puis le mélange a été porté à ébullition pendant dix minutes. L'apparition d'une couleur rouge brique indique la présence des tanins (Houta *et al.*, 2012).

I.7.4 Test des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été identifiés en utilisant le réactif de Dragendorff. Nous avons ajouté 1ml d'extrait dans un tube à essai, suivi de l'ajout de cinq gouttes du réactif

Dragendorff dans le tube. La formation de précipités dans les tubes indiquait la présence d'alcaloïdes (Bammou *et al.*, 2014).

I.7.5 Test des saponosides

Les saponines ont été évaluées quantitativement en calculant l'indice de mousse, qui correspond au degré de dilution d'un décocté aqueux qui donne une mousse persistante dans des conditions spécifiques. 1g d'extrait végétal brut à tester pour faire une décoction avec 100 ml d'eau. Après chauffage pendant 15 minutes, le volume est ajusté à 100 ml. Cette solution mère est utilisée pour préparer 11 tubes contenant successivement 0 à 5 ml d'extrait aqueux, le volume final étant réduit à 10 ml avec de l'eau distillée (**Tableau 05**). Ensuite, chaque tube est agité vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes (Vigor *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Série des dilutions de l'extrait brut pour la mesure de l'indice de mousse

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Extrait brut (ml)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Eau distillé (ml)	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6,5	6	5,5	5

Après un repos de 15 minutes en position verticale, la hauteur de la mousse persistante est mesurée en centimètres. Si elle est proche de 1 cm dans un tube précis, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{IM = inverse C \times D}$$

-**C** : Concentration initiale de l'extrait

-**D** : Dilution dans le tube ou la mousse >1

I.8 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique physique de séparation des mélanges en leurs composants individuels. Elle repose sur les variations d'affinité des substances envers deux phases distinctes : une phase stationnaire solide fixée sur une plaque (généralement gel de silice), et une phase mobile liquide, connue sous le nom d'éluant, composée d'un solvant ou d'un mélange de solvants. Une petite quantité du mélange à séparer est déposée sur la phase stationnaire, puis mise en contact avec la phase mobile. Par capillarité, la phase mobile se déplace du bas en haut le long de la phase stationnaire, entraînant avec elle les constituants du mélange (Zahir *et al.*, 2018).

Les extraits sont déposés sous forme de bandes fines sur la plaque, qui sera ensuite placée dans une cuve munie d'un support, contenant la phase mobile. Deux systèmes solvants ont été utilisés : le premier système solvant est (chloroforme / méthanol) (9,5/0,5) et le deuxième système solvant est (chloroforme / méthanol / eau) (7/3/0,5). Ces systèmes ont été choisis après plusieurs essais. Après le développement et le séchage des plaques, les bandes séparées sont marquées et délimitées dans une chambre noire sous la lumière UV à 254 et 365 nm. Ensuite, les plaques de CCM ont été révélées par un révélateur qui est la vanilline.

I.9 Evaluation de l'activité antimicrobienne

I.9.1 Matériel biologique

Nous avons utilisé trois souches fongiques : (deux moisissures et une levure), et quatre souches bactériennes pour évaluer l'activité antimicrobienne de six extraits de notre plante, l'ensemble des souches sont représentées ci-dessous :

***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404**

La moisissure appartient à la famille des Trichocomaceae (Gugnani, 2003). Elle fait partie du groupe d'organismes des aspergilles noires (Simões *et al.*, 2013). Ses spores se présentent sous forme de têtes conidiales globuleuses (Varga *et al.*, 2007). *A. brasiliensis* est responsable de deux cas de kératite fongique en Inde (Manikandan *et al.*, 2010).

***Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* (FOL)**

Moisissure avec mycélium blanchâtre, cotonneux et dense, ses conidiophores très courts voire invisibles, macroconidies cloisonnées (Hlaiem *et al.*, 2021). Elle représente l'agent pathogène principal responsable du flétrissement vasculaire observé chez les plants de tomate (Srinivas *et al.*, 2019).

***Candida albicans* ATTC 10 231**

Appartienne à la famille des Saccharomycetaceae (Nielsen *et al.*, 1990). C'est une levure bourgeonnante et pseudohyphale avec un vrai hyphes filamenteux. Elle provoque la candidose sanguine et les infections des muqueuses (par voie orale ou vaginite) (Berman, 2012).

***Escherichia coli* NCTC 10.538**

Une bactérie bâtonnet à GRAM négatif, de la famille des Enterobacteriaceae, anaérobie facultatif. *E. coli* provoque des infections intestinales ou extra-intestinales, des infections des voies urinaires et des infections respiratoires ou rénales (Basavaraju et Gunashree, 2022).

***Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 86 26**

C'est un bacille à GRAM négatif aérobie (Michel-Briand et Baysse, 2002), de la famille des pseudomonaceae (Palleroni, 2015). Il provoque des pneumonies, des infections des voies urinaires, des infections du sang et des infections nosocomiales (Driscoll *et al.*, 2007).

***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

C'est un coccus à GRAM positif, de la famille des Staphylococcaceae, anaérobie facultatif. Il provoque des infections cutanées, des infections du système nerveux central, des infections des voies urinaires (Gulzar et Zehra, 2018), des toxi-infections et des infections opportunistes (Pellerin *et al.*, 2009).

***Bacillus subtilis* ATCC 66 33**

C'est un bacille à GRAM positif, aérobie anaérobie facultative de la famille des Bacillaceae (León *et al.*, 2022).

I.9.2 Préparation des solutions des extraits

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits (extrait brut, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, acétone et hydro-méthanolique), les solutions des extraits sont préparées à raison de 100 mg de chaque extrait dans 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) stérilisé par filtration (à l'aide de filtres à seringue de 0,2 µm) (**Figure 12**).

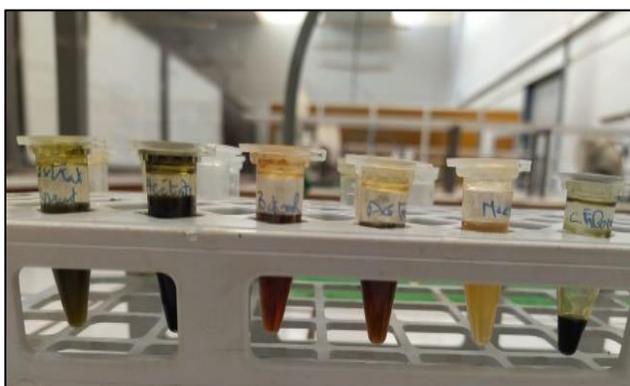


Figure 12 : les différentes solutions des extraits végétaux

I.9.3 L'activité antifongique

Les extraits végétaux ont été testés contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* afin d'évaluer leurs propriétés antifongiques. Des bouchons pathogènes (disques de champignons) d'un diamètre de 5 mm, prélevés aux bords de croissance des colonies, ont été disposés au centre de boîtes de Petri contenant le milieu PDA. Ensuite, 25µl d'extraits végétaux à une concentration de 30 mg/100µl ont été appliqués sur le dessus de chaque

bouchon. Les témoins positifs ont été obtenus en appliquant 25µl de DMSO, tandis que les témoins négatifs ont été ensemencés uniquement avec le disque de champignon. Les boîtes ont ensuite été incubées à 30°C pendant 48 heures. La croissance de l'agent pathogène a été mesurée en termes de diamètre de colonie. Chaque traitement a été répété trois fois (Vinale *et al.*,2006).

Les mêmes étapes ont été appliquées pour *Aspergillus brasiliensis* (**Figure 13**).

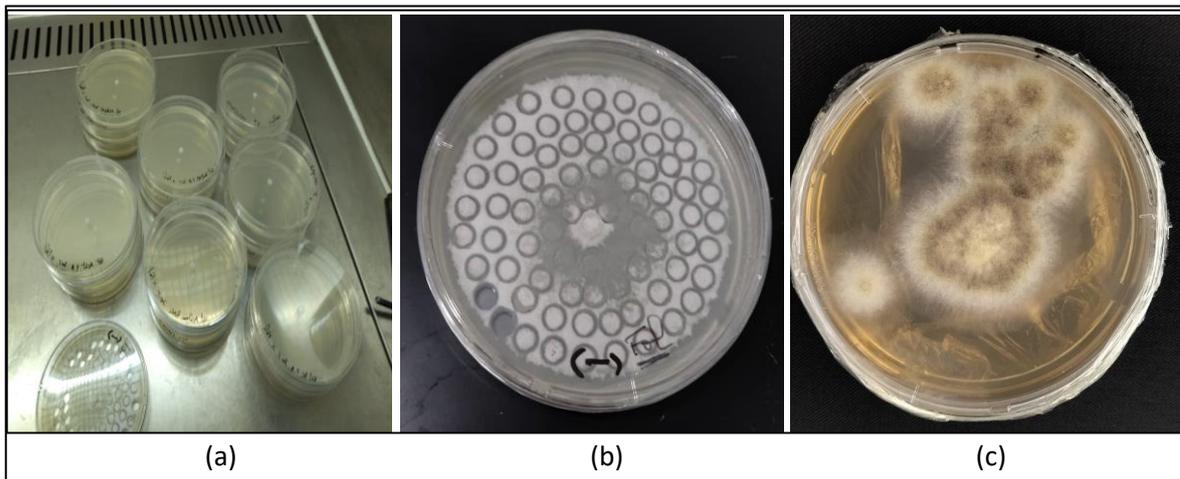


Figure 13 : les boîtes contenant les disques de champignon (a), *Fusarium oxysporum* (b), *Aspergillus brasiliensis*(c)

Après l'incubation, le diamètre des colonies des champignons est mesuré en millimètre pour calculer le taux d'inhibition selon la loi suivante:

$$(I)\% = (C - T)/C \times 100$$

-I % : Taux d'inhibition

-C : moyenne du témoin positif

-T : moyenne de l'extrait

I.9.4 L'activité antimicrobienne

I.9.4.1 Repiquage des souches testées

Les souches bactériennes testées ont été repiquées à partir des boîtes de conservation en utilisant la méthode des stries, sur la gélose nutritive à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37°C pour les bactéries et à 30 °C pour la levure, pendant 24 heures afin d'obtenir des cultures jeunes.

I.9.4.2 Préparation de l'inoculum

A partir des cultures jeunes, trois à quatre colonies bien isolées de chaque souche, ont été prélevé à l'aide d'une anse de platine, et transférées dans des tubes contenant du bouillon nutritif. Les suspensions bactériennes ont été homogénéisées à l'aide d'un vortex, afin d'obtenir une densité optique comprise entre 0.1 et 0.2 (correspondant à 10^8 UFC/ml), équivalente à 0.5 de l'échelle de McFarland.

I.9.4.3 Ensemencement

Chaque inoculum est ensemencé par écouvillonnage sur le milieu Mueller-Hinton, préalablement coulé dans des boîtes de Pétri à une épaisseur de 4 mm.

I.9.4.4 Etude qualitative des extraits analysés

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits de la plante *Medicago sativa*, deux méthodes qualitatives différentes ont été utilisé : la méthode de diffusion sur disque de papier Whatman N°4 et la méthode des puits sur milieu solide.

a) Méthode des puits

La méthode de diffusion sur gélose en utilisant la technique des puits, selon le protocole décrit par **Dieye et al., (2022)**. Dans les boîtes ensemencées avec l'inoculum bactérien et la levure, des puits de 6 mm de diamètre ont été créé dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Ces puits ont été remplis de 50 μ l d'extraits végétaux à une concentration de 100 mg/ml. Chaque extrait a été testé trois fois dans la même boîte. Les puits des témoins positifs ont été remplis de DMSO. La mesure des zones d'inhibition a été effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 heures à 30°C pour la levure.

b) Méthode de diffusion sur disques d'extraits

Cette technique a été effectuée pour déterminer la résistance des bactéries, selon la méthodologie de **Ponce et al., (2003)**. Premièrement, des disques de papier Whatman stériles de diamètre 6 mm, de type N°4, ont été déposé l'aide d'une pince stérile sur la surface des boîtes déjà inoculées. Ensuite, 20 μ l de chaque extrait végétal à une concentration de 100 mg/ml, ont été déposés sur chaque disque préalablement placé. Chaque extrait a été soumis à trois répétitions dans la même boîte. Le témoin positif a été imprégné de DMSO. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 48 heures pour la levure.

La lecture se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en millimètre, dont les résultats sont exprimés d'après **Ponce et al., (2003)** selon quatre niveaux d'activité :

- Non sensible ou résistant (-) pour les diamètres inférieurs à 8 mm.
- Sensible (+) pour les diamètres compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible (++) pour diamètres compris entre 15 et 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20 mm.

I.9.4.5 Etude quantitative des extraits analysés

a) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ont été évaluées en utilisant la méthode de micro-dilution sur bouillon Mueller-Hinton, dans des microplaques à 96 puits, selon le protocole décrit par **Dieye *et al.*, (2022)**. Les CMI ont été déterminées pour les extraits végétaux (chloroforme, acétate d'éthyle et acétone) de *Medicago sativa* qui ont montré un diamètre d'inhibition égal ou supérieur à 8 mm. Pour chaque test, 100 µL de milieu Mueller-Hinton liquide ont été introduit dans chaque puit de la microplaque. Ensuite, 100 µl de la solution initiale de chaque extrait, ayant une concentration de départ de 200 mg/ml (sauf le chloroforme avec une concentration de 100mg/ml), ont été ajoutés dans le premier puits. Après mélange, 100 µl de ce mélange ont été transférés dans le puits suivant et ainsi de suite, permettant d'obtenir une gamme de concentrations allant de 100 mg/ml à 0,195 mg/ml. Par la suite, 50 µL des différentes suspensions microbiennes ont été ajoutés dans chaque puits. Cette procédure a été répétée deux fois (**Figure 14**). Les deux premiers puits contiennent les témoins et le test positif est réalisé dans une microplaque individuelle. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37 °C pour les bactéries et à 30 °C pour la levure pendant 24 heures. La CMI d'un extrait vis-à-vis une souche est définie comme la concentration de cet extrait dans le dernier puits où aucune croissance microbienne n'a été observée.



Figure 14 : les étapes de l'évaluation de l'activité antibactérienne

b) Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

Selon **Traore *et al.*, (2012)**, la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est définie comme la plus faible concentration de substance qui permet de laisser au plus 0,01% de germes survivants. En utilisant une micropipette calibrée à 10 μ l, les contenus des puits dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés etensemencés sur une gélose Mueller-Hinton, en commençant par le puits ayant une concentration supérieure à la CMI. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les boîtes dans lesquelles aucune croissance n'a été observée, correspondent à la CMB.

chapitre II : **Résultats et Discussion**

II.1 Rendement

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs en poids de l'extrait sec (g) par rapport au poids de la matière végétale sèche initiale (g).

Les rendements d'extraction des composés actifs des parties aériennes et racinaires de la plante étudiée, selon différentes méthodes, sont récapitulés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 :Rendement d'extraction de la plante *Medicago sativa*

Matériel végétal	Méthode d'extraction	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Partie aérienne 362,32 g	Macération	Brut	92,66 g	25,57%
	Extraction liquide-liquide	Ether de pétrole	0,10 g	0,02%
		Chloroforme	0,250 g	0,06%
		Acétate d'éthyle	0,85 g	0,23%
		Butanol	4,03 g	1,11%
Partie racinaire 48, 24 g	Soxhlet	Acétone	1,09 g	2,25%
	Macération	Hydro-méthanolique	6,06 g	12,56%

Les résultats obtenus révèlent des différences de rendement entre les extraits de la partie aérienne. L'extrait brut obtenu de la macération hydro-méthanolique, à froid présente le rendement le plus élevé évalué à 25,57%, suivi par les extraits obtenus de l'extraction liquide-liquide. Le meilleur rendement de 1,11%, est mesuré dans l'extrait Butanolique, suivi par l'extrait AcOEt avec 0,23%, puis l'extrait chloroformique avec 0,26%, et enfin l'extrait d'éther de pétrole avec le rendement le plus faible, à 0,02%.

Concernant la partie racinaire, les résultats indiquent que l'extrait hydro-méthanolique présente le rendement le plus élevé, à 12,56%, par comparaison à l'extrait de l'acétone obtenu par Soxhlet, qui a donné un rendement de 2,25%. La **Figure 15** regroupe ces résultats.

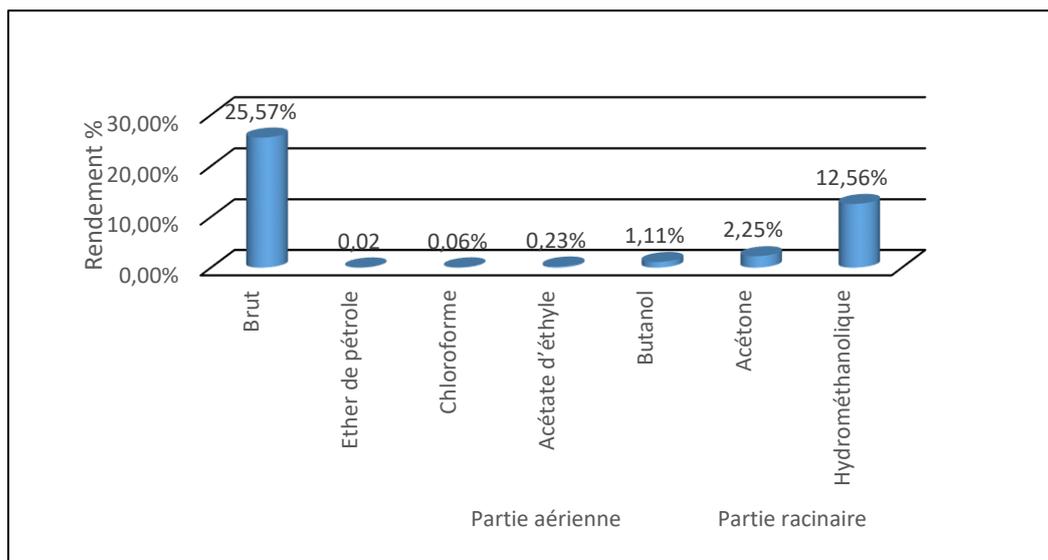


Figure 15 : Les rendements d'extraction des parties aériennes et racinaires de *Medicago sativa*

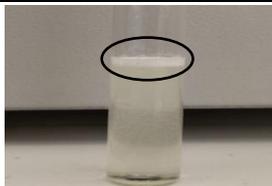
On constate que le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. Les solvants polaires sont efficaces pour pénétrer dans la poudre végétale et extraire un maximum de métabolites. En revanche, les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, et par conséquent, ils sont moins efficaces pour extraire les molécules bioactives (Ghedadba *et al.*, 2014). Ainsi, le rendement est influencé par la quantité de l'eau utilisé, la méthode et le temps d'extraction qui ont un impact sur l'amélioration du rendement (Do *et al.*, 2013). En effet, les conditions édaphochimiques (structure et pH du sol, salinité du lieu de récolte, température, air, altitude etc.), la période de la récolte (floraison ou état végétatif) ainsi que les conditions d'entreposage sont à priori considérées comme responsables des variations des rendements en principes actifs (Allun, 2013).

D'une manière générale, les rendements des extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction (la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant). Il a été démontré que les rendements sont plus élevés pour les extraits aqueux (Majhenic *et al.*, 2007) ce qui concorde avec nos résultats.

II.2 Screening phytochimique par réactions colorées

Le screening phytochimique nous a permis de détecter la présence de certains métabolites secondaires dans la partie aérienne (tiges et feuilles) de *Medicago sativa*. Les tests ont été effectués sur l'extrait brut, et la détection de ces composés est basée sur des changements de couleur et des précipitations en utilisant des réactifs spécifiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : le screening phytochimique de la partie aérienne de *Medicago sativa*

Tests	Résultat positif (présence du métabolite)	Observations obtenue	
polyphénols (Réaction au chlorure ferrique FeCl ₃)	Coloration bleu- noirâtre Ou verte	+++	
flavonoïdes (Réaction de Cyanidine)	-Coloration rouge : (flavanonols) -Coloration rose- violacée : (flavanones) -Coloration orange : (flavones)	+++ (flavones)	
Tanins (Réaction de Bate- Smith)	Coloration rouge brique	++	
Alcaloïdes (Réactif de Dragendorff)	Formation de précipité	-	
saponines (Indice de mousse)	Formation d'une mousse avec une hauteur persistante	+	

(+++): Résultat positif fort, (++) : Résultat positif moyen, (+) : Résultat positif faible, (-) : Résultat négatif.

Concernant le test de la mise en évidence des saponosides dans l'extrait brut, on note la formation d'une mousse persistante dans le tube numéro 11 pendant un quart d'heure, atteignant une hauteur d'un centimètre, ce qui indique la présence de saponines. L'indice de mousse est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{IM = inverse C \times D}$$

C : Concentration initiale de l'extrait = 1/ 100

D : Dilution dans le tube N°11 = 5 / 10

IM = 1/100×5/10 =5/1000

IM = l'inverse 5/1000 = 1000/5 = **200 > 100**.

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait brut de la partie aérienne de cette plante, révèle la présence de quatre groupes de métabolites secondaires, à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les saponines. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'autres études antérieures (El-Desoukey, 2015) et (Ghani et Ahmed, 2019).

L'absence totale d'alcaloïdes dans notre plante, contrairement à ce qui est rapporté dans d'autres études, peut s'expliquer par les variations entre les espèces, les conditions climatiques et géographiques et les périodes de récolte, ainsi que par les différences dans les caractéristiques des sols.

Ces métabolites secondaires identifiés dans cet extrait possèdent des propriétés thérapeutiques. En effet, les flavonoïdes sont connus principalement par leur rôle « veinoactif » c'est-à-dire de diminution de la perméabilité des capillaires sanguins et du renforcement de leur résistance (Wichtl et Anton, 2003). Les flavonoïdes possèdent des effets thérapeutiques contre plusieurs maladies telles que la toux, la grippe, la fièvre, l'asthme, l'hypertension, et les intoxications (Daira *et al.*,2016).

Les tanins constituent de bons remèdes dans le traitement des maladies respiratoires et contre la toux. Par voie interne, les tanins exercent une activité anti-diarrhéique. Ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques sont clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et de dermatites. Les tanins possèdent une forte activité antioxydante, ce sont de très bons pièges des radicaux libres. Les polyphénols sont connus par leurs propriétés antioxydantes très importantes.

Certains saponosides possèdent une activité expectorante, une activité anti-inflammatoire et antifongique. Ils possèdent également des propriétés édulcorantes, utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Daira *et al.*, 2016).

II.3 Fractionnement des extraits par Chromatographie sur Couche Mince

Les extraits obtenus des parties aériennes et racinaires de cette plante (extrait brut, extrait chloroformique, extrait acétate d'éthyle, extrait butanolique, extrait acétone et hydro-méthanolique) sont séparés par analyse en chromatographie sur couche mince. Les taches

correspondantes sur les chromatogrammes ont été identifiées sous lumière UV. **Les Figures 16 et 17** relatives aux résultats de la CCM. Après observation des chromatogrammes à 254 et 365 nm à la lampe UV, et après révélation à la vanilline, on note la présence de plusieurs taches de différentes couleurs, ce qui confirme la richesse de notre extrait en métabolites secondaires.

Au vu de la **Figure 16**, le premier système éluant (chloroforme /méthanol) (9,5/0,5) a donné une meilleure séparation des extraits brut, chloroformique, acétate d'éthyle et acétonique. Ce système a permis de séparer un nombre considérable de composés (entre six et sept composés) pour chaque'un des extraits. Par contre, le deuxième système éluant (chloroforme / méthanol / eau) (7/3/0,5) a donné une bonne séparation de l'extrait butanolique, avec cinq composés séparés (**Figure 17**). Toutefois, aucun des deux systèmes éluants n'a permis une bonne séparation de l'extrait hydro-méthanolique de la partie racinaire.

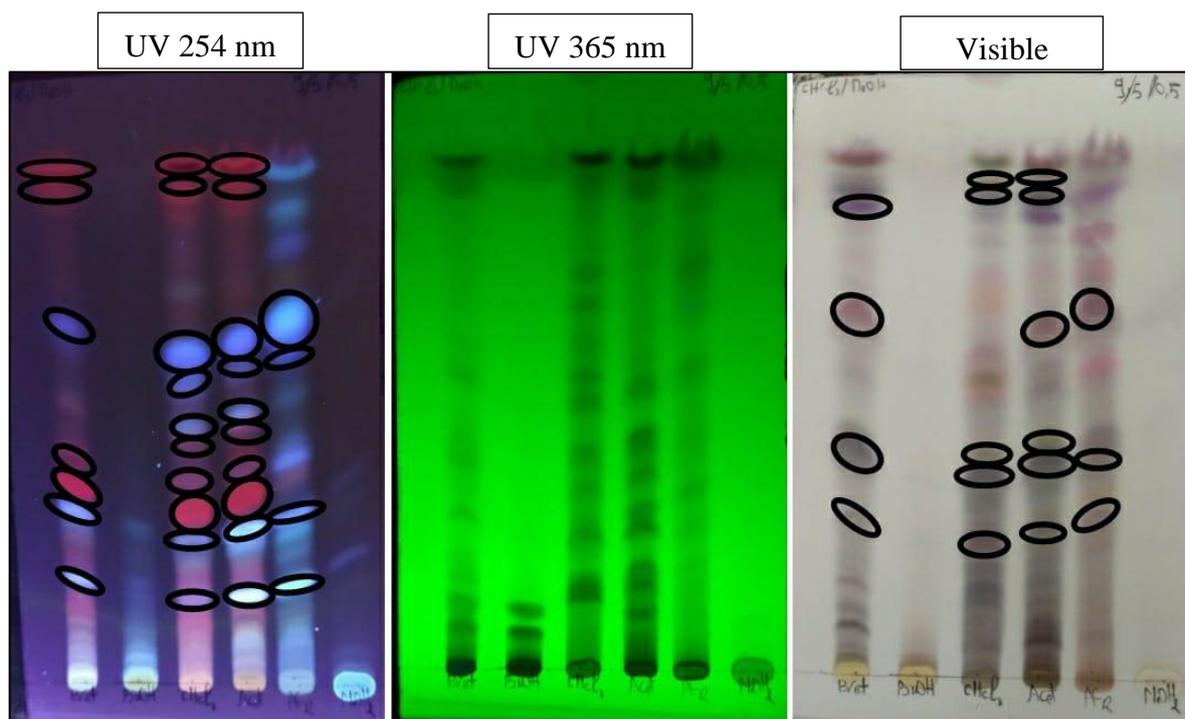


Figure 16 : Plaques CCM développées dans le 1^{er} système éluant (chloroforme / méthanol) (9,5 /0,5)

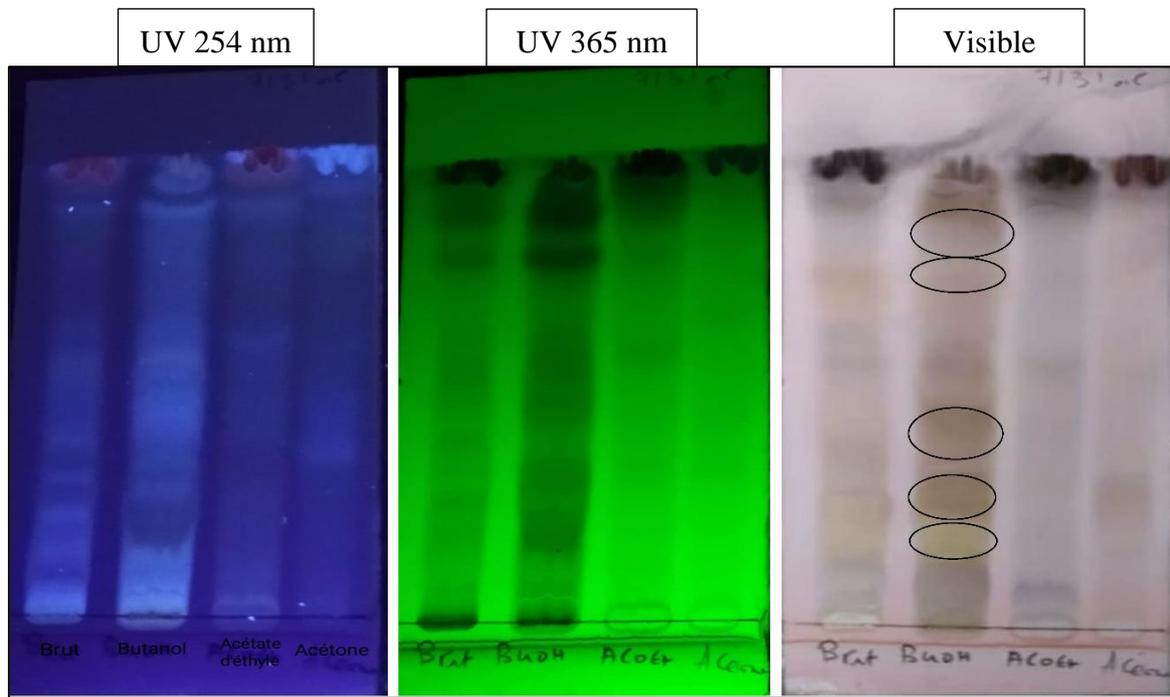


Figure 17 : Plaques CCM développées dans le 2^{ème} système éluant (chloroforme / méthanol / eau) (7/3/0,5)

Tableau 8 : Les métabolites secondaires des extraits identifiés par CCM

Système	Extrait	Couleur des taches	Type de métabolites secondaires possible
Système 1	Brut	-Rose -Mauve -Rouge -Mauve -Mauve -Rouge	-Anthocyanes -Flavones -Anthocyanes -Flavones -Flavones -Anthocyanes
	Chloroforme	-Bleu -Mauve -Vert -Rose -Bleu -Mauve -Vert	-Comarines -Flavones -Tritéropénes -Anthocyanes -Comarines -Flavones -Tritéropénes
	Acétate d'éthyle	-Mauve -Vert -Rouge -Mauve -Bleu	-Flavones -Tritéropénes -Anthocyanes -Flavones -Comarines

Tableau 8 : Les métabolites secondaires des extraits identifiés par CCM (suite)

	Acétone	-Mauve -Jaune -Rose -Rose foncé -Mauve	-Flavones -Flavanones -Anthocyanes -Anthocyanes -Flavones
Système 2	Butanol	-Jaune -Marron -Marron -Orange -Mauve	-Flavanones -Téropénoïdes -Téropénoïdes -Stéroïdes -Flavones

D'après le **Tableau 08**, avec le premier système éluant, la deuxième tache de couleur mauve de l'extrait brut correspond également à celle des extraits chloroformique, d'acétate d'éthyle et d'acétone, avec une distance de migration similaire (le même Rf), suggérant la présence de flavonoïdes dans les différents extraits. Il est à noter aussi, que ces quatre extraits contiennent les mêmes composés, ce qui est confirmé par les couleurs des taches ainsi que leur distance de migration (leur Rf).

Avec le deuxième système éluant, l'extrait butanolique a subi un bon fractionnement d'où la révélation des taches de différentes couleurs telles que le jaune, le marron, et le mauve et des Rf différents. Ce résultat indique la richesse de cet extrait en composés secondaires.

La révélation de ces taches nous a permis selon Wagner *et al.*, (1996), d'identifier des anthocyanes, des flavones et des flavonones. Par ailleurs, selon **Chantal et Békro (2009)**, nous a permis d'identifier des coumarines, des flavones, des terpénoïdes et des stéroïdes.

L'ensemble des extraits montre une richesse en composés secondaires, ce qui rejoint les résultats du screening phytochimique.

II.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits testés

II.4.1 L'activité antifongique des extraits

L'activité antifongique des extraits testés est évaluée à l'égard de deux souches fongiques à savoir *Fusarium oxysporum*. Sp. *Lycopersici* et *Aspergillus brasiliensis*. La méthode utilisée consiste à imbiber les disques fongiques par chaque extrait à une concentration de 30mg/ml dans le DMSO. Le contrôle positif utilisé est le DMSO.

Après 48 heures d'incubation, l'effet positif de chaque extrait se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du disque préalablement imbibé par l'extrait. Le diamètre de cette zone varie d'un extrait à l'autre, ce qui reflète leur efficacité antifongique différente.

L'activité antifongique est évaluée par la mesure du taux d'inhibition (%) selon la formule :

$$(I)\% = (C - T) / C \times 100$$

Les résultats de la sensibilité aux extraits sont présentés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Taux d'inhibition des extraits de *Medicago sativa* vis-à-vis aux souches fongiques testés

souches	Taux d'inhibition (%)					
	Brut	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Butanol	Acétone	Hydro-méthanolique
<i>Fusarium oxysporum</i> . Sp. <i>Lycopersici</i>	0%	50%	53,33%	26,66%	46,66%	6,66%
<i>A.brasiliensis</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%

D'après les valeurs mentionnées dans le **Tableau 9**, tous les extraits testés se sont montrés inactifs vis-à-vis la moisissure *Aspergillus brasiliensis*, qui a donné une bonne croissance avec ces extraits, ce qui explique sa résistance. En revanche, les résultats obtenus montrent que la majorité des extraits ont un effet significatif contre *Fusarium oxysporum* .sp. *lycopersici* (FOL), dont le taux d'inhibition varie d'un extrait à l'autre.

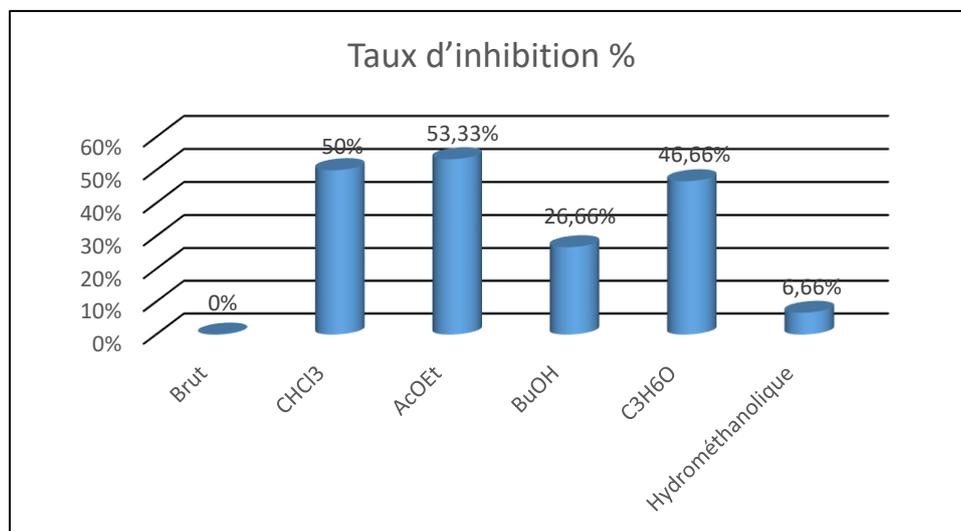


Figure 18 : Taux d'inhibition des extraits vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Les taux d'inhibition des extraits testés contre FOL sont mentionnés dans la **Figure 18**, qui explique une activité antifongique significative. Les extraits de la partie aérienne, à savoir l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait chloroformique ont donné les taux d'inhibition les plus importants avec les valeurs respectives de **53,33%** et **50%**. Ensuite, l'extrait acétone de la partie racinaire montre un taux d'inhibition de **46,66 % (Figure 19)**, suivi par l'extrait butanolique de la partie aérienne avec une faible inhibition mesurée à 26,66 %. Enfin, l'extrait hydro-méthanolique de la partie racinaire présente la plus faible activité, avec un taux d'inhibition de 6,66 %. Par contre l'extrait brut n'a montré aucune activité contre FOL, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de molécules inhibitrices des substances bioactives. En fait, les effets synergiques de la diversité des constituants majeurs et mineurs présents dans l'extrait brut doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique (Alloun, 2013).

En effet, la composition chimique de la plante étudiée *Medicago sativa*, indique sa richesse en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les saponines et les tanins. D'après la littérature, des recherches ont démontré que les saponines et les flavonoïdes isolés de *Medicago sativa*, en raison de leurs caractéristiques chimiques et physiques, possèdent un effet antimicrobien et une efficacité antifongique significative contre divers microorganismes (Rafinska *et al.*, 2016). Ces résultats corroborent l'étude **d'Anwaar *et al.* (2020)**, qui a montré que les extraits méthanolique et acétate d'éthyle de *Medicago sativa*, présentent une forte activité contre *Rhizoctonia solani*, atteignant jusqu'à 77 % d'inhibition. Ces résultats rejoignent ceux de notre étude.

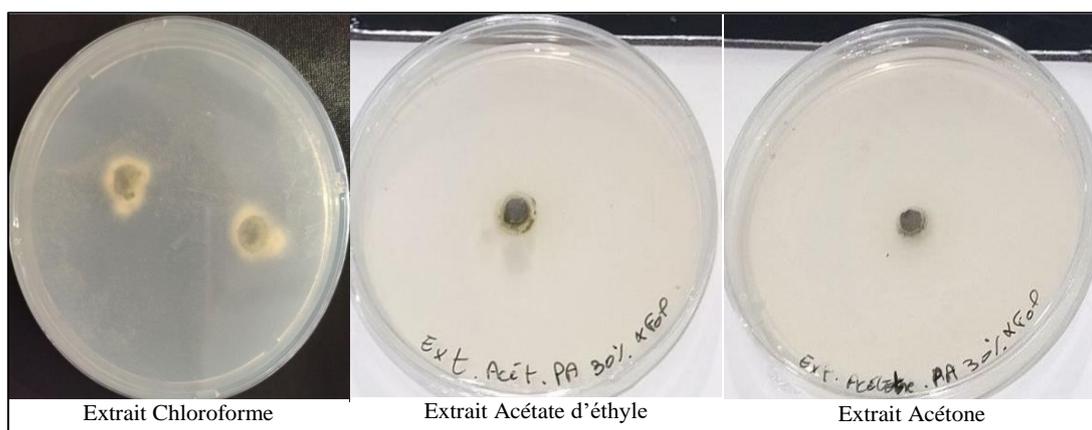


Figure 19 : Activité antifongique de Chloroforme, Acétate d'éthyle et Acétone contre *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (photo réelle)

II.4.2 L'activité antimicrobienne

II.4.2.1 Etudes qualitative des extraits analysés

L'activité antimicrobienne des extraits de la plante a été évaluée *in vitro* contre quatre souches bactériennes et une levure en utilisant deux méthodes : la méthode de diffusion sur disques et la méthode des puits sur milieu gélosé. Les extraits ont été testés à une concentration de 100 mg/ml.

Après incubation, les mesures des diamètres des zones d'inhibition autour des disques et des puits, permet de mettre en évidence l'action antimicrobienne des extraits.

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibitions des extraits testés en utilisant la méthode des puits, sont représentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits testés selon la méthode des puits

Matériel végétal	Extraits (100 mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)				
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Partie aérienne	Brut	3	7	5	-	-
	Chloroforme	4	8	5	17	2
	Acétate d'éthyle	3	12	6	14	6
	Butanol	-	-	-	-	-
Partie racinaire	Acétone	4	13	5	10	6
	Hydro-méthanolique	-	3	3	-	-
	Positif	-	-	-	-	-

(-) : Absence d'action inhibitrice

Les résultats obtenus montrent une variation dans les diamètres des zones d'inhibition en fonction des souches et des extraits testés.

Au vu des résultats résumés dans le **Tableau 10**, par rapport à la méthode des puits, on peut noter que les extraits, chloroformique et d'acétate d'éthyle de la partie aérienne, ainsi que l'extrait acétone de la partie racinaire, possèdent une activité antibactérienne remarquable contre *S. aureus* et *B. subtilis* (**Figure 20**), avec des zones d'inhibition variant entre **8 mm** et **17 mm**. Alors que, ces mêmes extraits n'ont pas d'effet contre les autres souches testées (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *C. albicans*), avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 8 mm. Les autres extraits (brut, butanolique et l'hydro-méthanolique) n'ont montré aucun effet antimicrobien contre toutes les souches testées, avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 8 mm ou une absence totale de zones d'inhibition.

Le contrôle positif (DMSO) n'a montré aucun effet inhibiteur ce qui justifie son utilisation comme solvant pour la préparation de nos extraits.

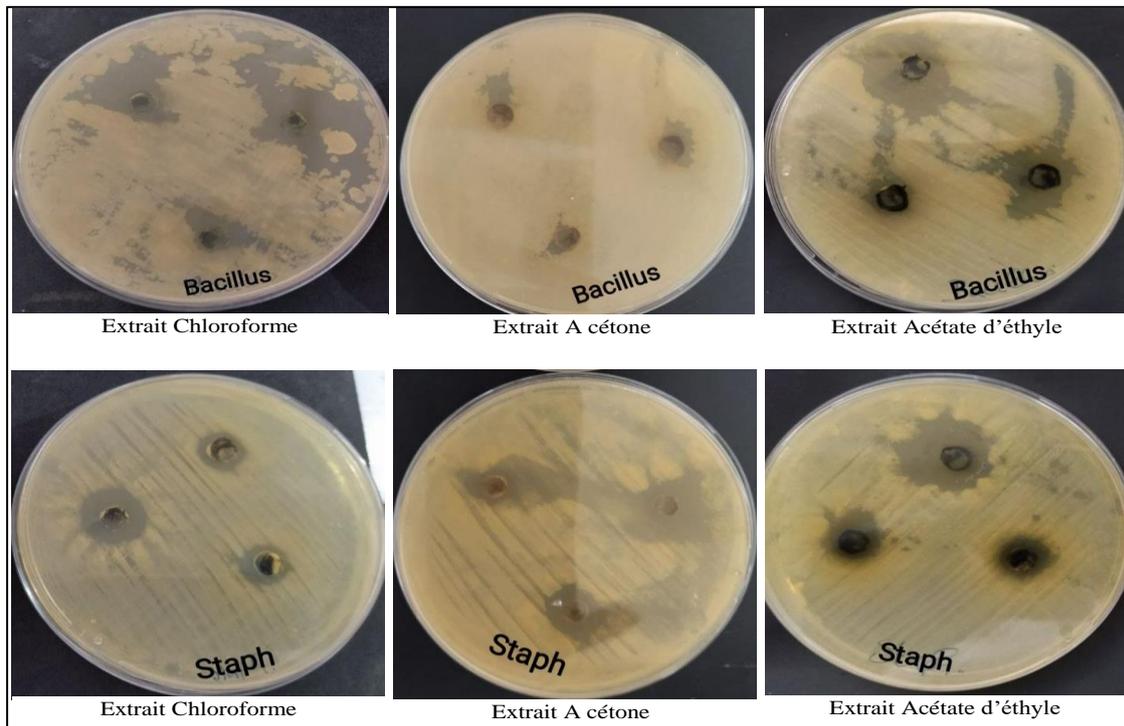


Figure 20 : Test de sensibilité de *B. subtilis* et *S. aureus* à l'Acétate d'éthyle, Chloroforme et Acétone par la méthode des puits (photo réelle)

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits testés selon la méthode des disques

Matériel végétal	Extraits (100 mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)				
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Partie aérienne	Brut	-	6	5	-	-
	Chloroforme	8	10	5	6	8
	Acétate d'éthyle	7	8	8	12	7
	Butanol	-	-	6	-	-
Partie racinaire	Acétone	6	8	5	6	7
	Hydro-méthanolique	-	4	6	-	-
	Positif	-	-	-	-	-

(-) : Absence d'action inhibitrice

En ce qui concerne la méthode de diffusion sur disques (**Tableau 11**), l'extrait chloroformique a montré une activité contre *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* (**Figure**

21), avec des zones d'inhibition de **8 mm**, **10 mm** et **8 mm**, respectivement. L'extrait Acétate d'éthyle a présenté une activité contre *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis*, avec des diamètres d'inhibition de **8 mm**, **8 mm** et **12 mm**, respectivement. Quant à l'extrait acétone de la partie racinaire, un léger pouvoir inhibiteur (8mm) est enregistré vis-à-vis *S. aureus* uniquement.

Alors que, les autres extraits (brut, butanol et hydro-méthanolique) semblent inactifs et donnent des résultats similaires à ceux obtenus par la méthode des puits.

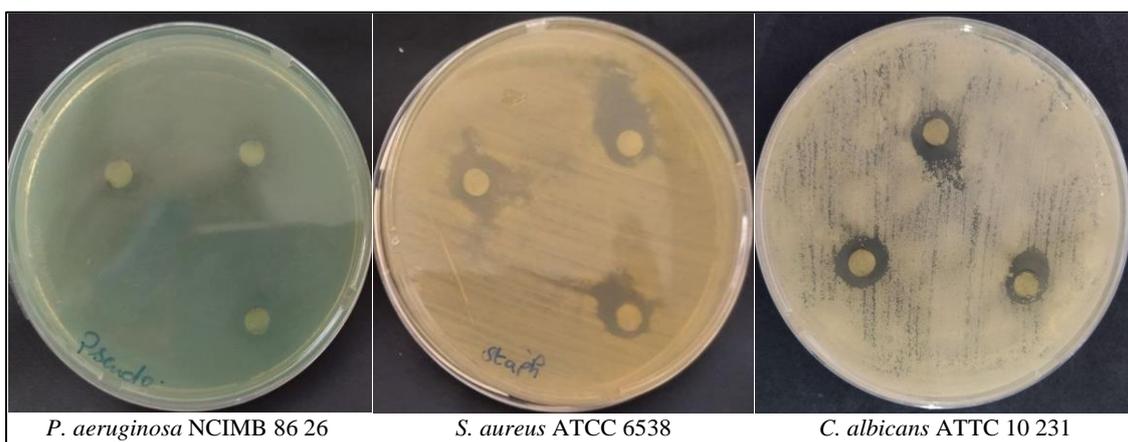


Figure 21 : Test de sensibilité des trois souches au disque de Chloroforme (photo réelle)

Ces résultats nous ont permis de déterminer l'efficacité des extraits de cette plante contre les bactéries et la levure testés. De ce fait, on constate que les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle de la partie aérienne, ainsi que l'extrait acétone de la partie racinaire, exhibent une activité significative, et que la méthode des puits semble plus fiable que la méthode des disques.

D'après les études menées par **Doss *et al.* (2011)**, les extraits de chloroforme, de méthanol et d'éthanol de *Medicago sativa* démontrent une activité antibactérienne significative contre de nombreuses bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *Proteus mirabilis*. De plus, les résultats rapportés par **EL-Desoukey (2015)** mettent en évidence un effet antifongique potentiel très marqué de l'extrait éthanolique de *Medicago sativa* sur *Candida albicans*. L'extrait d'acétate d'éthyle de *Medicago sativa* a également montré une activité antibactérienne significative contre *E. coli* d'origine urinaire (Ahmed, 2023).

En effet, les composés phytochimiques tels que les tanins, les saponines, les flavonoïdes, les alcaloïdes et d'autres composés aromatiques sont des métabolites secondaires des plantes qui servent de mécanismes de défense contre de nombreux microorganismes, (EL-Desoukey, 2015). Cette étude corrobore les conclusions de **Doss *et al.* (2011)**, qui expliquent que les saponines de *M. sativa* présentent une activité très élevée

contre une sélection de levures et de bactéries d'intérêt clinique telles que *Bacillus cereus*, *B. subtilis* et *Enterococcus faecalis*.

De plus, **EL-Desoukey (2015)** mentionne que les souches bactériennes à GRAM positif sont plus sensibles à l'activité des extraits des feuilles de *Medicago sativa* par rapport aux bactéries à GRAM négatif, probablement en raison de leurs structures de paroi cellulaire différentes.

La différence dans la structure de la paroi bactérienne joue un rôle important dans la susceptibilité des bactéries. Les bactéries GRAM négatif ont une membrane externe constituée de lipopolysaccharides (LPS) qui limite la diffusion des composés hydrophobes. De plus, le périplasme contient des enzymes capables de détruire les molécules étrangères introduites de l'extérieur, ce qui rend ces bactéries généralement moins sensibles aux extraits de plantes que les bactéries GRAM positif. Tandis que, les extrémités lipophiles des acides lipoteichoïques de la paroi des bactéries GRAM positif facilitent la pénétration des composés hydrophobes, tel que les tannins qui peuvent atteindre la membrane cytoplasmique, et perturbent ainsi, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire (Bakli, 2010).

Les résultats des études précédentes corroborent et confirment les constatations apportées par la présente étude.

II.4.2.2 Etude quantitative des extraits analysés

a) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits s'est montrés actifs selon les tests effectués sur milieu gélosé, ayant donnés des zones d'inhibition de diamètre supérieur ou égal à 8 mm.

Les CMI ont été évaluées pour mieux caractériser l'activité antimicrobienne des extraits, ce qui permet d'étudier leur dépendance vis-à-vis de la dose.

Selon **Sartoratto et al., (2004)**, une forte activité antimicrobienne s'exprime par des valeurs de CMI comprises entre 0,05 et 0,50 mg/ml, des valeurs de CMI comprises entre 0,6 et 1,50 mg/ml signifie une activité modérée. Des valeurs de CMI supérieures à 1,50 mg/ml correspondent à une faible activité antimicrobienne.

La détermination de la CMI a été faite en triplicata. Après incubation des plaques de microtitration à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 30°C pendant 48 heures pour la levure. 20 µl de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 0,5 % ont été ajouté à chaque puits. Ce réactif est un indicateur de la croissance cellulaire, les cellules vivantes réagissent avec le TTC et virent au rose-rouge, tandis que les cellules mortes demeurent incolores (figure 22).

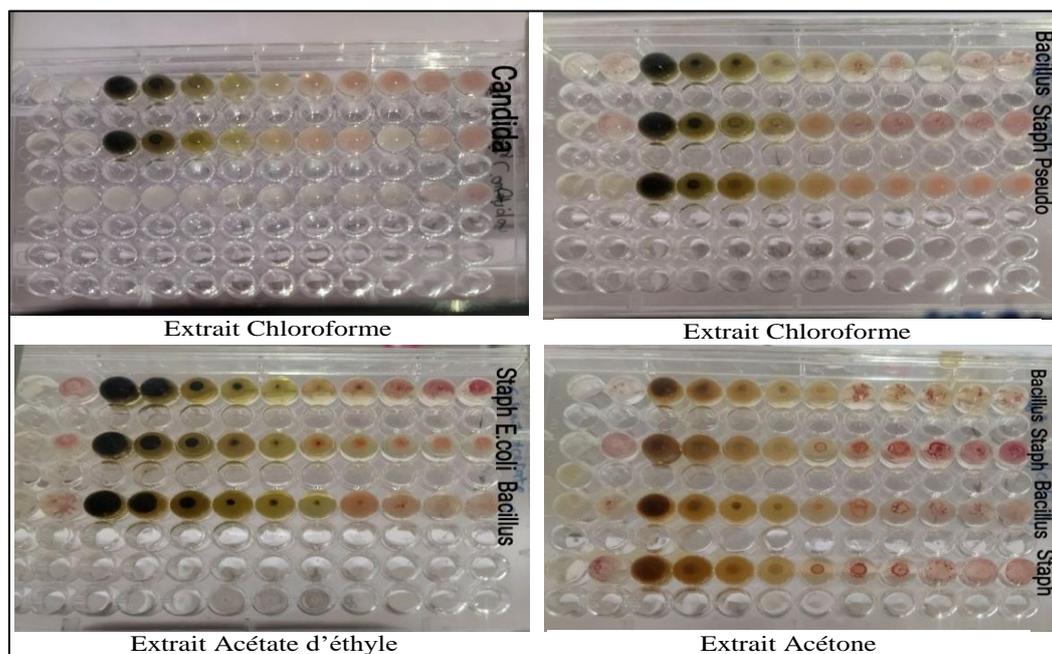


Figure 22 : Détermination de la CMI sur des microplaques (photo réelle)

Les valeurs des CMI des extraits analysés vis-à-vis les bactéries et la levure testées sont représentées dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits étudiés

		souches	Concentration CMI (mg/ml)				
			<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Extraits							
Partie aérienne	Chloroforme	25 mg/ml	12,5 mg/ml	/	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml	
	Acétate d'éthyle	/	3,125 mg/ml	6,25 mg/ml	6,25 mg/ml	/	
Partie racinaire	Acétone	/	12,5 mg/ml	/	12,5 mg/ml	/	

/ : Non déterminé

Les trois extraits (chloroforme et acétate d'éthyle de la partie aérienne et acétone de la partie racinaire) de la plante *Medicago sativa* montrent un pouvoir antimicrobien limité voir faible pour toutes les souches testés (des valeurs de CMI supérieur à 1,5 mg / ml).

D'après les résultats du **Tableau 12**, l'extrait chloroformique de la partie aérienne montre une CMI de 25 mg/ml et **6,25 mg/ml** respectivement contre *P. aeruginosa* et *C. albicans*. L'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne montre une CMI de **6,25 mg / ml** contre *E. coli*.

L'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne montre la plus forte activité contre *S. aureus*, avec une CMI de **3,125 mg/ml**, et également contre *B. subtilis* avec une CMI de **6,25 mg/ml**. L'extrait chloroformique et l'extrait acétone montrent une CMI de 12,5 mg/ml contre *S. aureus* et *B. subtilis*.

Selon **Ahmed et al. (2023)**, la CMI d'une fraction d'acétate d'éthyle de *Medicago sativa* qui inhibe la croissance de *E. coli* était de 30 mg/ml, ce qui est largement supérieur à nos résultats. L'étude de **Joy et George (2014)**, montre que la CMI des extraits de graines de *Medicago sativa* est de 1,2 mg/ml pour *P. aeruginosa*, et de 2,695 mg/ml pour *E. coli* et *S. aureus*. Ces extraits de graines semblent plus actifs que les extraits des parties aériennes et racinaires de cette plante. Cette différence entre nos résultats et ceux de l'étude précédente peut s'expliquer par la variation de la partie de la plante étudiée ainsi que les méthodes d'extraction.

L'activité antibactérienne des substances naturelles des extraits des plantes médicinales, est évaluée par des méthodes qualitatives de diffusion sur disque ou bien dans des puits et par des méthodes quantitatives par la mesure des CMI. La méthode des disques ou des puits est basée sur l'utilisation des disques ou la perforation des puits dans la gélose, comme réservoirs contenant la solution des substances à tester. Dans le cas des solutions avec une basse activité, une grande concentration ou volume est nécessaire ; néanmoins la capacité des disques est limitée. C'est pourquoi certains extraits donnent des zones d'inhibition incomplètes qui peuvent être attribuées à une résistance par déficience de dose d'extrait (Bakli, 2010). La CMI est une méthode quantitative basée sur le contact direct d'un microorganisme à une série de dilutions de la substance testée. Elle est couramment utilisée comme un critère admis pour la mesure de la susceptibilité des microorganismes aux inhibiteurs (Bakli, 2010)). La taille de l'inoculum est considérée comme étant la variable la plus importante dans les tests de sensibilité (Bakli, 2010). Cette concentration est ajustée à 10⁸UFC/ml, et ceci pour éviter d'éventuelles ambiguïtés dans l'interprétation des résultats,

car avec cette charge aucune zone d'inhibition n'a été observée avec le solvant utilisé (DMSO).

b) Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

Le dénombrement des colonies des souches testées a été effectué après 24 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur de colonies (**Figures 23 et 24**). La CMB est la plus faible concentration en extrait pour laquelle on obtient 0,01 % de bactéries survivantes de l'inoculum de départ (soit au maximum 2 ou 3 colonies par boîte de Pétri).

Une fois la CMB est déterminée, on peut calculer le rapport CMB/CMI.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'un extrait :

Si le rapport CMB/CMI est ≤ 4 , la substance testée est considérée comme bactéricide.

Si le rapport CMB/CMI est > 4 , la substance testée est considérée comme bactériostatique.

(Okou *et al.*, 2019).

Nos résultats montrent que la CMB est de 50 mg/ml de l'extrait Chloroforme pour *C. albicans* et de 100 mg/ml de l'extrait Acétate d'éthyle pour *S. aureus*, (**Figure 23**). Les boîtes contenant les autres souches testées par les autres extraits n'ont pas permis de déterminer la CMB.

Le rapport CMB/CMI est de 8 pour *C. albicans* avec l'extrait Chloroforme et de 32 pour *S. aureus* avec l'extrait Acétate d'éthyle. Ces résultats indiquent que les extraits chloroforme et Acétate d'éthyle ont un effet bactériostatiques.

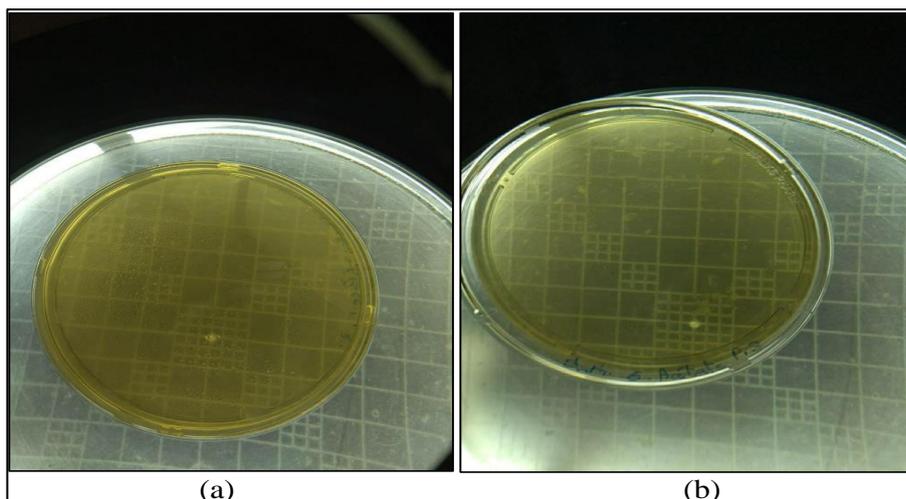


Figure 23 : La CMB de l'extrait Chloroforme sur *C. albicans* (a) et de l'extrait acétate d'éthyle contre *S. aureus* (b) (photo réelle)

Par ailleurs, l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs. Aussi, il faut rappeler que *Medicago sativa* contient des flavonoïdes, des saponines, des glycosides, des alcaloïdes et des tanins. Ces composés ayant des propriétés antibactériennes connues, leur présence pourrait donc expliquer les propriétés antimicrobiennes observées (Scalbert, 1991). Les rapports CMB/CMI, pour la majorité des souches, étaient supérieurs à quatre. Il ressort donc de notre analyse que les extraits étudiés ont un pouvoir bactériostatique sur les souches *Candida albicans* et *S. aureus*. Ces travaux montrent donc que l'utilisation de cette plante comme anti infectieux en milieux traditionnels est justifiée ; il suffit d'optimiser les conditions d'extraction pour améliorer le pouvoir antimicrobien des extraits obtenus.

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'investigation pharmacologique des plantes médicinales traditionnelles reste importante pour offrir des bases scientifiques pour l'usage traditionnel des plantes et fournir à la société de nouvelles sources de médicaments sains et efficaces. L'objectif visé par ce travail est l'évaluation qualitative et quantitative des extraits de la partie aérienne et racinaire de la plante *Medicago sativa*, à activité antimicrobienne.

Les rendements des extractions effectuées montrent les meilleures valeurs avec les solvants polaires (25,57% et 1,11% pour l'extrait hydrométhanolique et butanolique, respectivement de la partie aérienne, et 12,56% pour l'extrait hydrométhanolique de la partie racinaire) par rapport aux solvants apolaires (0,02%, 0,06% et 0,23% pour l'extrait éther de pétrole, le chloroforme et l'acétate d'éthyle, respectivement de la partie aérienne, et 2,25% pour l'extrait acétone de la partie racinaire).

L'étude phytochimique et le fractionnement par CCM de cette plante démontrent sa richesse en plusieurs principes actifs tels que : les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les saponines.

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits testés a été évaluée par méthode qualitative (les tests de diffusion sur disques et les puits) et par une étude quantitative par le biais de la détermination des CMI et CMB vis-à-vis trois souches fongiques et quatre bactéries. De l'étude qualitative découle les points suivants : Les extraits de CHCl_3 , d'AcOEt et de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ont montré une activité antibactérienne puissante contre les souches testées, en particulier les bactéries à Gram positif, avec des diamètres d'inhibition compris entre 8 et 17 mm. De plus, le meilleur taux d'inhibition (53,33%) a été enregistré avec l'extrait acétate d'éthyle contre *Fusarium oxysporum*.

La mise en évidence de la résistance des souches microbiennes testées à travers la détermination des CMI qui ont donné des valeurs supérieures à 1,5 mg/ml.

Les valeurs des CMB ont été enregistrées que pour les extraits : chloroformique et acétate d'éthyle.

Les rapports CMB/CMI supérieurs à 4 révèlent que les extraits étudiés semblent exercer une action bactériostatique contre *S. aureus* et *C. albicans*.

En fin ces résultats restent préliminaires et ce travail ouvre de nombreuses perspectives :

- Tester d'autres méthodes d'extraction et leur influence sur la composition chimique et les capacités biologiques.

- Améliorer l'identification, tant quantitative que qualitative, des différents métabolites secondaires présents dans chaque extrait de *Medicago sativa* afin d'identifier les molécules bioactives.
- Poursuivre les recherches sur les activités antimicrobiennes vis-à-vis d'autres espèces microbiennes résistantes pour déterminer leur spectre d'action.
- Évaluer d'autres activités de cette espèce, telles que ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires ou anti-enzymatiques, afin de confirmer ou d'infirmer les activités biologiques qui lui sont attribuées.
- Compléter l'activité antimicrobienne par d'autres tests pour confirmer les résultats obtenus.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahmed A G., Atrakji M Q Y M A. and Alwattar W M A. (2023). Antibacterial effect of ethyl acetate fraction of *Medicago Sativa* on *Escherichia Coli* in urinary tract infections. *Biomedicine*, 43(2), p :655–659
- Alloun K. (2013). Compositipn chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et l’aneth (*Anethum graveolens L.*), de la sauge (*Salvia officinalis L.*) et de la rue des montagnes (*Ruta montana L.*). Thèse de Magister Recherche : Alimentation et Nutrition. Ecole nationale supérieure agronomique EL-Harrach- Alger., 119 p.
- Al-Snafi A., Hanaa S., Khadem., Hussein H A., Alqahtani A., Batiha G. and Jafari Sales A. (2021). A review on *Medicago sativa*: A potential medicinal plant. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive*, 1(2), p : 22–033
- Amawi H., Ashby C R., Samuel T., Peraman R. and Tiwari A K. (2017). Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway. *Nutrients*, 9 (911), P : 1-23
- Andriamasinoro N A. (2018). Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques. Thèse de Doctorat : pharmacognosie, Université Bourgogne Franche-Comté, 176 p.
- Anwaar A., Jabeen K., Iqbal S. and Javad S. (2021). Antifungal efficacy of phytoconstituents of *Medicago sativa* against *Rhizoctonia solani*. *Phytoprotection*, 101 (1), p : 1–5
- Avato P., Bucci R., Tava A., Vitali C., Rosato A., Bialy Z. and Jurzysta M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago sp* : structure-activity relationship. *Phytother Res* 20 (6), p : 454–457
- Bakli S. (2010). Activité antibactérienne des fractions chromatographiques des extraits phénoliques de *Pistacia lentiscus*. Mémoire de Magister Recherche : Biologie Physico-chimique. Université Abderahmane Mira Béjaia. 127 p.
- Bammou M., Daoudi A., Slimani I., Najem M., Bouiamrine E H., Ibijbjen J. et Nassiri L. (2015). Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus L.*»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences*, 86, p : 7966–797
- Barchan A., Bakkali A., Arakrak A. et Laglaoui A. (2015). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytotherapie*, p : 1-12

- Basavaraju M et Gunashree B S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics dans : Marjanca Starčić Erjavec. *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen. p. 1–21.
- Berman J. (2012). *Candida albicans*. *Current Biology*, 22 (16), p : 1-3
- Bora K. and Sharma A. (2010). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2) , p : 211–220
- Boubekri K. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat Recherche : Chimie. Université Mohamed Khider Biskra., 176.
- Boutaghane N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina Spach* (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae).Thèse de Doctorat : Pharmaco-chimie. Université de Constantine1., 271.
- Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J. et Dakka N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytotherapie*, p : 1-12
- Bulletin agricole de l'Algérie et de la Tunisie, 1902 [en ligne]. (Page consultée le 27/04/2024). <https://books.google.dz/books?id=MSwjAQAAIAAJ>
- Bussmann R W., Paniagua Zambrana N Y., Romero C. and Hart R E. (2018). Astonishing diversity the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. *Journal of Ethnobiology Ethnomedicine*, 14 (1), p : 1–47
- Caunii A., Pribac G., Grozea I., Gaitin D. and Samfira I. (2012). Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemistry Central Journal*, 6(1), p : 1–8
- Chantal N K C., Bekro Y A., Janat Akhanovna M B., Anoubilé B. and Stéphane G B. (2009). On the composition in secondary metabolites and the antioxidant activity of crude extracts from *Gmelina Arborea roxb.* (Verbanaceae) from Côte d'Ivoire, West Africa: Analysis by thin layer chromatography. *European Journal of Scientific Research*, 36, p : 161–171
- Chegini H., Oshaghi M., Boshagh M A., Foroutan P. and Jahangiri A H., (2018). Antibacterial effect of *Medicago sativa* extract on the common bacterial in sinusitis infection. *International Journal of Biomedicine and Public Health*, 1(1), p : 1–5

- Collin S., Counet C., Callemien D. et Jerkovic V. (2011). Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols dans : Collin S., Crouzet J. Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Lavoisier, P : 5 –27.
- Crozier A., Jaganath B. and Clifford M. (2006). Phenols, Polyphenols and tannins : An overview dans : Crozier A., Clifford M. and Ashihara H. Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet. Wiley-Blackwell. p : 1-25.
- Cutrim C et Cortez M. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71, p : 1–15
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology - Plant biotechnology*, 23(2), p : 174–181
- Dai J. and Mumper R J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), p : 7313–7352
- Dieye P I., Ndiaye S., Dione F., Diop A., Dieng A., Ndiaye B., Diop A., Diop Y M. et Sarr S. (2022). Étude corrélée de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de *Jatropha chevalieri* et de *Cordyalla pinnata*, et de leurs profils chromatographiques. *Journal of Applied Biosciences*, 158, p : 16396 –16410
- Do Q D., Angkawijaya A E., Tran-Nguyen P L., Huynh L H., Soetaredjo F E., Ismadji S. and Ju Y H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), P : 296–302
- Do T KT. (2016). Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels. Thèse de Doctorat Recherche : chimie. Université Nice- Sophia Antipolis., 183.
- Doré C. et Varoquaux F. (2006). La luzerne dans Doré C. et Varoquaux F. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae. France. p : 397-408.
- Doss A., Parivuguna V., Surendran M V. and Surendran S. (2011). Antibacterial evaluation and phytochemical analysis of *Medicago sativa* L. against some microbial pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(5), p : 550–552

- Diara N., Maazi MC. et Chefrour A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, p : 276-290
- Driscoll J A., Brody S L. and Kollef M H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), p : 351–368
- Eldesoukey R. (2015). Phytochemical and antimicrobial activity of *Medicago sativa* (alfalfa) as source of animal food against some animal pathogens. *Global Veterinaria*, 14(1), p : 136–141.
- Esseh K., Afanyibo Y G., Ahama Esseh K Y S., Idoh K., Koudouvo K., Agbonon A. et Gbeassor M. (2019). Screening phytochimique, Étude toxicologique, Évaluation des activités antiplasmodiale et antiradicalaire de la Tige Feuillée de *Senna occidentalis* Linn (Fabaceae). *European Scientific Journal*, 15(6), p : 411–433
- Faurie B. (2014). Les sucres et l'astringence : effet des polysaccharides présents dans le vin sur les interactions tanins-protéines. Thèse de doctorat Recherche : Chimie-Physique. Université de Bordeaux., 199 p
- Feknous S., Saidi F. et Said M R. (2014). Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature & technology. A Sciences fondamentales et Engineering*, 6 (11), p : 07–13
- Gagnon G B. (2006). Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de maîtrise Recherche : Chimie. Université du Québec., 66 p.
- Ghani A. and Ahmad S. (2019). Determination and Identification of phytochemical properties of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) leaf, stem and root extracts against various pathogens. *Pakistan Journal of Phytopathology*. 31(01), P : 97–103
- Ghedadba N., Hambaba L., Mohamed Cherif A., Mokhtar S., N.Fercha. et Bousselsela H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2 (2), p : 64–74
- Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy*, 3 (4), p :162–169
- Gonte C. (2016). Dosage de Tanins condensés libres dans les aliments [en ligne]. (Page consultée le 15/05/2024). <https://hal.inrae.fr/hal-02961619/document> (PDF)
- González-León Y., Ortega-Bernal J., Anducho-Reyes M A. and Mercado-Flores Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25. p : 1–14

- Gugnani C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli. *Frontiers in Bioscience*, 8, p : 346-357
- Gulzar M. and Zehra A. (2018). *Staphylococcus aureus* : A brief review. *International Journal of Veterinary Science and Research*, 4 (1), p : 20-22
- Gunn C R., Skrdla W H. and Spencer H C. (1978). Classification of *Medicago Sativa L.* Using Legume Characters and Flower Colors. Etats Unis : Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 84 p.
- Gupta P D. and Birdi T J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8 (4), p : 266–275
- Heinrichs D H. (1969). La luzerne au Canada. Canada : Agriculture and Agri-Food Canada - Agriculture et Agroalimentaire. 32 p.
- Hennekinne J A. (2009). Nouvelles approches pour la caractérisation des toxico-infections alimentaires à *Staphylocoques* à coagulase positive. Thèse de Doctorat : L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, 183.
- Herbier en image. *Medicago sativa* subsp. *sativa* L- la Luzerne commune (consulté le 25/04/2024).
 Disponible à partir de :
https://www.herbierimages.be/index_fichiers/planches/index_fichiers/medicago_sativa_ssp_sativa.html
- Hlaiem S., Della Rocca G., Barberini S., Danti. and Ben Jamâa ML. (2021). Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Olea europaea* var. *sylvestris* decline phenomenon in Tunisia. *Plant Pathology & quarantine*, 11 (1), p : 15–22.
- Houta O., Chouaeb H., Neffati M. et Amri H. (2012). Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un *Crithmum maritimum* cultivé en Tunisie. *Journal de la Société chimique de Tunisie*, 14. p : 77–82
- Jaber A. (2017). Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications. Thèse de doctorat : Chimie Analytique. Angers, 257 p.
- Jan H., Hussain W., Kunwar R., Bussmann R. et Zambrana N. (2021). *Medicago sativa* L. Fabaceae dans : Hassan Sher, Rainer W. Bussmann, Ripu M. Kunwar. Ethnobotany of the Himalayas. Springer International Publishing., P : 1257–1263.

- Joy G. and George P. (2014). Antimicrobial screening of Alfalfa (*Medicago sativa*) in various bacterial strains. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 2(1), p: 65-69
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda : Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat : Écologie et chimie des substances naturelles. Paris., 348p.
- Majhenic L., Kerget M. and Knez Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104 (3), p : 1258–1268
- Manase M.J. (2013). Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae. Thèse de doctorat : Biologie végétale. Bourgogne., 222p.
- Manikandan R., Harish S., Gandhi K. and Thiruvengadam R. (2018). Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. *Frontiers in Microbiology*, 9, p: 1-13
- Marouf A. et Tremblin G. (2009). Cellules végétales et cellules animales dans : Marouf A. et Tremblin G. Abrégé de biochimie appliquée. EDP Sciences. France. p : 358
- Mauriès M. (2003). La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. Paris : Agricole Editions. 235 p.
- McMahon L R., McAllister T A., Berg B P., Majak W., Acharya S N., Popp J D., Coulman B E., Wang Y. and Cheng K J. (2000). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci*, 80, p : 469–485
- Mouellet M A. (2004). Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L (Papilionaceae) et *hallea ciliata* Aubrev et Pellegr. (Rubiaceae) récoltes au Gabon. Thèse de doctorat Recherche : Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Bamako., 88p.
- Michel-Briand Y. and Baysse C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84, p: 499–510
- Michaud R., Lehman WF. And Rumbaugh MD. (1988). Word distribution and historical development dans : Hanson AA., Barnes DK. And Hill R. Alfafa and alfafa improvement. Amer Society of Agronomy. P : 25-91.
- Mielmann A. (2013). The utilisation of Lucerne (*Medicago sativa*): a review. *British Food Journal*, 115, p: 590–600

- Munier R.L. (1968). La chromatographie sur couche mince: Principes et possibilités. *Plant Food Hum Nutr*, 16, p: 12–34
- Najjaa H., Zouari S., Arnault I., Auger J., Ammar E. et Neffati M. (2011). Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Botanica Gallica*, 158, p : 111-123
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D. et Aké-Assi L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6 (1), p: 1-15
- Nielsen H., Stenderup J. and Bruun B. (1990). Fungemia with Saccharomycetaceae: Report of four Cases and Review of the Literature. *Scand J Infect Dis*, 22, p : 581-584
- Nimaan M. (2021). Pharmacological properties of *Medicago sativa* (Alfafa). ISBN, p : 1-6
- Okou O., Yapo S., Clément K., Komenan N., Monthaut S., Kra A. et Djaman A. (2019). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de fruits de *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) sur la croissance in vitro de sept (07) souches d'entérobactéries de différents profils (résistantes ou sensibles). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13 (3), p: 1510-1526
- Palleroni N.J. (2015). Pseudomonas, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.
- Pandey K.B. and Rizvi S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), p: 270–278
- Penchev P.I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions (phdthesis). Thèse de doctorat : Génie des Procédés et de l'Environnement. Toulouse., 240 p.
- Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. and Roura, S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36, p: 679–684
- Prabhu S., Molath A., Choksi H., Kumar S. and Mehra R. (2021). Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *International Journal of Physiology, Nutrition and Physical Education*, 6, p: 293-301
- Raezadeh M., Beheshtipour J., Jamali R. and Akbari A. (2022). The antioxidant properties of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and its biochemical, antioxidant, anti-Inflammatory, and

- pathological effects on nicotine-induced oxidative stress in the rat liver. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, p :1-13.
- Rafińska K., Pomastowski P., Wrona O., Górecki R. and Buszewski B. (2017). *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters*, 20, p : 1-20
- Roy A., Khan A., Ahmad I., Alghamdi S., Rajab B S., Babalghth A O., Alshahrani M Y., Islam S. and Islam M R. (2022). Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International*, 2022, p : 1-9
- Sartoratto A., Lúcia M., Delarmelina C., Figueira M., Duarte T. and Rehder G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, p : 275-280
- Scalbert A., (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 (12), p : 3875-3883
- Simões M F., Santos C. and Lima N. (2013). Structural diversity of *Aspergillus* (section *nigri*) spores. *Microscopy and Microanalysis*, 19, p : 1151-1158
- Srinivas C., Nirmala Devi D., Narasimha Murthy K., Mohan C D., Lakshmeesha T R., Singh B., Kalagatur N K., Niranjana S R., Hashem A., Alqarawi A A., Tabassum B., Abd Allah E F. and Chandra Nayaka S. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato : Biology to diversity- A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (7), p : 1315-1324
- Summers C G. and Putnam D H. (2008). Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones. California : UCANR Publications. 372 p. [en ligne]. (page consultée le 24/04/2024). <https://books.google.dz/books?id=OteXnAAzWRgC>
- Toty A A., Guessennd N., Bahi C., Mathieu KRA A K., Albert Tokore D. et Dosso M. (2013). Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royal des Sciences de Liège*, 82, P : 12–21
- Traore Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I. et Coulibaly A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis Pers.* (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences*, 58, p : 4234-5902
- Vahidipour H., Cheniany M., Ganjeali A L M. et Matin M. (2024). The Correlation of Some Secondary Metabolites of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) with Plant Organ and Harvest Time.

- Varga J., Kocsubé S., Tóth B., Frisvad J C., Perrone G., Susca A., Meijer M. and Samson R A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, p : 1925-1932
- Vigor C, Vercauteren J, Montels J. (2011). Les substances naturels dans la chaîne du médicament, 48, 29-30
- Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E L., Lorito M. and Sivasithamparam K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Journal compilation, Letters in Applied Microbiology*, 43, p : 143-148
- Wagner H. and Blatt S. (1996). Plant drug analysis : Thin layer chromatography atlas. Germany : Spinger. 368 p.
- Wichtl M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques. Paris : Lavoisier. 700 p.
- Zahir I., Houari A., Iraqui M. et Saad I. (2018). Valorisation de l'activité antibactérienne des microorganismes isolés à partir des biotopes marocains et caractérisation partielle de leurs principes actifs. *Proceeding BIOSUN*, 1, p : 1-16
- Zambrana N., Bussmann R. and Romero C. (2020). *Medicago sativa* L. Fabaceae dans : Ethnobotany of the Andes. Spinger reference. p : 1991-1996.

Annexe

La composition des milieux de culture

Milieu PDA

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée

Extrait de pomme de terre..... 4,00g

Glucose.....20,00g

Agar..... 15,00g

pH final : 5,6 ± 0,2

Température de stérilisation : 121 °C pendant 20 min

Bouillon Mueller Hinton

Ingrédients en grammes pour un 500 ml d'eau distillée

Extrait de viande.....1g

Caséine.....8,75g

Amidon.....0,75g

Température de stérilisation : 121 °C pendant 20 min

Bouillon nutritif

Ingrédients en grammes pour un 250 ml d'eau distillée

Bouillon déshydraté.....2g

Température de stérilisation : 121 °C pendant 20 min

Réactif de DRAGENDORFF

Solution concentrée (test "alcaloïdes")

Sous nitrate basique de bismuth.....0,85g

Iodure potassium.....8g

Acide acétique glacial.....10ml

Eau distillée.....70ml

Chauffer et filtrer sur verre fritté, si nécessaire

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : BENGUESMIA Imene Boutheina

CHELLOUF Ikram

Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aériens et racinaires de la plante *Medicago sativa*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source précieuse de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires. La présente étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules naturelles à partir d'une plante de la région de Constantine. Il s'agit de la plante *Medicago sativa* appartenant à la famille des Fabaceae, largement utilisé en médecine traditionnelle. Le screening phytochimique et le fractionnement par CCM révèlent la présence de substances bioactives, à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les saponines et les tanins. L'activité antimicrobienne a été estimée par une étude qualitative (diffusion sur disques et les puits) et les résultats obtenus ont été confirmés par une étude quantitative en déterminant les CMI et les CMB des extraits étudiés vis-à-vis trois souches fongiques (*Aspergillus brasiliensis*, *Fusarium oxysporum* et *Candida albicans*) et quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*). Les extraits de CHCl₃, d'AcOEt et de C₃H₆O ont montré une activité antibactérienne puissante contre les souches testées, en particulier les bactéries à Gram positif, avec des diamètres d'inhibition compris entre 8 et 17 mm à une concentration de 100 mg/ml. De plus, le meilleur taux d'inhibition (53,33%) a été enregistré avec l'extrait acétate d'éthyle contre *Fusarium oxysporum*. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont montré un large éventail de valeurs (jusqu'à 12,5 mg/ml) en comparaison avec les zones d'inhibition (17 mm). Cette étude permet de justifier les vertus antimicrobiennes accordées à cette plante.

Mots-clefs : *Medicago sativa*, métabolite secondaire, activité antibactérienne, activité antifongique, CMI, CMB.

Laboratoires de recherche : laboratoire de LOST (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : Dr LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MC(A) - E N S de Constantine).

Encadrant : Dr LEGHLIMI Hind (MC(A) - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s) : Dr DJAMAA Ouahiba (MC(B) - U Constantine 1 Frères Mentouri).

