République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi-Tebessa

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie appliquée

N° d'ordre :……
N° de série :……

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Sciences biologiques
Option : Toxicologie

Thème :

Etude *in vitro* des activités antioxydant, antimicrobienne et antidiabétique des extraits de la plante *M.sativa* L.

Présenté et soutenu par : Assma OUNNAS
Loubna SAOUD

Devant le jury composé de :

Président : Mme . Hayette BOUABIDA	**Pr**	**Université Larbi Tebessi-Tebessa**
Promotrice : Mme. Nadia DJERMANE	**MCA**	**Université Larbi Tebessi-Tebessa**
Examinateur : Mme. Chahinez TAIB	**MCB**	**Université Larbi Tebessi-Tebessa**

Année universitaire : 2024/ 2025


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciement:

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout-puissant pour nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice de mémoire, Madame DJERMANE Nadia, Maître de Conférences classe B à l'Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi, pour avoir accepté de nous encadrer tout au long de ce travail et pour ses précieux conseils, son accompagnement et sa disponibilité.

Nos vifs remerciement pour les membres du jury d'avoir accepté de juger etd'évaluer Notre rmémoire

Nous remercions également l'ensemble des enseignants et intervenants de[Université de Larbi Tebessi –Tebessa-Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie Département de BiologieAppliquée], dont les enseignements et le soutien ont été essentiels tout au long de notre parcours.

Nos sincères remerciements s'adressent aussi à nos familles et nos proches pour leur soutien moral, leur compréhension et leurs encouragements constants tout au long de cette expérience.

Dédicace:

Je dédie ce mémoire à ma chère famille,
à mes parents, pour leur amour inconditionnel, et leurs encouragements constants.
Vous êtes ma source de force et d'inspiration.

À toi, ma chère mère,Ce mémoire est avant tout pour toi.Pour ton amour inconditionnel, et ta patience infinie, .Qu'allah, le Tout-Puissant, accorde une guérison complète et rapide à toi. Qu'Il renforce ton corps, et lui rends-la force.

À toi, mon père,Ce mémoire t'est dédié, avec tout l'amour, et le respecque j'éprouve pour toi.Merci d'avoir été, tout au long de ma vie, un modèle de courage.

À mes frères et sœurs, pour leurs mots d'encouragement, leurs petites attentions et leur humour qui m'ont souvent aidé à relâcher la pression dans les moments les plus intenses.

À mes nièces adorées,

Je vous dédie ce travail, en espérant qu'il devienne pour vous un repère, une preuve que les rêves peuvent se réaliser lorsqu'on y croit vraiment.Puissiez-vous toujours avancer vers votre propre réussite.

SAOUD Loubna

Dédicace:

À mon enseignant et premier guide… À l'emblème de la sagesse et de l'orientation dans ma vie… À l'aimé dont le nom est toujours prononcé avec fierté, … C'est avec fierté que je dis : je suis la fille de cet homme.

Mon père

À celle qui a semé en moi l'amour du savoir… À celle qui a enduré fatigue et patience pour moi…

Ma mère , source de mon repos, ma force, mon refuge et mon inspiration… Printemps et vie, que Dieu te garde.

À ceux qui ne m'ont jamais abandonnée… À ceux qui ont soutenu mes pas et m'ont encouragée depuis le début de ce parcours…

À ceux dont les conseils m'ont éclairée…

Mes frères et sœurs (Idriss,Aya, Mounia,Ikram, Med El Hedi).

À ceux dont l'amitié est sincère… À ceux qui ont partagé mon chemin avec loyauté… À tous les étudiants qui aspirent au savoir…

Je vous dédie humblement cet effort.

OUANNAS Assma

الملخص

تُعنى هذه الدراسة بتسليط الضوء على قيمة النباتات الطبية من خلال دراسة نبات *مديكاجو ساتيفا*، وهو نبات من البقوليات معروف بغناه بالمركبات الثانوية الفعالة حيوياً. الهدف الرئيسي هو تقييم الخصائص الدوائية لمستخلصات هذا النبات، لا سيما نشاطاتها المضادة للميكروبات، والمضادة للأكسدة، والمضادة للسكري.

أُجريت الدراسة التجريبية على الأجزاء الهوائية من *ميديكاجو ساتيفا*، والتي تم جمعها من منطقة أم البواقي (الجزائر). تم استخراج المركبات بواسطة النقع في مذيبات ذات قطبية متزايدة: كلوروفورم، أسيتات الإيثيل، -n بيوتانول، والميثانول بنسبة 70%. ثم خضعت المستخلصات الناتجة لسلسلة من التحاليل البيولوجية.

أظهرت النتائج نشاطًا مضادًا للميكروبات متوسطًا، كان أكثر وضوحًا في المستخلص الميثانولي (EMeOH) ضد كل من *إشريكية قولونية*، *السلمونيلا إنتيريكا*، و*باسيلس سوبتيلس* .كما لوحظ النشاط المضاد للفطريات الأكثر أهمية مع نفس المستخلص ضد *فيوزاريوم أوكسيسبوروم* بنسبة تثبيط بلغت 47.36%. أما فيما يخص النشاط المضاد للأكسدة، فقد أظهرت اختبارات DPPH و ABTSأن مستخلص أسيتات الإيثيل (EAcE) يتمتع بأفضل قدرة على مكافحة الجذور الحرة، حيث كانت قيمة IC_{50} له 227.57 ± 15.72 ميكروغرام/مل لاختبار DPPH و59.17 ± 8.47 ميكروغرام/مل لاختبار.ABTS

كما أظهر المستخلص البيوتانولي (EBuOH) قدرة مضادة للأكسدة ملحوظة، في حين كانت نشاطات المستخلصات الميثانولية والكلوروفورمية أضعف. أما تقييم النشاط المضاد للسكري، والذي استند إلى تثبيط إنزيم-α أميلاز، فقد أظهر أن مستخلص أسيتات الإيثيل (EAcE) يتميز بقيمة IC_{50} تساوي 12.19 ± 2.28 ميكروغرام/مل، وهي قيمة مقاربة لتلك الخاصة بالأكاربوز (المعيار السريري). كما قدم المستخلصان الكلوروفورمي والبيوتانولي تثبيطًا جيدًا، بينما كان المستخلص الميثانولي أقل نشاطًا.

تؤكد هذه النتائج على الإمكانات العلاجية لنبات *ميديكاجو ساتيفا* L، لا سيما كعامل طبيعي مضاد للأكسدة ومضاد للسكري، وتبرز أهمية اختيار المذيب في استخلاص المركبات الفعالة. ويوصى بإجراء دراسات إضافية لعزل وتوصيف المركبات المسؤولة عن النشاطات البيولوجية الملحوظة.

الكلمات المفتاحية: الميديكاجو ساتيفا، المستخلصات العضوية، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للسكري

Résumé

Ce travail de recherche s'inscrit dans la valorisation des plantes médicinales à travers l'étude de Medicago sativa L. (luzerne), une légumineuse connue pour sa richesse en métabolites secondaires bioactifs. L'objectif principal est d'évaluer les propriétés pharmacologiques des extraits de cette plante, notamment leurs activités antimicrobienne, antioxydante et antidiabétique.

L'étude expérimentale a été menée sur la partie aérienne de M. sativa, récoltée à Oum El Bouaghi (Algérie). L'extraction a été réalisée par macération dans des solvants de polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol et méthanol à 70 %. Les extraits obtenus ont ensuite été soumis à une série d'analyses biologiques.

Les résultats ont révélé une activité antimicrobienne modérée, particulièrement marquée pour l'extrait méthanolique (EMeOH) contre Escherichia coli, Salmonella enterica et Bacillus subtilis. L'activité antifongique la plus significative a été observée avec le même extrait contre Fusarium oxysporum, avec un taux d'inhibition de 47,36 %. Concernant l'activité antioxydante, les tests DPPH et ABTS ont montré que l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcE) présentait le meilleur pouvoir antiradicalaire, avec une IC_{50} de 227,57 ± 15,72 µg/mL pour DPPH et 59,17 ± 8,47 µg/mL pour ABTS.

L'extrait butanolique (EBuOH) a également démontré une capacité antioxydante notable, tandis que les extraits méthanolique et chloroformique ont montré une activité plus faible. L'évaluation de l'activité antidiabétique, basée sur l'inhibition de l'enzyme α-amylase, a révélé que l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcE) se distingue par une IC_{50} de 12,19 ± 2,28 µg/mL, équivalente à celle de l'acarbose (standard clinique).Les extraits chloroformique et butanolique présentent également une inhibition intéressante, tandis que l'extrait méthanolique reste moins actif.

Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de *M. sativa L.*, notamment en tant qu'agent naturel antioxydant et antidiabétique, et soulignent l'importance du choix du solvant dans l'extraction des principes actifs. Des investigations complémentaires sont recommandées afin d'isoler et de caractériser les composés responsables des activités biologiques observées.

Mots-clés : *Médicago sativa* L., extraits organique, activité antimicrobienne, activité antioxydant, activité antidiabétique.

Abstract

This research focuses on the valorization of medicinal plants through the study of *Medicago sativa* L. (alfalfa), a legume known for its richness in bioactive secondary metabolites. The main objective is to evaluate the pharmacological properties of extracts from this plant, notably their antimicrobial, antioxidant, and antidiabetic activities.

The experimental study was conducted on the aerial parts of *M. sativa*, collected from Oum El Bouaghi (Algeria). Extraction was performed by maceration using solvents of increasing polarity: chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and 70% methanol. The obtained extracts were then subjected to a series of biological assays.

The results revealed moderate antimicrobial activity, particularly pronounced with the methanolic extract (EMeOH) against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Bacillus subtilis*. The most significant antifungal activity was observed with the same extract against *Fusarium oxysporum*, with an inhibition rate of 47.36%. Regarding antioxidant activity, the DPPH and ABTS assays showed that the ethyl acetate extract (EAcE) exhibited the strongest radical scavenging ability, with IC_{50} values of 227.57 ± 15.72 µg/mL for DPPH and 59.17 ± 8.47 µg/mL for ABTS.

The butanolic extract (EBuOH) also demonstrated notable antioxidant capacity, whereas the methanolic and chloroform extracts showed weaker activity. The evaluation of antidiabetic activity, based on the inhibition of the α-amylase enzyme, revealed that the ethyl acetate extract (EAcE) stood out with an IC_{50} of 12.19 ± 2.28 µg/mL, comparable to that of acarbose (clinical standard). The chloroform and butanolic extracts also presented interesting inhibitory effects, while the methanolic extract was less active.

These results confirm the therapeutic potential of *M. sativa* L., especially as a natural antioxidant and antidiabetic agent, and emphasize the importance of solvent choice in the extraction of active compounds. Further investigations are recommended to isolate and characterize the compounds responsible for the observed biological activities.

Keywords: *Medicago sativa* L., organic extracts, antimicrobial activity antioxidant activity, antidiabetic activity.

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicace

الملخص

Résumé

Abstract

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale…….....**01**

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: LES PLANTES MÉDICINALES ET LA FAMILLE DES *Fabaceae*

I.1.Les plantes médicinales.....**03**

I.1.1.Historique.....**03**

I.1.2.Définition des plantes médicinales….....**03**

I.1.3.Origines des plantes médicinales.....**04**

I.1.4.Utilisation et domaines d'application des plantes médicinales.....**04**

I.1.5.La phytothérapie……..……**05**

I.1.5.1. Définition……..……..**05**

I.1.5.2. Types de phytothérapie…….……**06**

I.1.5.2.1. La phytothérapie traditionnelle……...……..**06**

I.1.5.2.2. L'aromathérapie.....**06**

I.1.5.2.3. La phytothérapie moderne.....**06**

I.2. La famille des Fabacées……...….**06**

I.2.1. Description botanique……...……...….**06**

I.2.2. Position systématique……**07**

I.2.3. Habitat et Répartition géographique……..**08**

I.2.4.Les Fabacées en Algérie : Diversité, Habitat et Répartition……..……**09**

I.2.5. Utilisations des plantes de la famille des Fabacées……..…..**10**

I.2.6. Intérêt thérapeutique.....**10**

I.2.7. Intérêt économique.....**11**

I.2.8.Toxicité des plantes de la famille fabacées.....**12**

I.3. Le genre *Medicago*…….……....**13**

I.3.1.Historique du genre *Medicago*…….……...**13**

I.3.2. Présentation du genre *Medicago*…….…....**14**

I.3.3. Habitats et réparation géographique du genre *Medicago*.....**15**

I.3.4. Utilisation du genre *Medicago*…….....**16**

I.4. L'espece *Medicago sativa L*…….……....**16**

1.4.1Présentation de l'espèce *M.sativa*…….…….……**16**

I.4.1.1. Le système racinaire……..……**16**

I.4.1.2. Les tiges et les feuilles.....**17**

I.4.1.3. Les fruits.....**17**

I.4.2. Origine et distribution géographique de l'espèce *M.sativa*.....**18**

I.4.3. Position systématique de l'espèce *M.sativa*.....**18**

I.4.4. Importance de l'espèce *Medicago sativa L*……..19

CHAPITRE II :LES COMPOSÉS BIOACTIFS ET LES ACTIVITÉS PHARMACOLOUGIQUE ETUDIÉES

II.1.Les composés bioactifs…….....20

II.1.1. Les métabolites primaires……..……..……..20

II.1.1.1.Définition……..……..……20

II.1.2. Les métabolites primaires de l'espèce *M.sativa L*……..……..20

II.1.3. Les métabolites secondaires……...……..……...21

II.1.3.1. Definition……..……..……21

II.1.3.2. Classification.....21

II.1.3.2.1.Les composés phénoliques……...……..…...21

II.1.2.2.1.a. Définition.....21

II.1.2.2.1.b. Origine……..……..…..21

II.1.2.2.1.c. Classification……..…22

II.1.2.2.1.d. Rôle biologique.....25

II.1.3.2.2.Les huiles essentielles……..……....25

II.1.2.2.2.a.Définition……..……....25

II.1.2.2.2.b. Classification.....26

II.1.2.2.2.c. .Rôle biologique.....26

II.1.3.2.3.Les alcaloides……27

II.1.2.2.3.a. Définition……..……...27

II.1.2.2.3.b. Classification……...…27

II.1.2.2.3.c. Rôle biologique……...….27

II.1.3.3.Les métabolites secondaires de l'espèce *Medicago sativa L*…….....….27

II.2.Les activités pharmacologiques étudiées.....**30**

II.2.1. Activité antioxydant……...……..…**30**

II.2.1.1.Définition…….……..**30**

II.2.1.2.Le stress oxydatif.....**30**

II.2.1.2.1.Les radicaux libres……..…**31**

II.2.1.2.1.a. Définition……..……..**31**

II.2.1.2.1.b. Origine des radicaux libres……...……..**31**

II.2.1.2.1.c. Types des radicaux libres……...……..**32**

II.2.1.2.2.Les antioxydants……...……...……..**33**

II.2.1.2.2.a. Définition……...……...……..**33**

II.2.1.2.2.b. Types des antioxydants……...……..**33**

II.2.1.2.2.b-1. Les antioxydants endogènes……...……...……..**33**

II.2.1.2.2.b-2. Les antioxydants exogènes……..……...……..**34**

II.2.2. Activité antimicrobienne……...……...……**34**

II.2.2.1.Définition……...……..**34**

II.2.2.2.Les microorganismes étudiés……...……..…..**35**

II.2.2.3.Les antimicrobiens.....**39**

II.2.2.3.a. Les antibiotiques.....**39**

II.2.2.3.b.Les antimicrobiens d'origine végétale.....**39**

II.2.3. Activité antidiabétique……..……**40**

II.2.3.1.Définition……..……...……..**40**

II.2.3.2.Les antidiabétiques.....**40**

II.2.3.2.a. antidiabétiques médicamenteux……..……**40**

II.2.3.2.b. Les antidiabétiques oraux (ADO)…….…….……**40**

II.2.4. Activités pharmacologiques rapportées chez l'espèce *Medicago sativa L*…….....**40**

DEUXIÈME PARTIE PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III: MATÉRIEL & MÉTHODES

III.1. Matériel.....**43**

III.1.1. Matériel végétal.....**43**

III.1.2. Déscription de la région de récolte.....**43**

III.1.3. Matériel du test de l'activité antimicrobienne…….....**44**

III.1.3.1. Les milieu de culture…….……**44**

III.1.3.2. Les souches microbiennes.....**44**

III.2. Méthodes.....**45**

III.2.1. Préparation des extraits végétaux par macération.....**45**

III.2.2. Calcul de rendement d'extraction.....**46**

III.2.3. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....**46**

III.2.3.1. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne.....**46**

III.2.3.2. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique.....**48**

III.2.4. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante.....**50**

III.2.4.1. Le test DPPH.....**50**

III.2.4.1.a) Principe de test.....**50**

III.2.4.1.b)Protocole expérimentale.....**50**

III.2.4.2. Le test ABTS.....**51**

III.2.4.2.a) Principe de test.....**51**

III.2.4.2.b)Protocole expérimentale.....**51**

III.2.5. Méthode d'évaluation de l'activité antidiabétique.....**52**

III.2.5.a) Principe de test.....**52**

III.2.5.b) Protocole expérimentale.....**52**

CHAPITRE IV: RESULTATS & DISCUSSION

IV.1. Le rendement d'extraction.....**54**

IV.2. Résultats des activités pharmacologiques……...……..**55**

IV.2.1. L'activité antimicrobienne…….……..**55**

IV.2.1.1. L'activité antibactérienne.....**55**

IV.2.1.2. L'activité antifongique.....**60**

IV.2.2. L'activité antioxydante.....**61**

IV.2.2.1. Test DPPH.....**62**

IV.2.2.2. Test ABTS.....**63**

IV.2.3. L'activité antidiabétique……..…..……**64**

Conclusion générale……...……...……**67**

Référence

LISTE DES ABREVIATIONS

ADO	Lesantidiabétiquesoraux.
BHA	butylhydroxy anisole
BHT	L'hydroxytoluène butylé
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DPPH	(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
E ACT	Extraitd'acétate d'éthyle.
E BuOH	Extrait*n*-butanolique.
E CHL	Extraitchloroformique
EMeOH	Extraitméthanolique.
ERO	Espècesréactives d'oxygène.
GN	Gulosenutritive.
GPx	Glutathion peroxidase,
H2O2	Peroxided'hydrogène.
HEs	Huiles Essentielles.
HO2•	Radicalperhydroxyle.
HOCl	Acide hypochlorique.
MH	MullerHinton.
O2•-	Radicalsuperoxyde l'anion.
O2	L'oxygène.
PDA	Potatoesdextroseagar.
RL	Radicauxlibres.
ROS	Espècesréactivesde l'oxygéne.
M.S	*Medicago sativa*

LISTES DES FIGURES

Titre de figure	Page
Figure01:Les parties caractéristiques des plantes de famille des fabacée.	**07**
Figure02: Carte de répartition géographique des Fabacées .	**09**
Figure03: Lesystème racinaire de la *Medicago Sativa* .	**17**
Figure04:Représentation botanique de Medicago sativa.	**17**
Figure05:La plante Medicago sativa en fleur **.**	**17**
Figure06 : Carte géographique de la distribution de l'espèce *Medicago sativa L.* dans le monde.	**18**
Figure07: Les principales classes de métabolitessecondaires.	**21**
Figure08 : Exemples des acides phénoliques.	**22**
Figure09: Les différentes sous-catégories de flavonoïdes .	**23**
Figure10: Exemples de stilbene, lignane et autres types de polyphénols .	**24**
Figure11 : Lestress oxydant.	**31**
Figure12: Origine des différents radicaux libres .	**32**
Figure13: Klebsiella pneumoniae.	**35**
Figure14 :*Pseudomonas aeruginosa.*	**35**
Figure15:*Escherichia coli* .	**36**
Figure16:*Serratia marcescens* .	**36**
Figure17:*Staphylococcus aureus.*	**37**
Figure18:*Bacillus subtilis* .	**37**
Figure19:*Botrytis* sp.	**38**
Figure20:*Alternaria* sp.	**38**
Figure21:*Fusarium* spp.	**39**
Figure22: Représentation photographique dede différentes parties de l'espèce *M.sativa* L.	**43**
Figure23: Localisation géographique de la région de récolte.	**44**
Figure24: Schéma d'extraction.	**46**
Figure25: Les étapes de l'activité antibactérienne.	**48**
Figure26: Les étapes de l'activité antifongique.	**49**
Figure27: Principe de test DPPH	**50**
Figure28: Principe de test ABTS .	**51**
Figure 29: Principe de l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase.	**53**

Figure 30: Les étapes de l'activité antioxydante .	**53**
Figure 31: Comparaison du rendement d'extraction de divers extraits de *M.sativa* L.	**54**
Figure32 : Photographies illustrant l'effet de la gentamicine et du DMSO sur la croissance des souches bactériennes testées.	**56**
Figure 33: Photographies illustrant l'effet de l'EBuOH de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.	**56**
Figure 34: Photographies illustrant l'effet de l'EMeOH de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.	**57**
Figure35: Photographies illustrant l'effet de l'EAcE de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.	**57**
Figure 36: Photographies illustrant l'effet de l'de l'EChL de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.	**58**
Figure 37: Photographies montrant l'effet de différents extraits de *M.sativa* sur la croissance de champignons testés	**60**
Figure 38: Test DPPH sur microplaque.	**62**
Figure39: Test ABTS sur microplaque.	**63**
Figure40 : Inhibition de l'alpha amylase sur microplaque.	**64**

LISTE DES TABLEAUX

Titrede tableau	Page
Tableau 01: Utilisation de quelques plantes médicinales.	**05**
Tableau 02: Position systématique des *Fabacées.*	**08**
Tableau 03: Liste des genres des *Fabacées* qui représentent en Algérie.	**10**
Tableau 04: Intérêt thérapeutique de quelques espèces de *Fabacées.*	**11**
Tableau 05: Intérêt économique de quelques espèces de *Fabacées.*	**12**
Tableau 06: Présentation des espèces principales du genre *Medicago.*	**15**
Tableau 07: Position systématique de l'espèce *M.sativa* L.	**19**
Tableau 08: Teneur enmétabolites primairesde l'espèce *M.sativa* L(mg/g) .	**20**
Tableau 09: composition chimique deshuiles essentielles de *Medicago. Sativa L.*	**28**
Tableau 10: Teneur en isoflavones de espèce étudié du *Medicago.sativa.*	**28**
Tableau 11: Classes de flavonoïdes identifiées dans le genre *Medicago sativa.*	**29**
Tableau12: Les saponines identifiées dans *Medicago. Sativa* .	**30**
Tableau 13: Liste de quelques espèces chimiques réactives**.**	**33**
Tableau 14: Activités pharmacologiques rapportées chez l'espèce *Medicago sativa* L.	**41**
Tableau 15: Rendement de différents extraits en pourcentage par rapport au poids total.	**54**
Tableau 16: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne induite par différents extraits de lapartie aérienne de *Medicago sativa L.*	**58**
Tableau 17: Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique induite par différents extraits de M .sativa	**60**
Tableau 18 : Inhibition du radicalelibre DPPH par les extraits de*M.sativa* L.	**62**
Tableau19 : Inhibition du radicalelibre ABTSparles extraits de *M.sativa* L.	**63**
Tableau 20 : Effet des différents extraits de*M.sativa* L. vis-à-vis l'enzyme α-amylase.	**65**

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales occupent une place importante tant dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne, en raison de leur richesse en composés bioactifs aux effets thérapeutiques. Depuis des siècles, elles constituent une ressource essentielle pour la santé humaine et offrent une source naturelle de traitements pour une large gamme de maladies.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), une proportion significative de la population mondiale recourt aux plantes médicinales, témoignant ainsi de leur utilité et de leur large acceptation **(Bharadvaja, 2017 ; Ravichandran et al., 2017).** Ces plantes représentent une ressource précieuse, tant pour les populations rurales qu'urbaines, notamment en Afrique, où elles constituent souvent le principal moyen de soins **(Badiaga, 2011).** Malgré les avancées de la pharmacologie moderne, leur utilisation thérapeutique demeure courante, en particulier dans les pays en développement **(Tabuti et al., 2003).** Les plantes ont toujours occupé une place centrale en tant que remèdes naturels, et les médicaments à base de plantes sont généralement considérés comme moins toxiques et plus doux que les médicaments synthétiques **(Jiofack et al., 2009, 2010).**

La flore algérienne se caractérise par sa richesse et sa diversité, constituant un véritable patrimoine phylogénétique, avec près de 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires **(Dobignard et Chatelain, 2010–2013).** Toutefois, les plantes médicinales d'Algérie restent encore largement méconnues, seules 146 espèces y sont actuellement considérées comme médicinales **(Baba Aïssa, 1999).**

Parmi les plantes ayant attiré l'attention des chercheurs, les espèces du genre *Medicago,* appartenant à la famille des Fabaceae, se distingue par sa richesse en métabolites secondaires et par la diversité de ses usages, à la fois médicinaux et alimentaires.

L'espèce *Medicagosativa* L., plus connue sous le nom de luzerne, est fréquemment associée à l'agriculture du fait de son utilisation comme plante fourragère. Toutefois, elle possède également une longue histoire d'usage médicinal, en raison de ses propriétés nutritionnelles et de ses effets bénéfiques sur la santé humaine. La luzerne est notamment reconnue pour ses effets antioxydants, anti-inflammatoires et hormonaux, et elle est utilisée dans de nombreuses traditions médicales à travers le monde **(Smith et al., 2018).** C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'étudier cette plante.

Le présent manuscrit est structuré en deux grandes parties : une synthèse bibliographique et une partie expérimentale. La première partie présente une revue de la littérature portant sur la plante étudiée et sur sa famille botanique, avec un accent particulier

mis sur les métabolites secondaires. La seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale, incluant la description du matériel et des méthodes, la présentation des résultats, leur interprétation, ainsi qu'une conclusion générale accompagnée de perspectives pour de futurs travaux.

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- ✓ Préparer des extraits bruts de la partie aérienne de la plante à l'aide de quatre solvants de polarité différente ;
- ✓ Etudier l'activité antibactérienne de ces extraits contre huit souches bactériennes (ATCC et cliniques) à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose ;
- ✓ Evaluer l'activité antifongique des extraits sur trois souches fongiques, en utilisant la méthode de contact direct ;
- ✓ Etudier l'activité antioxydante des extraits à l'aide de deux méthodes différentes : DPPH et ABTS ;
- ✓ Etudier l'activité antidiabétique via l'inhibition de l'enzyme alpha-amylase.

PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES PLANTES MÈDICINALES ET LA FAMILLE DES FABACÈES

I.1. Les plantes médicinales

I.1.1. Historique

Les plantes médicinales ont toujours été valorisées pour leurs propriétés thérapeutiques. Leur histoire est étroitement liée à l'évolution de la civilisation humaine, constituant le socle des médecines traditionnelles à travers les âges **(Bauri*et al.*, 2015).**

Bien qu'encore largement méconnues et sous-explorées, les plantes médicinales représentent une ressource naturelle précieuse. Elles sont utilisées depuis des siècles par l'humanité pour traiter diverses affections. On estime que plus de 35 000 espèces végétales ont servi de base à des remèdes sûrs et efficaces dans de nombreuses civilisations, répondant ainsi aux besoins médicaux de plus de 75 % de la population mondiale **(Bahadur*et al.*, 2007).**

Des systèmes médicaux traditionnels tels que l'Ayurvedaen Inde ou la médecine traditionnelle chinoise ont largement recours à des plantes locales à des fins thérapeutiques, mettant en évidence la richesse et l'importance de la biodiversité régionale **(Mamedov&Craker, 2012).**

Dans de nombreux pays africains, la phytothérapie constitue une alternative essentielle aux traitements médicaux dits « modernes ». Cette préférence s'explique non seulement par l'inaccessibilité des infrastructures de santé et le coût élevé de la médecine conventionnelle, mais aussi par une perception largement répandue selon laquelle la phytothérapie offre une approche plus adaptée, voire parfois plus efficace **(Jiofack*et al.*,2010).**

Les premières traces écrites concernant l'usage des plantes médicinales en Algérie et, plus largement, au Maghreb remontent au IXe siècle. À cette époque, Ishâ-Ben-Amran**,** médecin à la cour du prince de Kairouan (Tunisie), rédigea plusieurs traités portant sur la médecine et les substances thérapeutiques simples **(Baba Aïssa, 2000).**

Durant la période coloniale française (1830–1962), des botanistes ont réussi à recenser un grand nombre d'espèces médicinales. En 1942, Fourment et Roquesont publié un ouvrage consacré aux plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, dans lequel ils décrivent environ 200 espèces, principalement originaires du nord du pays, tandis que seulement six provenaient du Sahara.

Aujourd'hui, la phytothérapie demeure largement utilisée en Algérie pour traiter diverses affections telles que le diabète, les rhumatismes, la perte de poids, et même certaines maladies jugées incurables **(Belkhodja, 2016).**

I.1.2. Définition des plantes médicinales

Une plante est dite médicinale lorsqu'une ou plusieurs de ses parties présentent des propriétés bénéfiques pour la santé. Certaines sont officiellement reconnues par la

pharmacopée, tandis que d'autres, bien qu'elles ne soient pas classées comme médicaments, peuvent jouer un rôle important en pharmacie. D'ailleurs, même si une plante n'est pas initialement identifiée comme médicinale, elle peut être considérée comme telle si elle possède des effets thérapeutiques ou préventifs contre certaines maladies **(Daudon et al., 2004).**

D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), une plante médicinale est définie comme toute espèce végétale renfermant une ou plusieurs substances actives pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques, ou servant de précurseurs dans la fabrication de médicaments **(Sofowora, 2010).**

I.1.3. Origines des plantes médicinales

L'origine de l'usage des plantes médicinales remonte à la nuit des temps, lorsque l'Homme, vivant en contact étroit avec la nature, a progressivement appris à reconnaître les vertus curatives de certaines espèces végétales. Issues de traditions empiriques transmises de génération en génération, ces plantes ont constitué la première source de soins, formant une pharmacopée naturelle dont l'efficacité repose sur la richesse en composés bioactifs, tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, tanins et huiles essentielles, capables d'agir sur divers déséquilibres physiologiques.En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organique (Schauenberg and Paris 2005).

I.1.4. Utilisation et domaines d'application des plantes médicinales

Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans plusieurs domaines. En médecine, l'Organisation mondiale de la santé **(OMS, 2003)** estime que plus de 80 % de la population mondiale, en particulier dans les pays en développement, a recours à la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins en matière de santé et de soins primaires. Sur le plan alimentaire, les épices et herbes aromatiques sont largement utilisées comme condiments, colorants naturels et agents aromatisants, contribuant à l'amélioration du goût et de l'aspect des aliments. Par ailleurs, dans le secteur cosmétique, les plantes sont à la base de nombreux produits de beauté, parfums, articles de toilette et produits d'hygiène, en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la peau etles cheveux**.**

Tableau 01 : Utilisation de quelques plantes médicinales.

Plantemédicinale	Partie utilisée	Utilisations	Mode d'utilisation	Références
Thymus ciliatus	Feuilles, sommités fleuries	Antiseptique,antitussif, digestif	Infusion, inhalation, usage externe (huile essentielle)	**Boukhatem et al., 2014**
***Menthapiperita* (menthe poivrée)**	Feuilles	Antispasmodique, carminatif, analgésique	Infusion, huile essentielle	**McKay &Blumberg, 2006**
***Rosmarinusofficinalis* (romarin)**	Feuilles	Stimulant, hépatoprotecteur, antioxydant	Infusion, huile essentielle, décoction	**Infusion, huile essentielle, décoction**
***Origanumvulgare* (origan)**	Feuilles	Antibactérien, antifongique, antispasmodique	Infusion, huile essentielle	**Burt, 2004**
***Allium sativum* (ail)**	Bulbe	Antibactérien, hypotenseur, antioxydant	Cru, infusion, extrait	**Amagase et al., 2001**
***Zingiber officinale* (gingembre)**	Rhizome	Anti-inflammatoire, digestif, antinauséeux	Décoction, poudre, extrait	**Ali et al., 2008**
Aloevera	Gel de la feuille	Cicatrisant, hydratant, anti-inflammatoire	Gel frais, usage externe	**Surjushe et al., 2008**
***Nigellasativa* (cumin noir)**	Graines	Immunostimulant, antidiabétique, antioxydant	Huile, poudre, infusion	**Ahmad et al., 2013**
***Matricariachamomilla* (camomille)**	Fleurs	Antiinflammatoire, sédatif, digestif	Infusion, décoction	**Srivastava et al., 2010**
***Lavandulaangustifolia* (lavande vraie)**	Fleurs	Sédatif, anxiolytique, antiseptique, antispasmodique	Infusion, huile essentielle, bain, inhalation	**Cavanagh& Wilkinson, 2002**

I.1.5.La phytothérapie

I.1.5.1.Définition

Le terme de phytothérapie provient du grec phyton ("plante") et therapeia ("traitement"). Elle se définit donc comme l'utilisation des plantes pour soigner les maladies,

La phytothérapie est une discipline médicale qui repose sur l'utilisation des plantes médicinales ou de leurs extraits naturels (feuilles, racines, fleurs, huiles essentielles, etc.) à des fins préventives ou curatives, fondée sur des données pharmacologiques, cliniques et toxicologiques. **(Lehmann et al., 2013).**

I.1.5.2. Types de phytotherapie

1.1.5.2.1.La phytothérapie traditionnelle

Il s'agit d'une thérapie de substitution utilisée pour soulager ou traiter les symptômes de diverses maladies. Ses origines sont souvent très anciennes et reposent sur l'expérience empirique, c'est-à-dire sur l'utilisation des plantes en fonction de leurs vertus thérapeutiques observées au fil du temps**(Chabrier, 2010).**

1.1.5.2.2. L'aromathérapie

Le terme aromathérapie provient du latin *aroma*, signifiant odeur, et du grec *therapeia*, qui signifie traitement**(Harrag, 2020).** Il s'agit d'une méthode thérapeutique qui repose sur l'utilisation des substances aromatiques extraites de plantes, telles que les huiles essentielles ou les extraits concentrés. Ces huiles, de composition chimiquement complexe, doivent être utilisées avec précaution, principalement par voie cutanée, afin de garantir leur efficacité et leur sécurité **(Souilah, 2018).**

1.1.5.2.3. La phytothérapie moderne

La phytothérapie moderne est utilisée comme traitement médical fondé sur des principes actifs extraits de plantes médicinales, dont l'efficacité est démontrée par des études cliniques. Elle repose sur des connaissances biochimiques et pharmacologiques, et emploie des produits d'origine végétale obtenus par extraction. Ces extraits sont standardisés et formulés de manière similaire aux médicaments conventionnels **(Moreau, 2003).**

I.2. La famille des *Fabacées*

I.2.1. Description botanique

La famille des Fabacées, autrefois appelée Légumineuses, regroupe des plantes dicotylédones, à pétales libres (*dialypétales*) et à ovaire supérieur (*superovariées*). Ce sont des plantes herbacées ou ligneuses (arborescentes), de type annuel, bisannuel ou vivace, dont le fruit caractéristique est une gousse ou légumineuse **(Marouf& Reynaud, 2007).**

Les Fabacées sont en général des plantes hermaphrodites et autogames, bien que certaines espèces comme le haricot d'Espagne (*Phaseoluscoccineus*), aussi appelé Orteil de prêcheur, soient allogames. Chez quelques espèces comme la fève, les visites d'insectes peuvent favoriser un certain taux de pollinisation croisée **(Quézel& Santa, 1962).**

Selon **Judd et al. (2002),** les Fabacées peuvent se présenter sous forme de plantes herbacées, d'arbustes, d'arbres, ou encore comme des lianes grimpantes à l'aide de vrilles.

Leur feuillage est généralement alterné, avec des feuilles composées : pennées,trifoliées, unifoliées, parfois bipennées. Les feuilles sont entières ou légèrement dentées.

Les fleurs, souvent hermaphrodites, peuvent être régulières ou irrégulières, avec un périanthe double. Le calice, formé de cinq segments, peut être caduc ou persistant et prendre diverses formes : en tubule, en cloche ou bilabié.

La corolle, généralement zygomorphe, comporte cinq pétales, dont la disposition est typique : un étendard, deux ailes et deux pétales soudés en carène.Le nombre d'étamines varie de cinq à dix, parfois plus, et elles peuvent être libres ou soudées en tube.

Les inflorescences sont souvent discrètes, parfois réduites à une seule fleur terminale ou axillaire.

Le grain est en général exalbuminé (sans albumen), et le fruit est le plus souvent une gousse déhiscente, mais peut aussi être une samare, une drupe, un akène, ou exceptionnellement une baie **(Peirs, 2005).**

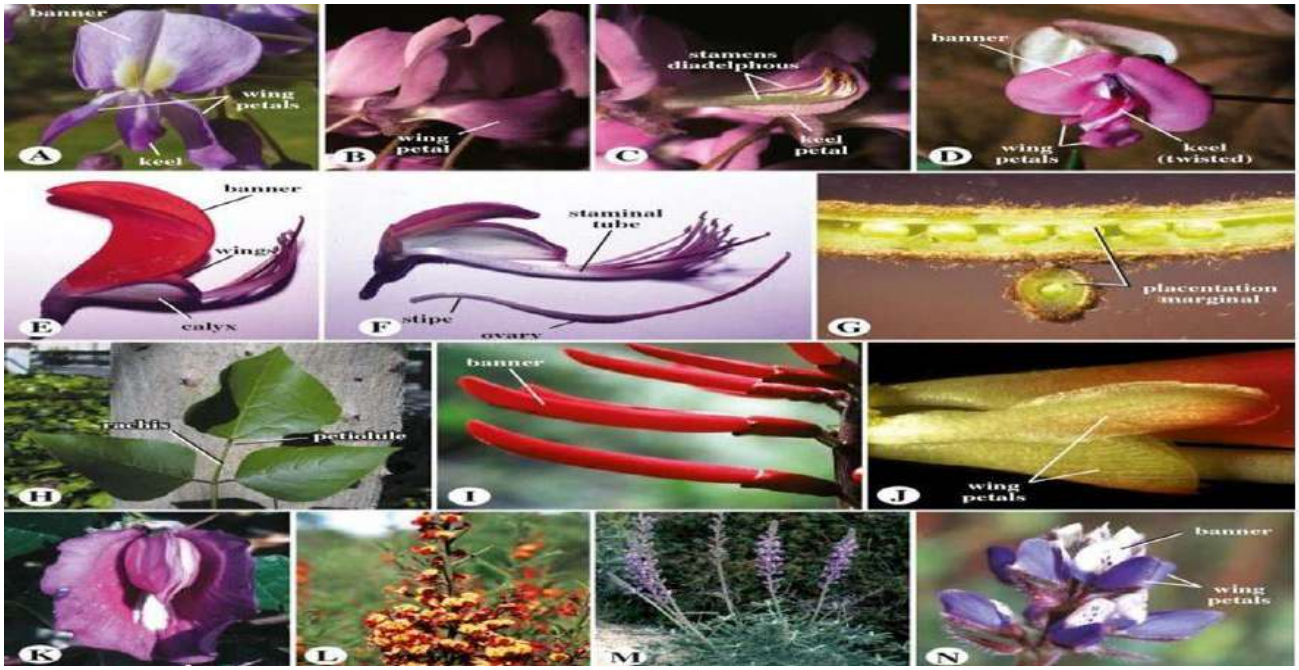


Figure 01 : Les parties caractéristiques des plantes de famille des fabacée **(Simpson, 2010).**

I.2.2. Position systématique

La classification traditionnelle des Fabacées s'appuyait principalement sur des critères morphologiques, en particulier les caractéristiques florales, ce qui permettait de diviser la famille en trois grands sous-groupes: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae*. Toutefois, les avancées en phylogénie moléculaire ont remis en cause cette structure en montrant que *Mimosoideae* et *Papilionoideae* sont en réalité incluses dans un ensemble paraphylétique correspondant aux *Caesalpinioideae*. Ces résultats ont entraîné une révision de la classification, conduisant à la reconnaissance de six sous-familles monophylétiques:

Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae et *Papilionoideae* **(Azani*et al.*, 2017 ; Wang, 2018).**

Tableau 02: Position systématique des *Fabacées***(Boutaghane, 2013).**

Règne	*Plantae*
Sous-règne	*Tracheobionta*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Magnoliopsida*
Ordre	*Fabales*
Famille	*Fabaceae*(syn. *Leguminosae)*
Sous-familles	*Caesalpinioideae* *Cercidoideae* *Detarioideae* *Dialioideae* *Duparquetioideae* *Papilionoideae*
Genres	Environ 700
Espece	Environ 20 000

I.2.3. Habitat et Répartition géographique

Les Fabacées sont largement distribuées à l'échelle mondiale et se retrouvent dans la quasi-totalité des biomes, y compris dans les milieux les plus extrêmes **(Schrire et al., 2005a, b).** Dans les forêts tropicales humides d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie, elles contribuent de manière significative à la richesse et à l'abondance des espèces végétales **(Yahara*et al.*, 2013).** Elles occupent également une place dominante dans les savanes et les forêts tropicales sèches **(Dryflor, 2016),** ainsi que dans les écosystèmes méditerranéens, désertiques et tempérés, pouvant même coloniser des zones de haute altitude ou de latitudes extrêmes.

La distribution des Fabacées varie en fonction de leur sous-famille. Les *Faboideae* sont des espèces cosmopolites que l'on retrouve dans une grande diversité d'habitats à travers le monde. Les *Caesalpinioideae* sont majoritairement présentes dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie, d'Afrique et des Amériques. Les *Mimosoideae*, quant à elles, s'épanouissent aussi bien dans les zones arides et semi-arides d'Afrique, d'Amérique et d'Australie que dans les régions tropicales et subtropicales, où elles occupent souvent une

position dominante. De manière générale, les Fabacées sont représentées dans l'ensemble des biomes terrestres **(Ndayishimiye, 2011).**

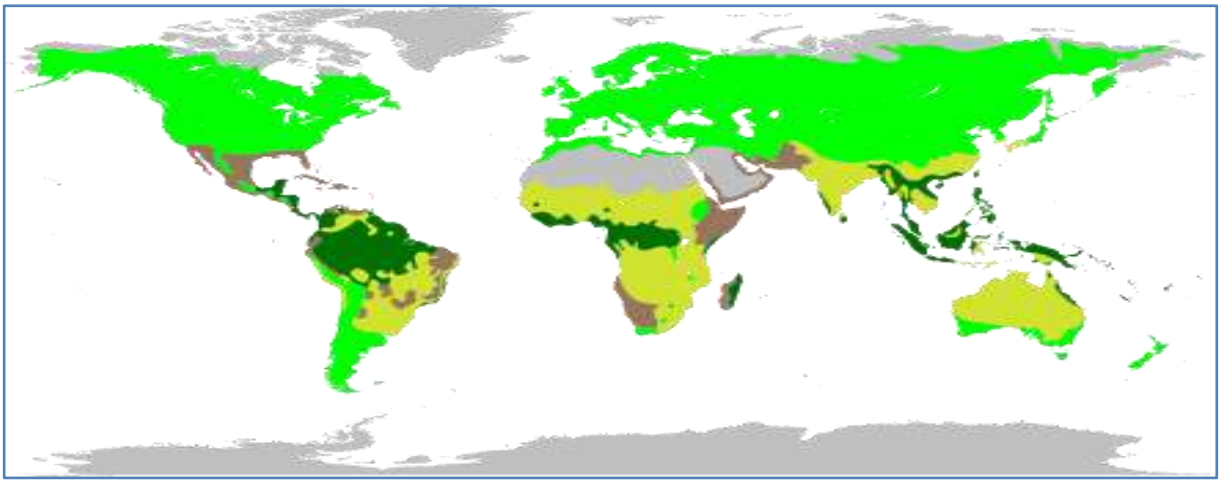


Figure 02 : Carte de répartition géographique des Fabacées**(Heywood, 1996).**

I.2.4. Les Fabacées en Algérie : Diversité, Habitat et Répartition

La famille des Fabacées (ou légumineuses) constitue l'un des groupes botaniques les plus représentés en Algérie, aussi bien en nombre d'espèces qu'en diversité écologique. Présentes dans presque toutes les régions biogéographiques du pays.

Dans les zones agroécologiques favorables du Nord-Est de l'Algérie, on observe la présence de riches associations fourragères naturelles regroupant plusieurs espèces appartenant à divers genres de Fabacées (*Hedysarum*, *Trifolium*, *Medicago*, *Astragalus*, *Scorpiurus*) et de graminées (*Phalaris*, entre autres), témoignant d'une grande diversité floristique **(Issolah et al., 2011).** En milieu saharien, notamment dans les régions hyperarides, la luzerne (*Medicagosativa L.*) constitue l'espèce fourragère principale. Elle y est cultivée depuis longtemps, et les agriculteurs ont développé des populations locales capables d'égaler, voire de surpasser, certaines variétés introduites sur le plan agronomique **(Chaabena et al., 2006).**

Par ailleurs, dans le Sud-Ouest du pays, notamment dans les oasis du Touat, du Gourara et du Tidikelt (wilaya d'Adrar), la luzerne est cultivée aux côtés d'autres espèces fourragères comme l'orge (*Hordeumvulgare*), le mil (*Pennisetumsp.*), le sorgho (*Sorghumvulgare*) et le maïs (*Zeamays L.*).

À cela s'ajoutent des cultivars locaux de pois fourrager (*Pisumsativum L.*), également utilisés par certains agriculteurs dans ces zones sahariennes **(Rahal Bouziane, 2006).** Cette diversité d'espèces cultivées selon les régions reflète l'adaptation des pratiques agricoles aux conditions climatiques et pédologiques locales.Cette diversité témoigne de l'adaptabilité écologique des Fabacées à des milieux très contrastés, allant des zones humides du Nord aux

déserts du Sud, confirmant leur importance écologique, économique et agricole dans le contexte algérien.Le tableau ci-dessous présente les genres de la famille des Fabacées qui représentent en Algérie:

Tableau 03 : Liste des genres des Fabacées qui représentent en Algérie.

Sous-famille	Genres presents en Algeria	Références
Caesalpinioideae	*Cercissiliquastrum* (arbre de Judée) Acacia,Leucaena,Albizia,Tamarindus Senna,Cassia,Delonix,Parkinsonia	**Quézel& Santa (1963) (Kheloufi et al., 2018).**
Papilionoideae	*Medicago* (luzerne), *Trifolium* (trèfles), *Astragalus,Hedysarum,Vicia,Lathyrus,Pisum* (pois)	**Quézel& Santa (1963) (Issolah et al., 2011).**

I.2.5. Utilisations des plantes de la famille des Fabacées

Les Fabacées, ou légumineuses, constituent l'une des familles de plantes le plus significatif tant sur le plan économique qu'écologique et sociétal, en raison de leur remarquable diversité morphologique et fonctionnelle, ainsi que de la richesse de leurs composés bioactifs.

I.2.6. Intérêt thérapeutique

Les Fabacées jouent un rôle essentiel dans les médecines traditionnelles à travers le monde, grâce à leur composition riche en substances bioactives présentant un large éventail de propriétés pharmacologiques. Depuis des siècles, de nombreuses espèces de cette famille sont employées pour traiter diverses affections, notamment les infections, les inflammations, les troubles digestifs, les maladies respiratoires ainsi que le diabète **(Nasri*et al.*, 2014).** Leur efficacité thérapeutique repose principalement sur la présence de composés secondaires tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les tanins et les isoflavones, qui leur confèrent des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et hypoglycémiants **(Atanasov*et al.*, 2015 ; Katoch*et al.*, 2013).** Le tableau ci-dessous présente l'intérêt thérapeutique de quelques espèces de la famille des Fabacées:

Tableau 04 : Intérêt thérapeutique de quelques espèces de Fabacées.

Espèce	Composébioactif	Utilisationthérapeutique	Référence
Glycine max **(Le soja)**	isoflavones	-Prévenir certaines maladies cardiovasculaires -Prévenir les troubles liés à la ménopause	**(Messina et al., 2006).**
Trigonellafoenum-graecum**(fenugrec)**	Saponines, alcaloïdes	-Réguler la glycémie -Améliorer la digestion	**(Basch et al., 2003).**
Glycyrrhizaglabra**(réglisse)**	flavonoïdes	-Effet anti-inflammatoires -Effet antiviraux	**(Fiore et al., 2008).**
Medicagosativa **(luzerne)**	Saponines Flavonoïdes, coumarines,	- Antioxydant - Diurétique	**(Mladenka et al., 2010).**
Cicer arietinum **(pois chiche)**	Protéines, isoflavones, saponines	- Antioxydant - Anti-inflammatoire	**(Jukanti et al., 2012).**
Phaseolusvulgaris **(haricot commun)**	flavonoïdes	- Antidiabétique - Antioxydant	**(Barrett&Udani, 2011).**
Cassia angustifolia **(séné)**	Sennosides (A, B)	- Laxatif stimulant (contre constipation occasionnelle) - Antioxydant	**(Capasso et al., 2003).**
Parkiabiglobosa **(néré africain)**	Tanins, flavonoïdes, saponines	- Antidiabétique - Anti-inflammatoire - Antimicrobien	**(Ouédraogo et al., 2012).**

I.2.7. Intérêt économique

Outre leur usage médicinal, les Fabacées constituent l'une des familles botaniques les plus significatives sur le plan économique, en raison de leur rôle central dans l'agriculture, l'industrie, la pharmacopée ainsi que dans le maintien de la sécurité alimentaire à l'échelle mondiale. Voici dans le tableau 05 ; des exemples de leurs principales applications économiques.

Sur le plan nutritionnel, des espèces telles que le pois (*Pisumsativum*), le haricot (*Phaseolusvulgaris*), la lentille (*Lens culinaris*) ou le soja (*Glycine max*) fournissent des protéines végétales de haute qualité, des fibres et divers micronutriments essentiels, ce qui en fait des aliments de base dans de nombreux régimes alimentaires à travers le monde **(Duranti, 2006 ; FAO, 2016).**

En agriculture, des plantes comme la luzerne (*Medicagosativa*) et le trèfle (*Trifolium spp.*) sont couramment utilisées comme fourrage, tandis que d'autres espèces améliorent la

fertilité des sols par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, contribuant ainsi à la durabilité des systèmes agroécologiques**(Sprent*et al.*, 2017)**.

Sur le plan industriel, certaines espèces produisent des substances telles que des gommes (par exemple la gomme arabique extraite d'*Acacia senegal*), des résines, ou encore des extraits utilisés dans les secteurs des cosmétiques, de la parfumerie et de la pharmaceutique **(Langenheim, 2003 ; Etxeberria*et al.*, 2020).** Cette diversité d'usages confère aux Fabacées un rôle stratégique dans de multiples domaines d'activité.

Tableau 05: Intérêt économique de quelques espèces de Fabacées.

Espèce	Nom commun	Interetseconomique	References
Acacia senegal	Gommier blanc	-Utiliser dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique comme agent épaississant, stabilisant et émulsifiant (Gomme arabique)	**(Ali et al., 2009) (Langenheim, 2003) (Etxeberria*et al.*, 2020)**
Prosopis juliflora	Mesquite	-Utiliser dans les secteurs de cosmétique et de la pharmaceutique (la formulation de produits d'hygiène ou de soins de la peau)	**(Etxeberriaet al., 2020)**
Glycine max	Le soja	-Utiliser dans l'industrie :(Produire des huiles, des protéines végétales isolées, des encres d'impression, des plastiques biodégradables et même des biocarburants) -Utiliser pour l'alimentation	**(Hill et al., 2006)**
Phaseolusvulgaris	Le haricot	-Utilisation alimentaire	**(Barrett&Udani, 2011)**
Medicagosativa	Luzerne	-Utiliser en agriculture (Comme fourrage)	**(Sprent et al., 2017)**
Trifolium spp.	Trefle	-Utiliser en agriculture (Comme fourrage)	**(Sprent et al., 2017)**
Cicer arietinum	(pois chiche)	-Utilisation alimentaire culture agricole essentielle	**(Jukanti et al., 2012 ; FAO, 2021)**
Glycyrrhizaglabra	(réglisse)	-utilisé dans l'industrie alimentaire	**(Fiore et al., 2008)**

I.2.8. Toxicité des plantes de la famille fabacées

Bien que de nombreuses espèces de la famille des Fabacées soient largement valorisées dans les domaines de l'alimentation, de la médecine et de l'agriculture, certaines peuvent présenter une toxicité significative pour l'être humain et les animaux. Cette toxicité est principalement liée à la présence de métabolites secondaires tels que les lectines, les alcaloïdes, les saponines ou encore certains acides aminés non protéiques.

À titre d'exemple, les graines crues de *Phaseolusvulgaris* (haricot commun) renferment une lectine appelée phytohémagglutinine, dont la consommation sans cuisson adéquate peut entraîner de graves troubles gastro-intestinaux **(Pusztai&Bardocz, 1996).**

Par ailleurs, *Lathyrussativus* (pois carré) est reconnu pour sa teneur en acide β-N-oxalyl-α,β-diaminopropionique (β-ODAP), une neurotoxine impliquée dans le développement du lathyrisme, une maladie neurologique paralysante pouvant survenir après une consommation répétée, notamment en période de disette **(Kuo&Lambein, 1991).**

De leur côté, certaines espèces du genre *Lupinus* renferment des alcaloïdes quinolizidiniques aux effets potentiellement neurotoxiques ou cardiotoxiques. Toutefois, des variétés dites « douces » ont été sélectionnées afin de réduire la concentration de ces composés et de limiter ainsi les risques pour la santé **(Jansen *et al.*, 2012).**

Chez les animaux d'élevage, certaines espèces de Fabacées, telles que *Indigoferaspicata* et les espèces du genre *Crotalaria*, peuvent provoquer de graves intoxications hépatiques. Ces effets toxiques sont principalement liés à la présence d'indospicatine pour la première, et d'alcaloïdes pyrrolizidiniques pour les secondes **(Cheeke, 1998).** Ainsi, malgré les nombreux bénéfices associés à l'usage des Fabacées, leur emploi doit s'accompagner d'une identification rigoureuse des espèces et d'une connaissance approfondie de leurs composés chimiques afin de prévenir tout risque toxique.

I.3. Le genre *Medicago*

I.3.1. Historique du genre *Medicago*

La luzerne *(Medicago sativa L.)* est l'une des cultures fourragères les plus anciennes au monde. Son origine géographique se situe dans la région du Croissant fertile, notamment en Iran, en Turquie et dans les zones avoisinantes du Caucase et d'Asie centrale, où elle était déjà cultivée il y a environ 7 000 ans pour nourrir le bétail **(Hirsch, 2010).** Elle fut *introduite* en Grèce vers 490 av. J.-C., à la suite des contacts entre Grecs et Perses. Les Grecs la désignaient sous le nom de « Medike », en référence à la Médie, d'où dérive l'actuelle dénomination botanique Medicago**(Smartt, 1990).** L'Empire romain en favorisa ensuite la diffusion dans le bassin méditerranéen. Au cours du Moyen Âge, les Arabes contribuèrent largement à son expansion vers l'Afrique du Nord et l'Europe méridionale grâce à leurs réseaux commerciaux et agricoles **(Zohary, Hopf, & Weiss, 2012).** Introduite en Amérique du Sud au XVIe siècle par les colons espagnols, la luzerne arriva en Amérique du Nord au XVIIIe siècle, où elle fut rapidement adoptée pour l'élevage **(Putnam, Orloff, &Lanini, 2007).** À partir du XIXe siècle, les efforts de sélection génétique ont permis le développement de variétés mieux adaptées aux différents climats, plus productives et plus résistantes aux

maladies. Aujourd'hui, *Medicago sativa* est largement cultivée dans les zones tempérées du globe et joue un rôle clé dans les systèmes agro-pastoraux modernes **(Bouton, 2012).**

I.3.2. Présentation du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à la famille des Fabaceae (ou *Leguminosae*) et comprend plus de 80 espèces. Ce genre est particulièrement connu pour ses espèces fourragères et ses capacités de fixation symbiotique de l'azote. Voici quelques espèces représentatives du genre *Medicago* :

Tableau 06 : Présentation des espèces principales du genre *Medicago*

Espèce	Représentation photographique	Description botanique
M.polymorpha		Plante herbacée annuelle ou bisannuelle de 20-50 cm. **(Graziano, et al., 2010)** **Tiges :**De nombreuses tiges prostrées et ramifiées émergent de la couronne, s'étendant jusqu'à 30 pouces. **Feuilles** :Sont subglabres et présentent une apparence trifoliée, avec des folioles généralement en forme de coin et dentées dans leur partie supérieure. **Fleurs :**L'inflorescence est constituée de 3 à 5 petites fleurs jaunes qui s'épanouissent au début du printemps. Ces fleurs sont particulièrement petites. **Fruits :**Les gousses, enroulées en 2 à 5 spirales, mesurent environ 5 mm de diamètre. Leurs bords portent des épines droites ou crochues pouvant atteindre 3 mm, ou sont parfois dépourvus d'épines. Elles renferment plusieurs graines en forme de rein**. (Lesins et Lesins, 1979)**
M. lupulina		une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, mesurant entre 15 et 60 cm de hauteur. (**Lesins, K. A. 1979).** **Tiges :**fines et ramifiées **Feuilles :**trifoliées à folioles ovales, dentées à leur extrémité. **Fleurs :** Ses fleurs sont petites, de couleur jaune, regroupées en grappes et apparaissent du printemps à l'été **Fruits :**sont des gousses spiralées qui deviennent noires à maturité.(**Graziano, 2010)**
M.truncatula		plante herbacée annuelle de la famille des Fabaceae, originaire du bassin méditerranéen.Elle mesure généralement entre 10 et 50 cm de hauteur.(**Graziano,2010).** **Tiges :** tiges ramifiées dès la base **Feuilles :**trifoliées, avec des folioles obovales à obcordées, souvent dentées vers l'apex. **Fleurs :**Les fleurs, de couleur jaune, sont regroupées en petites inflorescences de 1 à 5 fleurs. **Fruits :** Le fruit est une gousse spiralée, épineuse, contenant plusieurs graines.(**Lesins,1979).**

M.minima		Plante herbacée annuelle de petite taille appartenant à la famille des Fabaceae. Elle mesure généralement entre 5 et 25 cm de hauteur. **Tiges :**Ses tiges sont fines, étalées ou ascendantes, souvent très ramifiées. **Feuilles :**Les feuilles sont trifoliées, avec des folioles petites, obovales à légèrement dentées. **Fleurs :**Les fleurs, solitaires ou groupées par 2 ou 3, sont petites (2–4 mm), de couleur jaune. **Fruits :** Les fruits sont des gousses spiralées, très petites (2–3mm), souvent couvertes de petites épines, contenant généralement 1 à 3 graines. (**Rechinger, 1981)**.
M.arabica		Plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Fabaceae. Elle mesure entre 10 et 40 cm de hauteur. **Tiges :** rampantes ou ascendantes, souvent poilues. **Feuilles :**trifoliées, avec des folioles larges, arrondies, généralement ornées de taches violettes caractéristiques en forme de croissant ou de tache centrale. **Fleurs :**de couleur jaune, mesurent environ 6 à 8 mm et sont regroupées en petites inflorescences (1 à 4 fleurs) **Fruits :**sont des gousses spiralées aplaties, munies de pointes ou d'épines, contenant plusieurs graines **(Greuter, 1984)**
M.rigidula		Planteherbacée annuelle appartenant à la famille des Fabaceae. Elle mesure entre 10 et 50 cm **Tiges :**dressées ou ascendantes, rigides et parfois rameuses à la base. **Feuilles :**trifoliées, avec des folioles obovales à bords finement dentés. **Fleurs :** sont petites, jaunes, mesurant environ 3–5 mm, disposées en petites grappes. La floraison a lieu au printemps. **Fruits :** Le fruit est une petite gousse spiralée, comprimée, souvent munie de petites épines recourbées vers l'intérieur. **Jomphe, M. (1989).**

I.3.3. Habitats et réparation géographique du genre *Medicago*

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des cultures fourragères les plus anciennes au monde. Son origine géographique se situe dans la région du Croissant fertile, notamment en Iran, en Turquie et dans les zones avoisinantes du Caucase et d'Asie centrale, où elle était déjà cultivée il y a environ 7 000 ans pour nourrir le bétail **(Hirsch, 2010).** Elle fut introduite en Grèce vers 490 av. J.-C., à la suite des contacts entre Grecs et Perses. Les Grecs la désignaient sous le nom de « Medike », en référence à la Médie, d'où dérive l'actuelle dénomination botanique *Medicago***(Smartt, 1990).** L'Empire romain en favorisa ensuite la diffusion dans le bassin méditerranéen. Au cours du Moyen Âge, les Arabes contribuèrent largement à son expansion vers l'Afrique du Nord et l'Europe méridionale grâce à leurs réseaux commerciaux et agricoles **(Zohary, Hopf, & Weiss, 2012).** Introduite en Amérique du Sud au XVIe siècle par les colons espagnols, la luzerne arriva en Amérique du Nord au XVIIIe siècle, où elle fut rapidementadoptée pour l'élevage **(Putnam, Orloff, &Lanini, 2007).** À partir du XIXe siècle, les efforts de sélection génétique ont permis le développement

de variétés mieux adaptées aux différents climats, plus productives et plus résistantes aux maladies. Aujourd'hui, *Medicago sativa* est largement cultivée dans les zones tempérées du globe et joue un rôle clé dans les systèmes agro-pastoraux modernes **(Bouton, 2012).**

I.3.4. Utilisation du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* regroupe plusieurs espèces utilisées principalement dans les domaines agricole, alimentaire, médicinal et environnemental. L'espèce la plus connue, *Medicago sativa* (luzerne), est largement cultivée comme plante fourragère en raison de sa richesse en protéines, en fibres, en minéraux (calcium, magnésium, fer) et en vitamines, ce qui en fait un aliment de haute qualité pour le bétail **(Putnam et al., 2007).** Elle est également utilisée en agriculture biologique comme engrais vert, grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, enrichissant ainsi les sols **(Frame et al., 1998).** D'autres espèces comme *Medicago polymorpha* ou *Medicago lupulina* sont parfois utilisées dans les systèmes fourragers locaux ou comme couvre-sol.

Sur le plan médicinal, *Medicago sativa* est connue en phytothérapie pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, hypocholestérolémiantes et œstrogéniques, liées à la présence de flavonoïdes, saponines et phytoestrogènes**(Kumar et al., 2013)**. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter des affections digestives, des troubles hormonaux et comme tonique général. De plus, des extraits de luzerne sont également explorés pour leurs effets potentiels contre certaines maladies métaboliques et inflammatoires **(Jiang et al., 2020).**Enfin, certaines espèces du genre *Medicago*, notamment *M. truncatula*, sont largement utilisées comme organismes modèles en génétique végétale et en biologie des légumineuses, en raison de leur génome relativement simple et de leur symbiose bien caractérisée avec des bactéries fixatrices d'azote **(Young et al., 2011).**

I.4. L'espece *Medicago sativa* L.

I.4.1. Présentation de l'espèce *M.sativa*

Medicago sativa L. est une plante herbacée vivace pouvant atteindre une hauteur de 30 à 80 cm. Elle se distingue par une souche ligneuse solide qui lui confère une grande longévité.

I.4.1.1. Lesystème racinaire

La luzerne possède un système racinaire pivotant très développé, pouvant atteindre en moyenne deux mètres de profondeur, voire davantage. Cette profondeur lui confère une excellente résistance à la sécheresse, tout en favorisant l'amélioration de la structure du sol grâce à la fragmentation et à l'augmentation de sa perméabilité. Par ailleurs, comme de nombreuses légumineuses, elle forme des nodosités sur ses racines en symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, ce qui lui permet de fixer l'azote atmosphérique et de

contribuer ainsi à l'enrichissement naturel des sols **(Kumar et al., 2013).**



Figure 03: Lesystème racinaire de la *Medicago Sativa***(Teixeira et al., 2011).**

I.4.1.2. Les tiges et les feuilles

La tige de *Medicago sativa* est pleine, de section circulaire, à texture coriace, et généralement ramifiée. Chaque plante peut porter entre 5 et 15 tiges. Les feuilles sont trifoliées, composées de trois folioles oblongues, dont les extrémités présentent de fines dents mucronées. Le pétiole de la foliole centrale est légèrement plus long que ceux des deux folioles latérales, ce qui constitue un caractère distinctif de l'espèce **(Reddy, 2004).**



Figure 04: Représentation botanique de *Medicagosativa* **(Köhler,1887).**



Figure 05 : Photographie de *Msativa*en floraison

I.4.1.3. Les fruits

Les fruits de *Medicago sativa* sont des gousses spiralées, généralement indéhiscentes, contenant 2 à 8 petites graines réniformes. Celles-ci mesurent 1 à 2 mm, sont de couleur jaunâtre à brun clair et possèdent un tégument dur favorisant la dormance. Utilisées pour le semis, elles sont aussi consommées sous forme germée en raison de leur richesse

nutritionnelle **(Duke, 1981 ; Small &Jomphe, 1989 ; McDonald & Copeland, 1997 ; Li et al., 2006).**

I.4.2. Origine et distribution géographique de l'espèce *M.sativa*

L'espèce *Medicago sativa* L. est probablement originaire des régions montagneuses d'Asie de l'Ouest, en particulier des hauts plateaux d'Iran, de Turquie et du Caucase. Cette plante aurait été introduite en Europe vers 470 av. J.-C., avant les guerres médiques, en provenance de la Médie (territoire correspondant à une partie de l'actuel Iran). À cette époque, elle était désignée sous le nom de "*Medica herba*" ou "*herbe de Médie*", appellation qui a ensuite donné naissance au nom scientifique du genre *Medicago*.

Aujourd'hui, la luzerne est considérée comme la plante fourragère la plus cultivée à l'échelle mondiale, en raison de sa richesse nutritionnelle, de sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et de ses usages médicinaux traditionnels. Elle est largement répandue dans les régions subtropicales et tempérées chaudes, ainsi qu'en zones d'altitude, où elle s'adapte à une grande diversité de conditions agro climatiques **(Brooker, 2007).**

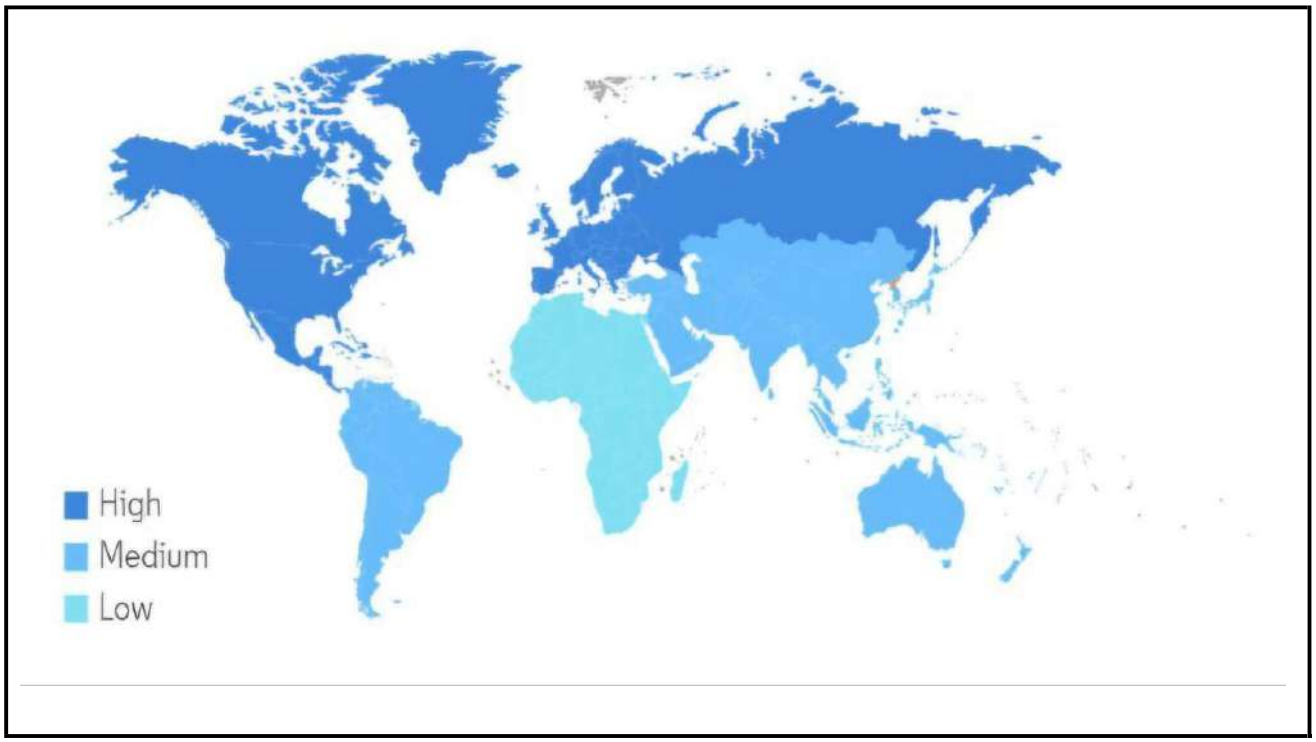


Figure 06 : Carte géographique de la distribution de l'espèce *M.sativa L.* dans le monde**(Mordor,2023).**

I.4.3. Position systématique de l'espèce *M.sativa*

D'après le système de classification du Groupe Phylogénétique des Angiospermes III **(APG III, 2009),**l'espèce *Medicago sativa* L. est classée comme suit sur le plan botanique :

Tableau 07 : Position systématique de l'espèce *M.sativa* L.

Règne	*Plantae*
Embranchement	*Spermatophytes*
Sous-embranchement	*Angiospermes*
Classe	*Dicotylédones*
Sous- classe	*Rosidées*
Ordre	*Fabales*
Famille	*Fabaceae*
Sous- famille	*Faboideae*
Tribus	*Trifolieae*
Genre	*Medicago*
Espèce	*Medicagosativa* L.

I.4.4. Importance de l'espèce *Medicago sativa* L.

Selon **Mauriès (2003**), la luzerne est une plante pérenne. Elle est largement cultivée dans le monde du fait de sa richesse en protéines **(Colas, 2003).** Elle jouit d'un regain d'intérêt lié notamment à sa richesse en protéines. Ainsi, elle propose le rendement protéique le plus élevé parmi les plantes fourragères (15 tonnes de matière sèche à l'hectare fournissent 2,6 tonnes de protéines) **(Seddiki, 2014).** De plus, elle offre une certaine proportion des protéines requises pour les animaux dans une ration donnée, telles que le bêta-carotène et les fibres essentielles à la digestion chez les ruminants.

Selon **Hanson et al. (1988),** la culture de la luzerne s'étendait sur 32 millions d'hectares à travers le monde. Elle est employée en tant que nourriture déshydratée ou de poudres dans la nutrition animale.

De ce fait, les luzernes annuelles sont en mesure d'offrir un fourrage dont la valeur énergétique par kilo de matière sèche varie entre 0,7 et 0,8 UF pour les feuilles, entre 0,6 et 0,7 UF pour les tiges et entre 0,4 et 0,5 UF pour les gousses **(Labdi, 1991).** En outre, elle joue un rôle crucial dans l'amélioration de la structure du sol, l'augmentation de la fertilité des sols, la réduction de l'érosion du sol et une plus grande biodiversité des sols sont des avantages environnementaux obtenus par la culture de la luzerne **(Melis et al. 2017)** surtout en régions méditerranéennes.Dans l'oasis saharienne d'Algérie, la luzerne est la culture fourragère prédominante. C'est une culture fourragère parfaitement ajustée au climat saharien, extrêmement productive, capable de produire jusqu'à 10 tonnes de matière verte par hectare dans des conditions optimales **(Chaabena, 2001).**

CHAPITRE II: LES COMPOSÉS BIOACTIFS ET LES ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES ÉTUDIÉES

CHAPITRE II : Les composés bioactifs et les activités pharmacologiques étudiées

II.1. Les composés bioactifs

Les plantes produisent une grande variété de molécules, issues soit de leur propre métabolisme, soit de leur interaction avec l'environnement. Ces substances remplissent des fonctions essentielles au sein de la plante, et certaines présentent un intérêt particulier pour des applications thérapeutiques.

On distingue généralement deux grandes catégories de composés : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (également appelés métabolites spécialisés ou produits naturels) **(Taiz et al., 2015).**

II.1.1. Les métabolites primaires

II.1.1.1.Définition

Les métabolites primaires sont des composés organiques de faible poids moléculaire, directement impliqués dans les processus fondamentaux de croissance et de développement de la plante. Ils sont fortement conservés dans le règne végétal et se répartissent en quatre grandes familles : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques **(Fernie et Pichersky, 2015).**

II.1.1.2. Les métabolites primaires de l'espèce *M.sativa L.*

Selon plusieurs études, *Medicago sativa* L. (luzerne) présente une composition biochimique particulièrement riche en métabolites primaires. Sur le plan agronomique, cette richesse biochimique lui confère une valeur nutritive élevée, ce qui en fait l'une des plantes fourragères les plus utilisées dans les systèmes d'élevage intensif **(Jouany et al., 2000).**

Le tableau suivant présente les principaux types de métabolites primaires que l'on retrouve chez cette espèce :

Tableau 08 : Teneur en métabolites primairesde l'espèce *M.sativa* L (mg/g) .

Métabolites primaires	**Les glucides**	**Les acides aminés**	**Les acides gras**	**Les acides organiques**
M.sativa L.	3.02	7.38	14.72	5.17

Les métabolites primaires de l'espèce *Medicago sativa* L. jouent un rôle fondamental dans sa croissance et ses performances agronomiques. Leur richesse, notamment en protéines et en glucides, justifie l'importance de cette plante en tant que fourrage. De plus, ces composés interviennent dans diverses voies métaboliques menant à la production de métabolites secondaires aux propriétés bioactives, ce qui confère à la luzerne un double intérêt, à la fois agronomique et pharmacologique.

CHAPITRE II : Les composés bioactifs et les activités pharmacologiques étudiées

II.1.2. Les métabolites secondaires

II.1.2.1.Definition

Les métabolites secondaires sont souvent spécifiques à certaines lignées végétales. Ils ne sont pas directement indispensables à la survie de la plante, mais jouent un rôle crucial dans les interactions avec l'environnement, qu'il soit biotique (autres organismes vivants) ou abiotique (facteurs physiques) **(Hartmann, 2007).**

II.1.2.2. Classification

Les métabolites secondaires d'origine végétale peuvent être classés en quatre classes différentes ; les composés phénoliques, les composés terpénoïdes,les alcaloïdes et lescomposés soufrés. La classificationest effectuée en fonction de leurstructure chimique,leurs cycles de sucre,leur composition,et leurs voies de synthèse **(Rassouli et al., 2017 ; Shahidi et Yeo, 2018).**

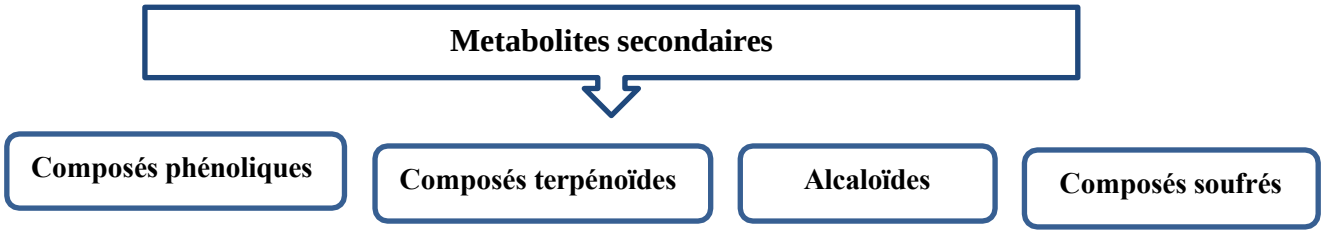


Figure 07 : Les principales classes de métabolitessecondaires

II.1.2.2.1. Les composés phénoliques

a)Définition

Les composés phénoliques (les polyphénols) sont des polyhydroxyphénols, dont la classe structurelle est composée principalement de composés existant naturellement. sont les métabolites secondaires naturels des plantes supérieures, qui jouent un rôle impératif dans les applications industrielles et thérapeutiques **(Rasouli et al., 2017 ; Singla et al.,2019)** et dont le poids moléculaire est d'environ 800 Daltons, qui leur permettent de traverser la membrane cellulaire. Les composés phénoliques peuvent parfois être de nature synthétique ou semi-synthétique. Ils ont les caractéristiques de multiples unités structurelles phénoliques, d'où leur nom de polyphénols **(Rassouli et al., 2017).**

b) Origine

Les composés phénoliques sont des composés phytochimiques naturels, largement répandus dans le règne végétal, ce qui les rend facilement accessibles à l'être humain par le biais de l'alimentation, notamment à travers les fruits, les boissons, les aliments transformés et autres denrées d'origine végétale.

CHAPITRE II : Les composés bioactifs et les activités pharmacologiques étudiées

Les composés phénoliques sont reconnus pour leur fort potentiel nutraceutique. Ils possèdent de nombreuses propriétés biologiques bénéfiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, ainsi que des effets protecteurs sur la peau, réducteurs de la pression artérielle, cardioprotecteurs et anticancéreux **(Tijjani et al., 2020).**

c) Classification

Les polyphénols sont des composés constitués d'un ou plusieurs cycles phénoliques liés entreeux par une structure intermédiaire. Ils sont classés en différentes sous-catégories selon leur mode d'action et leurs caractéristiques structurales. Parmi ces sous-groupes, on retrouve notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes, ainsi que d'autres types tels que les xanthones, les tanins et les anthraquinones **(Cheynier, 2012 ; Rasouli et al., 2017 ; Singla et al., 2019).**

c-1) Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés aromatiques portant un groupe carboxylique (-COOH). Ils constituent la principale classe de composés phénoliques d'origine végétale **(Shahidi et Yeo, 2018).**

On distingue notamment l'acide hydroxybenzoïque, de structure C6-C1, dérivé de l'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$), ainsi que l'acide hydroxycinnamique, appartenant à la classe des acides aromatiques C6-C3, dérivé de l'acide cinnamique **(Teixeira et al., 2013).**

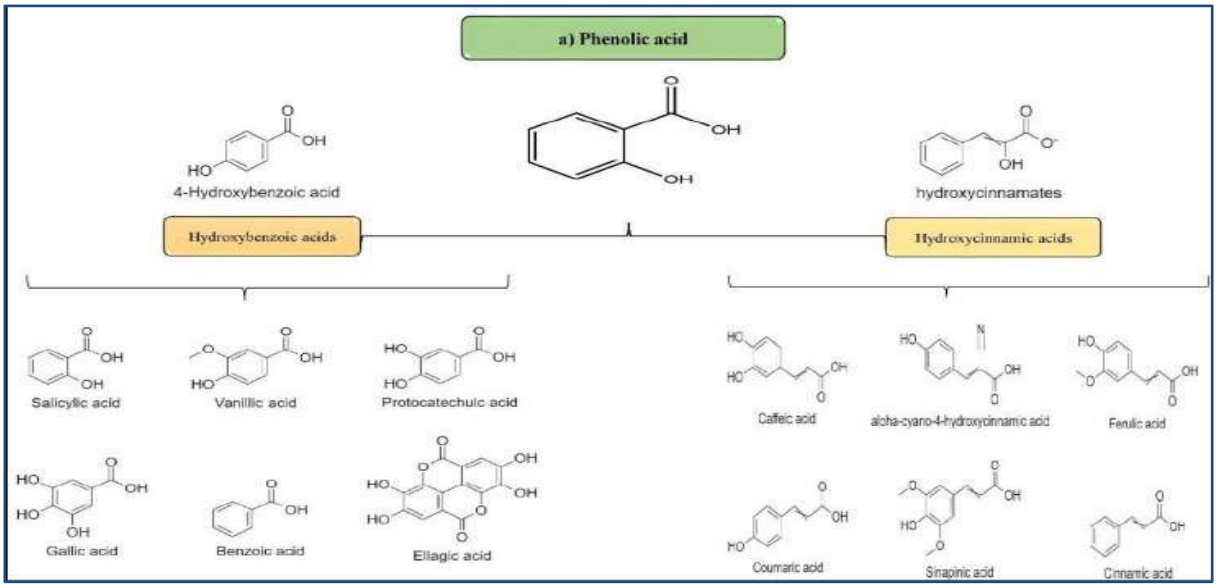


Figure 08 : Exemples des acides phénoliques **(Shweta et al., 2021)**.

c-2) Les flavonoides

Les flavonoïdes constituent une classe importante de composés phénoliques. Sur le plan structural, ils sont composés de 15 atomes de carbone répartis en deux cycles aromatiques reliés par une chaîne carbonée de trois atomes **(Harborne, 2013).**

Les flavonoïdes regroupant plusieurs sous-catégoriesen fonction de l'anneau C sur lequel l'anneau B est fixé, son configuration et son oxydation du cycle C. Parmi celles-ci figurent les flavones (comme la chrysine, l'apigénine et la baicaléine), les flavonols (tels que la quercétine et le kaempférol), les isoflavones (daidzéine, glycitéine), les flavan-3-ols (gallocatéchine, catéchine, épicatéchine), les flavanones (hespérétine, naringénine), ainsi que les anthocyanidines (delphinidine, péonidine, cyanidine, pélargonidine) **(Rasouli et al., 2017 ; Singla et al., 2019).**

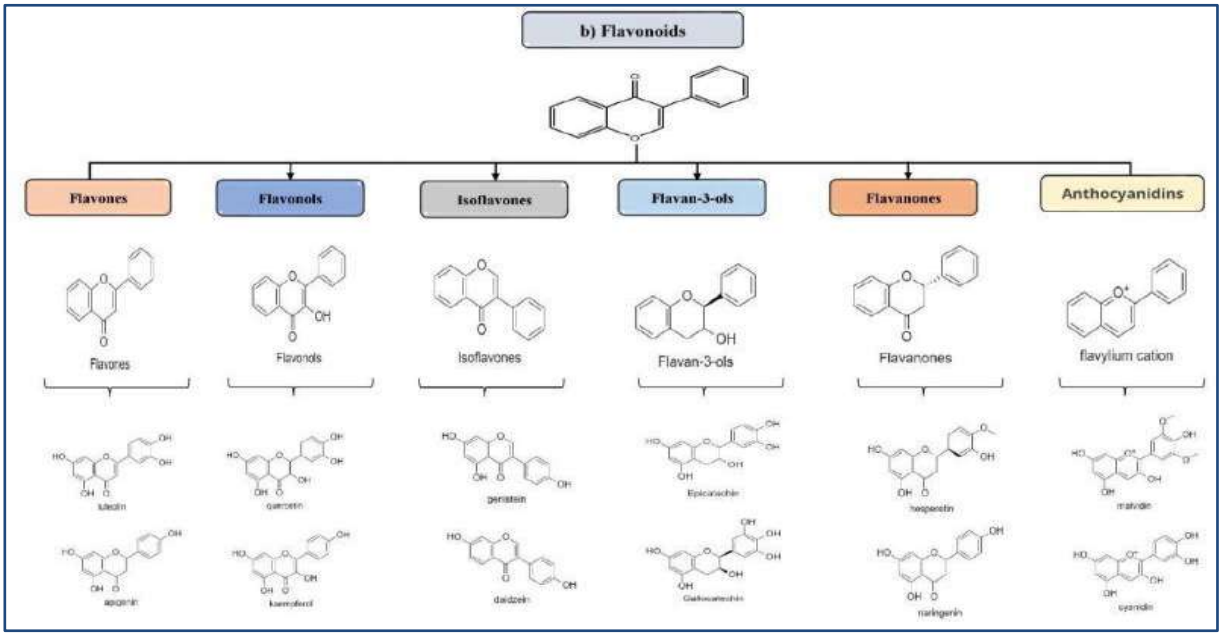


Figure 09 : Les différentes sous-catégories de flavonoïdes **(Shweta et al., 2021)**.

c-3) Les stilbènes

Les stilbènes ($C_{14}H_{12}$) représentent une catégorie de métabolites dérivés des composés phénoliques. Leur activité biologique et leurs effets bénéfiques sur la santé humaine suscitent un intérêt croissant et font l'objet de nombreuses recherches **(Shen et al., 2009).**

Les stilbènes sont des composés organiques à structure compacte, caractérisés par un noyau éthylénique central (–CH=CH–) relié à deux groupes phényles situés de part et d'autre de cette double liaison carbone-carbone **(Chou et al., 2018).**

c-4) Les lignanes

La lignine est un groupe de composés organiques complexes présent dans de nombreux tissus végétaux. Elle joue un rôle essentiel dans les plantes et les arbres en contribuant à la formation des parois cellulaires **(Popa et al., 2008),** leur conférant ainsi force et rigidité. Ce polymère hétérogène est formé à partir de quelques précurseurs spécifiques qui se réticulent selon différentes structures **(Singla et al., 2019).**

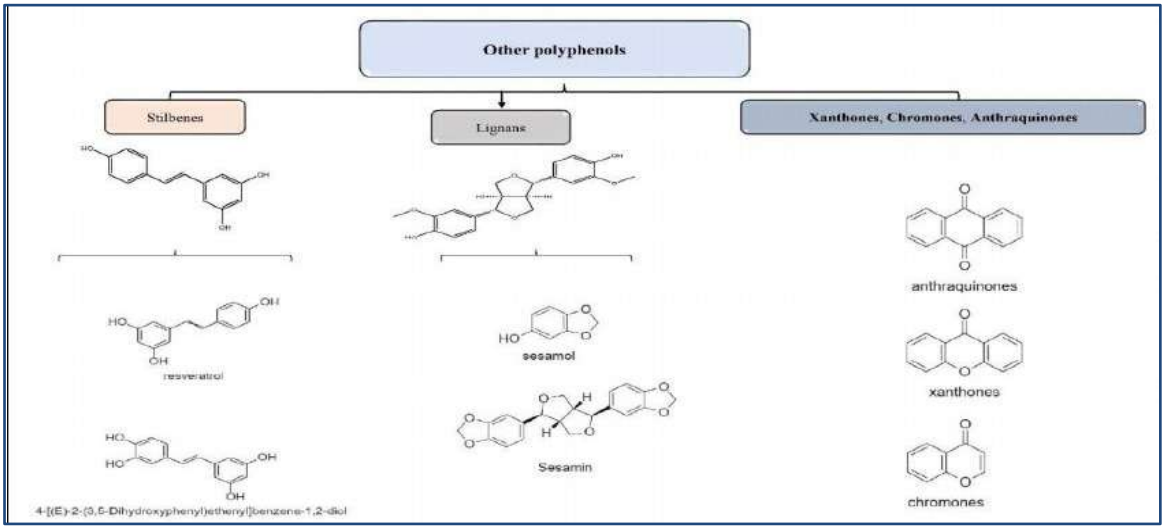


Figure 10 : Exemples de stilbene, lignane et autres types de polyphénols **(Shweta et al., 2021).**

c-5)Les coumarines

La coumarine résulte du métabolisme de la phénylalanine. Bien que sa valeur pharmacologique soit relativement limitée, les coumarines présentes dans les plantes renferment des phytoalexines, des composés impliqués dans la défense de la plante contre les agents pathogènes

Par ailleurs, la coumarine joue un rôle physiologique important, notamment en inhibant la germination des graines et l'élongation cellulaire. Elle stimule également l'enzyme indole acétique oxydase, intervenant dans la dégradation de l'auxine **(Bahaz et Rachdi, 2010).**

c-6) Les tanins

Les tanins sont des substances organiques que l'on retrouve dans de nombreuses espèces végétales, telles que l'eucalyptus. Utilisés dans plusieurs domaines, ils interviennent notamment dans le tannage du cuir, la fabrication de produits industriels, ainsi qu'en pharmacie. Le nom « tanin » provient de leur aptitude à transformer la peau animale en cuir par un procédé appelé tannage.

Ce sont des composés phénoliques astringents, solubles dans l'eau, largement répandus chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones. Chez les plantes

supérieures, on distingue généralement deux grandes catégories de tanins, différenciées par leur structure chimique et leur origine biogénétique **(Diouf et al., 2004).**

- ✓ **Les tanins hydrolysables**

Ce type de tanins inclut principalement l'acide gallique ainsi que des composés dérivés de la condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tanins peuvent être facilement dégradés (hydrolysés) en présence d'acides, de bases, d'enzymes ou encore d'eau chaude. Certains tanins hydrolysables ont été extraits de différentes parties des plantes, notamment des racines et de l'écorce **(Silva et al., 2000 ; Conrad et al., 2001).**

- ✓ **Les tanins condensés**

Aussi appelés proanthocyanidines ou procyanidines, ces tanins sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils se forment par polymérisation- par oxydation spontanée ou enzymatique- d'unités de flavan-3-ol et/ou de flavan-3,4-diol. Ces unités sont généralement reliées entre elles par des liaisons C4-C8 (ou parfois C4-C6), formant des proanthocyanidines de type B. Lorsque la liaison C4-C8 est accompagnée d'un lien éther supplémentaire entre les atomes C2 et C7, on parle alors de proanthocyanidines de type A **(Wollgast & Anklam, 2000 ; Dykes & Rooney, 2006).**

d) Rôle biologique

Les polyphénols jouent divers rôles biologiques, notamment en tant qu'antioxydants, piégeurs de radicaux libres, inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et chélateurs de métaux. Ils contribuent aux fonctions physiologiques, soutiennent la santé cardiovasculaire et possèdent des propriétés antimicrobiennes et antivirales, ce qui les rend essentiels au maintien de la santé globale **(Mondal et Kundu, 2024).**

II.1.2.2.2. Les huiles essentielles

a) Définition

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires d'origine végétale, caractérisés par leur nature lipophile, leur forte volatilité et leur faible masse moléculaire (généralement inférieure à 300). Elles peuvent être séparées physiquement des autres constituants végétaux ou des membranes cellulaires **(Protzen, 1993 ; Grassmann et Elstner, 2003 ; Schmidt, 2010 ; Sell, 2010).**

Communément appelées essences, ces substances volatiles et aromatiques sont extraites de différentes parties de la plante. Elles présentent un indice de réfraction élevé et une densité généralement inférieure à celle de l'eau, bien que certaines exceptions existent.

De plus, elles sont solubles dans les alcools et dans la majorité des solvants organiques **(Li Y et al., 2014).**

b) Classification

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques, dont la composition varie en fonction de l'espèce végétale, de son origine géographique et des conditions de culture. Ces composés appartiennent majoritairement à deux grandes familles issues de voies biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques. (Raut et al .2014)

b-1) Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent la classe dominante dans les huiles essentielles, notamment les formes les plus volatiles, telles que les monoterpènes et les sesquiterpènes, qui ont une masse moléculaire relativement faible. Ces composés peuvent porter différentes fonctions chimiques, avec un degré d'oxydation variable, donnant naissance à une grande diversité de substances **(Adorjan et al., 2010).**

- ✓ **Les monoterpènes**

Présents sous forme de carbures, ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Dans certaines huiles essentielles (comme celles d'agrumes ou de térébenthine), ils peuvent représenter plus de 90 % de la composition totale **(Pavela et al.,2015).**

- ✓ **Les sesquiterpènes**

Issus de l'allongement de la chaîne terpénique via le farnésyl diphosphate (FPP), les sesquiterpènes permettent une plus grande diversité structurale, notamment en termes de cyclisations. On a décrit plus d'une centaine de squelettes différents dans cette catégorie **(Pavela et al.,2015).**

b-2) Les composés aromatiques

Moins fréquents que les terpènes, les composés aromatiques présents dans les huiles essentielles sont dérivés du phénylpropane (structure C_6-C_3), formés d'un noyau aromatique couplé à une chaîne latérale de trois atomes de carbone. Bien qu'ils soient minoritaires, ces composés jouent souvent un rôle important dans l'arôme et les propriétés biologiques des huiles essentielles.De nombreuses plantes sont à l'origine de ces composés, bien que leur fréquence soit inférieure à celle des terpénoïdes **(Bakkali et al., 2008).**

c) Rôle biologique

Les huiles essentielles sont largement utilisées en médecine humaine pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. Elles possèdent notamment des activités

anticancéreuses, antinociceptives (antidouleur), anti-inflammatoires, antivirales, antibactériennes et antioxydantes **(Buchbauer, 2010).**

II.1.2.2.3. Les alcaloides

a)Définition

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels, majoritairement issus des plantes, caractérisés par une structure hétérocyclique contenant au moins un atome d'azote. De nature généralement basique et dotés de structures moléculaires complexes, ces substances se distinguent par leurs effets physiologiques puissants, même à très faibles concentrations **(Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007).**

b) Classification

Les alcaloïdes représentent un groupe majeur et particulièrement fascinant de métabolites secondaires, avec une diversité structurelle remarquable : entre 10 000 et 12 000 composés différents ont été identifiés à ce jour **(Roberts & Wink, 1999 ; Stöckigt et al., 2002).**

Sur le plan classification, ils sont répartis en trois principaux sous-groupes, en fonction de leur fréquence d'occurrence et de leur importance biologique : les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes tropaniques et les alcaloïdes quinoléiques **(Koné, 2009).**

c) Rôle biologique

Dans la majorité des cas, les alcaloïdes sont extraits des plantes à l'aide de solvants organiques polaires ou apolaires, d'eau acidifiée, ou encore de substances tensioactives, en combinaison avec des techniques d'extraction classiques ou modernes. Leur analyse repose sur des méthodes qualitatives et quantitatives telles que la spectrométrie UV, la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Grâce à leurs nombreuses propriétés biologiques, les extraits d'alcaloïdes sont largement exploités en thérapeutique, notamment pour leurs effets antioxydants, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, analgésiques et anticancéreux **(Koné, 2009).**

II.1.2.3. Les métabolites secondaires de l'espèce *Medicago sativa* L.

Selon la littérature, l'espèce *Medicago sativa* L. a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Ces recherches ont permis l'isolement de plusieurs classes de métabolites secondaires, notamment des flavonoïdes, les huiles essentielles ainsi que les saponines.

Tableau 09 : Composition chimique des huiles essentielles de *M.sativa L* (**Kami, 1983).**

Composants chimiques	*M. sativa*
Benzaldéhyde	4
Acétone	4
Ethanol	12
Diméthylsulfone	4
Acide acétique	8
Acétate d'éthyle	9
Caproate d'éthyle	1
Palmitate d'éthyle	3
Caprylate d'éthyle H	0.5
Acétate de trans-3-hexényle	0.7

Le tableau met en évidence la diversité des composés volatils présents dans les huiles essentielles de *Medicago sativa* L. (luzerne). Ces substances appartiennent à plusieurs classes chimiques, telles que les alcools, aldéhydes, acides, esters et cétones, ce qui reflète la richesse et la complexité biochimique de cette espèce. Une telle composition suggère que l'huile essentielle de luzerne présente un potentiel intéressant pour une valorisation dans divers domaines, notamment en agriculture et en phytothérapie.

Tableau 10 : Teneur en isoflavones d'espèce étudié du *M.sativa* L.

Espéces	**Partie utilisé**	**isoflavones**	**Extrait**		
			Aqueux	**Hydroalcoolique**	**Alcoolique**
M. sativa	Feuille	genistin	3.32±0.40	2.29±0.14	3.14±0.51
		Daidzéine	N.d	N.d	1.47±0.05
		Glycitéine	N.d	N.d	0.45±0.01
		Génistéine	N.d	N.d	0.93±0.13
		Formononétine	N.d	N.d	2.40±0.06
		Prunétine	N.d	N.d	N.d
		Biochanine	N.d	N.d	N.d
		Totale mg/kg/db	3.32	2.29	8.39

(Rodrigues et al, 2014).

N.d = Non détecté ; db = base sèche

Le tableau montre que les extraits alcooliques des feuilles de *Medicago sativa* présentent une plus grande diversité ainsi qu'une concentration plus élevée en isoflavones, comparativement aux extraits aqueux ou hydroalcooliques. Cette observation suggère que l'alcool constitue un solvant plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, en particulier des isoflavones. La génistine apparaît comme l'isoflavone majoritaire, tandis que d'autres, telles que la formononétine et la daidzéine, ne sont détectées que dans l'extrait

alcoolique. Ces résultats confirment le potentiel de la luzerne comme source de composés phytochimiques bioactifs, notamment à des fins nutritionnelles ou thérapeutiques.

Tableau 11 : Classes de flavonoïdes identifiées dans l'espece *Medicago sativa* .

Espèce	**Classe des flavonoïde**	**Flavonoïde identifié**	**Partie etudiee**	**Référence**
M. sativa	FLAVONE	4',7-Dihydroxyflavone	Feuilles	**(Deavours et al., 2005)**
		4',7 Dihydroxyflavone7 GlcGlc	Plante entière	**(Saleh et al,. 1982)**
		Apigenine 4'-O-[2'-O E-Fer- O- β -GlcAPyr (1→2)- O- β -GlcAPyr]	Parties aériennes	**(Goławska et al., 2010)**
		Apigénine 4'-O- β -D GlcAPyr		**(Stochmal et al., 2001) (Goławska et al., 2010)**
		Apigénine 7-O-β-D GlcAPyr	Parties aériennes	**(Stochmal et al., 2001)**
		Apigénine 7-O-[β -D GlcAPyr(1→2)-O-β-D GlcAPyr]-4'-O- β -D- GlcAPyr		
	FLAVONOL	Myricétine	Feuilles	**(LeRoy et al., 2002)**
		Quercétine	Graines	**(Prati et al., 2007)**
	FLAVANONE	Liquiritigénine	Feuilles Germe	**(Deavours et al., 2005) (Hong et al., 2011)**
	CHALCONE	Isoliquiritigénine	Feuilles Germe	**(Hong et al., 2011)**

D'après les résultats motionnés dans le tableau. On note que les études phytochimiques qui ont été réalisées sur Medicago. sativa sont permis d'isoler et d'identifier une variété des composés de flavonoïde (Chalcone, flavone, flavanone, flavonol).

Tableau 12 : Les saponines identifiées dans M.sativa L.

Espéce	Composés identifiés	Partie étudiée	Référence
M.sativa	Hédéragénine	Feuille s et racines	**(Timbekova ,et al ., 1993)**
	Bayogénine		**(Bialy et al., 1999)**
	Acide zanhique		**(Oleszek et al., 1992) (Bialy et al., 1999)**
	Acide médicagénique		**(Massiot G,et al., 1988)**
	Soyasapogénol B		**(Kitagawa I,et al.,1988)**
	Soyasapogénol E		**(Massiot et al., 1992)**
	Soyasapogénol A		**(Bialy Z, et al.,1999)**
	Acide 2β, 3β Dihydroxy-23-oxo olean-12en-28oic		**(Liu et al., 2019)**

D'après les résultats mentionnés dans le tableau, *Medicago sativa* L. (luzerne) est une plante riche en saponines, avec une grande diversité de composés identifiés dans ses feuilles et ses racines. Ces métabolites secondaires, tels que l'hédéragénine, les soyasapogénols ou encore l'acide médicagénique, présentent diverses propriétés biologiques d'intérêt, notamment des activités antimicrobiennes, antifongiques et hémolytiques.

II.2. Les activités pharmacologiques étudiées

L'évaluation des activités pharmacologiques joue un rôle crucial dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques, car elle permet de déterminer les mécanismes d'action, d'identifier les cibles biologiques et d'estimer le potentiel thérapeutique des composés analysés **(Bruneton, 1999).**

II.2.1. Activité antioxydant

II.2.1.1.Définition

L'activité antioxydante désigne la capacité d'un composé ou d'un extrait à piéger ou inhiber les radicaux libres ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), principaux responsables du stress oxydatif. Ce mécanisme joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les altérations induites par l'oxydation, lesquelles sont associées au vieillissement cellulaire et à diverses maladies chroniques, notamment les affections cardiovasculaires, les cancers et les troubles neurodégénératifs **(Prior, 2005).**

II.2.1.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du système antioxydant à les neutraliser **(Meda et al., 2013).** Ce déséquilibre peut résulter soit d'une diminution de l'efficacité des défenses antioxydantes, soit d'une surproduction de radicaux libres **(Orban, 2011).** Dans ce contexte,

le renforcement des mécanismes antioxydants de l'organisme apparaît comme une stratégie bénéfique pour limiter les effets néfastes du stress oxydatif **(Pastre, 2005).**

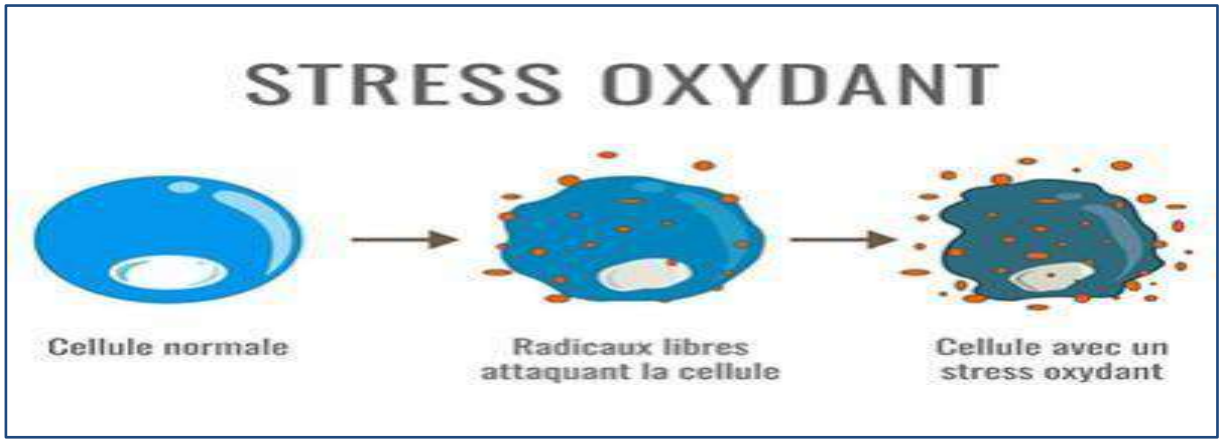


Figure 11: Le stress oxydant.

II.2.1.2.1. Les radicaux libres

a)Définition

Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments de molécules hautement réactifs, caractérisés par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbite externe **(Penna et al., 2009).** Cette instabilité électronique les pousse à capturer des électrons auprès de molécules voisines afin de retrouver un état stable, ce qui engendre l'oxydation de ces dernières et leur transformation en nouveaux radicaux libres **(Capasso, 2013).** Ce mécanisme auto-entretenu donne lieu à une réaction en chaîne potentiellement dommageable pour les structures cellulaires **(Lev et al., 2007).** En général, un radical libre possède une durée de vie très courte, comprise entre une microseconde et une nanoseconde **(Benaissa, 2012).**

b) Origine des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être générés à la fois par des mécanismes internes (endogènes) et par des facteurs externes (exogènes). Dans l'organisme, leur production naturelle se déroule au cours de divers processus biologiques, notamment la respiration cellulaire aérobie. Par ailleurs, plusieurs éléments extérieurs peuvent intensifier leur formation, tels que les infections microbiennes, l'activité physique excessive, ou encore

l'exposition à des agents toxiques comme la fumée de cigarette, l'alcool, les rayonnements ultraviolets, les pesticides et l'ozone. Une production excessive de radicaux libres peut entraîner des dommages cellulaires importants, et est impliquée dans le développement de nombreuses maladies **(Poljsak et Šuput, 2013).**

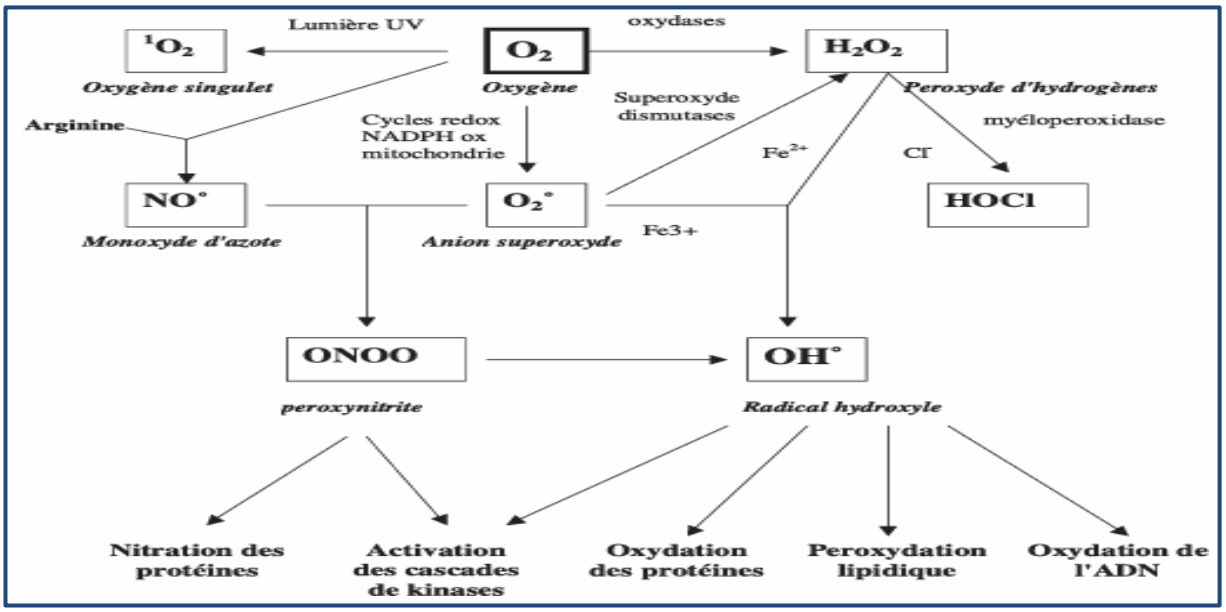


Figure 12: Origine des différents radicaux libres **(Moutaouakkil et al., 2024)**

c) Types des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui leur confère une grande réactivité. Cette réactivité est également modulée par des facteurs environnementaux qui influencent leur comportement et leur capacité à interagir avec d'autres molécules **(Delattre et al., 2005).** On les regroupe généralement en deux grandes catégories principales :

c-1)Lesespècesréactivesdel'oxygéne(ROS) radicalaire

Les espèces réactives de l'oxygène de nature radicalaire sont des molécules instables, caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend particulièrement réactives **(Hennebelle, 2006).**

c-2)Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) non radicalaire

Les espèces réactives de l'oxygène non radicalaires, à la différence des radicaux libres, ne contiennent pas d'électron non apparié. Elles sont généralement plus stables que les

ROS de nature radicalaire, ce qui les rend moins réactives, mais leur permet de se diffuser sur de plus longues distances à l'intérieur de la cellule. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus biologiques, notamment la signalisation cellulaire, les réponses inflammatoires et l'apoptose **(Belkheiri, 2010).**

Tableau 13: Liste de quelques espèces chimiques réactives **(Halliwell 2006).**

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
O_2^{-}• : Superoxyde	**H_2O_2** : Peroxyde d'hydrogène
ROO• : Radical peroxyle	**ROOH** : Peroxyde organique
OH• : Radical hydroxyle	**$ONOO^-$** : Peroxynitrite
RO• : Radical alkoxyle	**NO_3^-** : Nitrate
NO• : Oxyde nitrique	**NO_2Cl** : Chlorure de nitrile (ou nitryle)
NO_2• : Dioxyde d'azote (radical)	**ClO_2** : Dioxyde de chlore
$CO_3^{\bullet-}$: Radical carbonate	**HNO_2** : Acide nitreux

II.2.1.2.2. Les antioxydants

a)Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations inférieures à celles du substrat oxydable, retarde ou inhibe de manière significative l'oxydation de ce substrat **(Antolovich et al., 2002).** Ces antioxydants agissent principalement en interagissant directement avec les radicaux libres, en les « neutralisant » par une réaction de réduction **(Desmier, 2016).**

b) Types des antioxydants

Selon Desmier (2016), les antioxydants incluent une large variété de systèmes, qu'ils soient endogènes, enzymatiques ou non enzymatiques, ainsi que des substances exogènes telles que les polyphénols, les vitamines et les oligo-éléments.

b-1) Les antioxydants endogènes

✓ **Les antioxydants endogènes enzymatiques**

Chez les mammifères comme chez les plantes, les systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces incluent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la

glutathion peroxydase (GPx). La superoxyde dismutase joue un rôle essentiel en catalysant la conversion des ions superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. La catalase, localisée principalement dans les globules rouges et les peroxysomes, intervient ensuite pour décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Quant à la glutathion peroxydase, elle participe à la réduction des hydroperoxydes en oxydant un substrat réducteur, contribuant ainsi à l'élimination du peroxyde d'hydrogène et d'autres produits de l'oxydation lipidique **(Mariani et al., 2014).**

✓ **Les antioxydants endogènes non enzymatiques**

Les antioxydants endogènes non enzymatiques sont des composés naturellement synthétisés par l'organisme, jouant un rôle clé dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dans la prévention des dommages liés au stress oxydatif. Contrairement aux enzymes antioxydantes, ces molécules agissent directement en capturant les radicaux libres ou en interrompant les réactions en chaîne, telles que la peroxydation des lipides. Parmi les plus représentatifs figurent le glutathion (GSH)**,** un tripeptide soufré largement présent dans les cellules, ainsi que des substances telles que l'acide urique**,** la bilirubine**,** la coenzyme Q10 **et** certainesprotéines de chélation du fer (comme la ferritineet latransferrine), qui préviennent la formation de radicaux en complexant les ions métalliques libres.**(Sies, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2015).**

b-2) Les antioxydants exogènes

Les mécanismes de défense antioxydants provenant de sources externes, notamment les compléments nutritionnels, sont relativement plus simples à renforcer. Cependant, chez les personnes âgées particulièrement sensibles au stress oxydatif, l'absorption intestinale de ces composés peut s'avérer moins efficace. Ainsi, la protection contre les radicaux libres repose en grande partie sur l'apport combiné d'antioxydants issus de l'alimentation et de l'environnement. Ces antioxydants exogènes jouent un rôle fondamental en soutenant et en renforçant les systèmes de défense antioxydants endogènes de l'organisme **(Pastre, 2005).**

Selon Call et Frei (1999), certains antioxydants d'origine chimique, tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes ou encore les composés phénoliques, sont indispensables à la prévention des processus oxydatifs.

II.2.2. Activité antimicrobienne

II.2.2.1.Définition

L'activité antimicrobienne désigne l'aptitude d'un agent, qu'il soit d'origine naturelle ou synthétique, à empêcher la prolifération ou à éliminer des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les virus ou les parasites **(Podschun, 1998).**

CHAPITRE II : Les composés bioactifs et les activités pharmacologiques étudiées

II.2.2.2. Les microorganismes étudiés

a) Les Bactéries

a-1) *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une bactérie Gram négatif, encapsulée et immobile, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae.* Bien qu'elle fasse partie intégrante du microbiote intestinal humain, elle peut provoquer des infections nosocomiales sévères telles que des pneumonies, des infections urinaires, des septicémies ou des infections de plaies. Certaines souches se distinguent par leur multirésistance aux antibiotiques, notamment celles produisant des carbapénémases **(Podschun, 1998).**

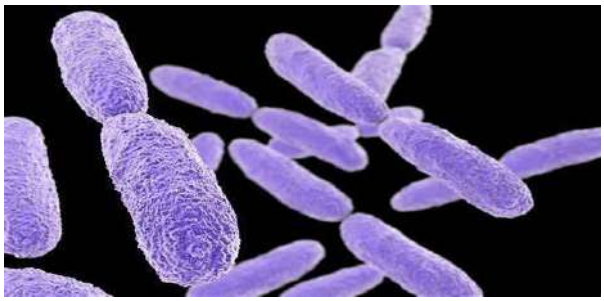


Figure 13: *Klebsiella pneumoniae.***(Podschun, 1998).**

a-2) *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, en forme de bacille, mobile grâce à un flagelle polaire. Elle est opportuniste et peut provoquer des infections nosocomiales graves, notamment chez les patients immunodéprimés ou atteints de maladies chroniques. Elle est connue pour sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et pour sa capacité à former des biofilms, rendant les infections difficiles à traiter **(Todar, 2020).**



Figure 14: *Pseudomonas aeruginosa* **(Todar, 2020).**

a-3) *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) est une bactérie à Gram négatif, en forme de bacille, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle vit normalement dans le tube digestif

des humains et des animaux, où elle joue un rôle bénéfique dans la digestion et la production de certaines vitamines. Toutefois, certaines souches peuvent devenir pathogènes et causer des infections urinaires, des gastro-entérites, voire des infections systémiques. Certaines souches entérohémorragiques produisent des toxines responsables de diarrhées sévères et de complications graves comme le syndrome hémolytique et urémique **(Tortora, 2020)**.

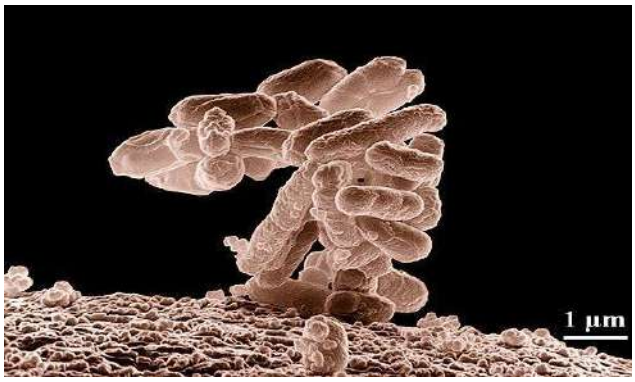


Figure 15: *Escherichia coli* **(Tortora, 2020)**.

a-4)*Salmonella enterica :*

Salmonella enterica est une bactérie Gram-négative, en forme de bacille, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est facultativement anaérobie, mobile grâce à des flagelles péritriches, et se retrouve principalement dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. Ce pathogène est responsable d'un large éventail de maladies, allant de la gastro-entérite bénigne à des infections systémiques sévères comme la fièvre typhoïde. **(Rabsch et al.,2001).**

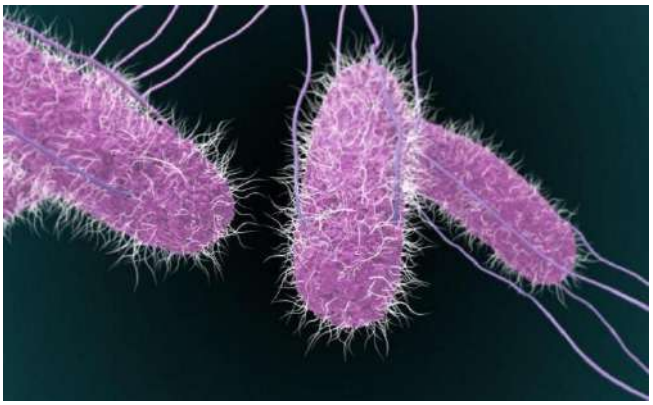


Figure16: *Salmonella enterica* **(Rabsch et al.,2001).**

a-5) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive, en forme de cocci, souvent disposée en amas ressemblant à des grappes de raisin. Elle fait partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses chez l'homme, mais peut devenir pathogène dans certaines

conditions. *S. aureus* est facultativement anaérobie, catalase positive, coagulase positive, et capable de produire de nombreuses toxines et enzymes qui contribuent à sa virulence.elle est responsable d'un large éventail d'infections, allant des infections cutanées bénignes (furoncles, impétigo) aux affections graves comme la pneumonie, la septicémie, l'endocardite, l'ostéomyélite, ou encore les intoxications alimentaires.**(*Lowy, 1998*).**

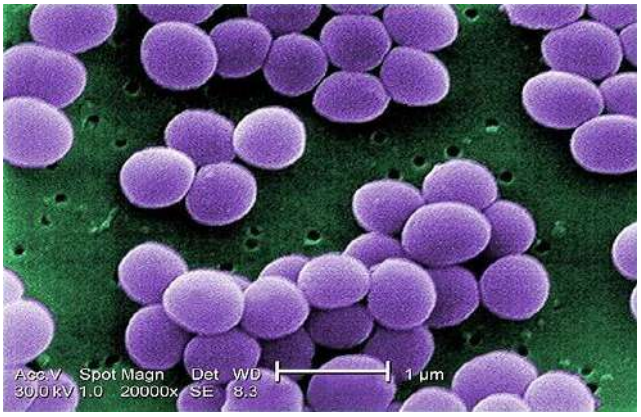


Figure 17 :*Staphylococcus aureus* **(*Lowy, 1998*).**

a-6)*Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie Gram positive, aérobie stricte, en forme de bâtonnet, appartenant à la famille des Bacillaceae. Elle est largement répandue dans la nature, notamment dans le sol et les environnements végétaux. Cette espèce est connue pour sa capacité à former des spores résistantes, lui permettant de survivre dans des conditions environnementales défavorables. *B. subtilis* est considérée comme non pathogène pour l'homme et est largement utilisée dans divers domaines, notamment en biotechnologie, en agriculture (comme agent de biocontrôle) et comme modèle d'étude en microbiologie en raison de sa simplicité génétique et de sa facilité de culture. ***(*Earl et al., 2008*).***

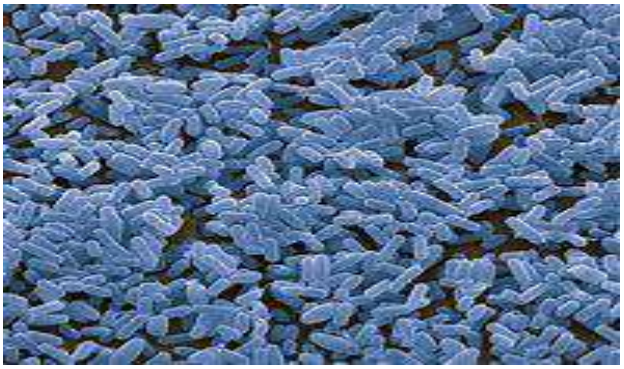


Figure18 : *Bacillus subtilis* ***(*Earl et al., 2008*).***

b) Les champignons

b-1)*Botrytis* sp.

Botrytis sp est un genre de champignons phytopathogènes appartenant à la famille des *Sclerotiniaceae*. Ces champignons provoquent des maladies appelées pourritures grises sur un grand nombre de plantes hôtes, notamment les cultures maraîchères, fruitières et ornementales. L'espèce la plus connue, Botrytis cinerea, est capable d'infecter plus de 200 espèces végétales. Ce champignon est un nécrotrophe, ce qui signifie qu'il tue les cellules végétales avant de s'en nourrir.***(*Dean et al., 2012*).***



Figure19 :*Botrytis* sp ***(*Dean et al., 2012*).***

b-2)*Alternaria* sp.

Alternaria sp. est un genre de champignons démycètes très répandus dans l'environnement, responsables de diverses maladies foliaires, notamment chez les plantes de la famille des Solanacées (comme la pomme de terre et la tomate). Ils provoquent des taches nécrotiques caractéristiques, souvent brunes à noires, et peuvent entraîner des pertes de rendement importantes. Certaines espèces comme Alternaria alternata sont également connues pour leur capacité à produire des mycotoxines **(.Nakashima , 2011).**

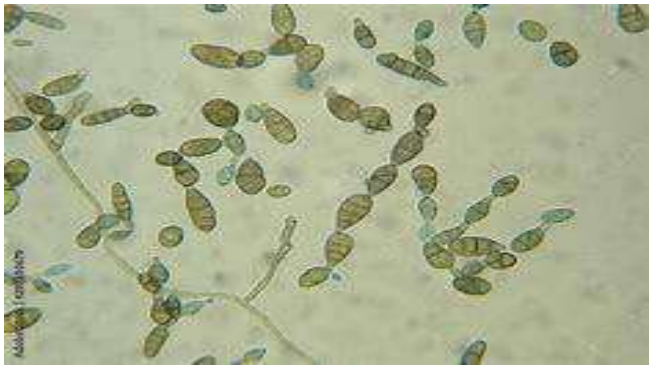


Figure 20:*Alternaria* sp **(.Nakashima , 2011).**

b-3)*Fusarium* spp.

Fusarium est un genre de champignons filamenteux appartenant à la division des Ascomycota, très répandu dans les sols, les résidus végétaux et les environnements agricoles.

Ces champignons sont surtout connus comme agents pathogènes des plantes, responsables de nombreuses maladies comme la fusariose, affectant les cultures de blé, maïs, banane, tomate, etc ,certaines espèces de *Fusarium* produisent des mycotoxines (comme la fumonisine, la trichothécène ou la zéaralénone) qui contaminent les denrées alimentaires et peuvent poser un risque pour la santé humaine et animale. **(*Summerell et al., 2010*)**

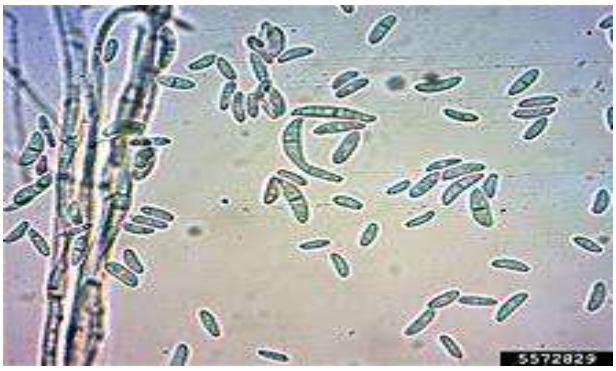


Figure 21 :*Fusarium* spp **(*Summerell et al., 2010*).**

II.2.2.3. Les antimicrobiens

Depuis l'antiquité, on connaît les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales et aromatiques. Il a néanmoins fallu attendre les premières années du 20ème siècle pour que les chercheurs commencent à porter de l'intérêt à ce sujet**. (Haddouche, 2008)** Une des méthodes fréquemment utilisées pour découvrir des substances biologiquement actives consiste à effectuer un criblage systématique sur les micro-organismes ou les plantes, qui constituent une riche source d'agents thérapeutiques bénéfiques. **(Sagdic et al., 2002).** En particulier, le potentiel antimicrobien des huiles et des extraits végétaux a constitué le fondement de nombreuses applications, y compris dans les domaines pharmaceutique, médical, de la thérapie naturelle et de la conservation.

a)Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés naturels, semi-synthétiques ou synthétiques qui ont la capacité d'arrêter la prolifération des bactéries ou de les éliminer. Ils sont spécifiquement utilisés pour combattre les infections bactériennes et n'ont aucun effet sur les virus. Leur classification se base sur leur mode d'action (inhibition de la paroi cellulaire, des protéines, de l'ADN, etc.)**(Lévy, 2016)**.

b) Les antimicrobiens d'origine végétale

Les antimicrobiens d'origine végétale sont des substances bioactives issues des plantes, dotées de la capacité d'inhiber la croissance ou de neutraliser des micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les champignons ou les virus. Parmi ces composés, on

retrouve notamment les huiles essentielles, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes et divers composés phénoliques, qui contribuent aux mécanismes de défense naturelle des plantes contre les agents infectieux. De multiples extraits issus de plantes ont démontré une activité antimicrobienne notable, ce qui les positionne comme des alternatives prometteuses face à la montée inquiétante de la résistance aux antibiotiques. Les mécanismes par lesquels ces composés agissent peuvent inclure la désorganisation des membranes cellulaires des micro-organismes, l'inhibition d'enzymes vitales à leur survie, ou encore des altérations de leur matériel génétique **(Cowan, 1999 ; Dzoyem et al., 2013).**

II.2.3. Activité antidiabétique

II.2.3.1.Définition

L'activité antidiabétique désigne la capacité d'une substance, naturelle ou synthétique, à prévenir, contrôler ou traiter le diabète en régulant la glycémie. Cette activité peut être exercée par des médicaments, des extraits de plantes ou des composés bioactifs qui agissent sur divers mécanismes physiopathologiques du diabète **(Bailey et al,. 2004).**

II.2.3.2. Les antidiabétiques

Les antidiabétiques désignent un ensemble de substances pharmacologiques ou naturelles destinées à réguler l'homéostasie glycémique chez les individus atteints de diabète sucré, en particulier le diabète de type 2.

Leurs modes d'action sont diversifiés, incluant notamment : la stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, l'amélioration de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, l'inhibition des enzymes impliquées dans la digestion des glucides, ainsi que la promotion de l'élimination rénale du glucose.

a)antidiabétiques médicamenteux: qui représentent des thérapeutiques pharmacologiques couramment prescrites pour la prise en charge du diabète sucré, en particulier du diabète de type 2. Ces agents sont généralement indiqués lorsque les mesures hygiéno-diététiques telles qu'une alimentation équilibrée et une activité physique régulière s'avèrent insuffisantes pour assurer un contrôle glycémique optimal.

b)Les antidiabétiques oraux (ADO) : sont exclusivement indiqués dans le traitement du diabète de type 2 (non insulinodépendant). Dans certains cas cliniques, ils peuvent être prescrits en association avec l'insulinothérapie afin d'optimiser le contrôle glycémique, bien que cette combinaison ne soit pas systématique.

II.2.4. Activités pharmacologiques rapportées chez l'espèce *Medicago sativa* L.

Medicago sativa L. est une plante traditionnellement utilisée dans plusieurs médecines populaires pour ses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. De nombreuses études ont mis

en évidence une diversité d'activités pharmacologiques, attribuées à sa richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, isoflavones, saponines, alcaloïdes, et composés phénoliques.

Tableau 14: Activités pharmacologiques rapportées chez l'espèce *Medicago sativa L.*

Activités pharmacologiques	
Activité antioxydante	Plusieurs travaux ont démontré que les extraits de *M. sativa* possèdent un fort pouvoir antioxydant, principalement dû à la présence de composés phénoliques et flavonoïdiques. Les tests DPPH et ABTS ont révélé une capacité notable à piéger les radicaux libres, en particulier dans les extraits à l'acétate d'éthyle et au butanol, ce qui confirme son potentiel dans la prévention du stress oxydatif et des maladies associées **(Di Mattia et al., 2009).**
Activité antidiabétique	L'activité inhibitrice de l'enzyme α-amylase par certains extraits de luzerne, notamment ceux à l'acétate d'éthyle, a été confirmée dans plusieurs études. Cette inhibition permet de ralentir la digestion des glucides et la libération de glucose, contribuant ainsi à une meilleure gestion de l'hyperglycémie postprandiale. L'efficacité de certains extraits est comparable à celle de l'acarbose, un antidiabétique de référence **(Sales et al., 2012).**
Activité antimicrobienne	Des essais in vitro ont montré que les extraits méthanoliques et butanoliques de *M. sativa* sont capables d'inhiber la croissance de certaines souches bactériennes et fongiques pathogènes, telles que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, et *Fusarium oxysporum*. Cette activité est en grande partie attribuée à la présence de saponines et de flavonoïdes aux propriétés antimicrobiennes connues **(Francis et al., 2002).**
Activité anti-inflammatoire	Les saponines et isoflavones de *M. sativa* présentent également des effets anti-inflammatoires par modulation des médiateurs de l'inflammation. Certaines études suggèrent que ces composés inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui pourrait expliquer leur utilisation traditionnelle contre les douleurs articulaires et les inflammations chroniques (**Kaur et al., 2010).**
Activité antifongique	Les glycosides de saponines, en particulier l'acide médicagénique-3-O-β-D-glucopyranoside, présentent une forte activité antifongique, notamment contre *Candida albicans* et *Cryptococcus* spp. Ces composés montrent également une faible cytotoxicité sur les fibroblastes. **(Houghton et al., 2006 ; Sadowska et al., 2014)**

CHAPITRE II : Les composés bioactifs et les activités pharmacologiques étudiées

Activités neuroprotectrices /anxiolytiques	Des effets neuroprotecteurs ont été confirmés chez la souris, notamment une action protectrice contre l'ischémie cérébrale et le stress oxydatif. Par ailleurs, l'extrait méthanolique de *M.sativa* a démontré une activité anxiolytique**.(Choi et al., 2013)**
Effets dermatologiques	L'extrait de *Medicago sativa* améliore la cicatrisation des brûlures induites par le NaOH chez le rat. Il augmente les niveaux de glutathion réduit (GSH) et diminue ceux du malondialdéhyde (MDA) dans les tissus lésés.**(Seguin et al., 2004)**

DEUXIEME PARTIE
PARTIE EXPERIMANTALE

Chapitre III :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est représenté par la plante *M.sativa L.* La récolte et l'identification de ses parties aériennes ont été effectuées à la fin du mois de Mai 2024, dans la région de Bir Rogaa, située dans la wilaya d'Oum El Bouaghi, par le professeur Rebbas Khalef, membre du laboratoire d'Agro-Biotechnologie et de Nutrition en Zones Arides de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret (Algérie). Après la récolte, les échantillons ont été soigneusement nettoyés pour éliminer les impuretés, puis séchés à l'ombre dans un endroit sec et bien ventilé pendant plusieurs jours. Une fois séchée, la plante a été broyée en une poudre fine et conservée jusqu'à son utilisation.



Figure 22: Représentation photographique dede différentes parties de l'espèce *M.sativa* L. **(Rebbas Khalef, 2024).**

III.1.2. Déscription de la région de récolte

Bir Rogaa (Oum El Bouaghi, Algérie) est un village et a d'environ 7 000 habitants. se trouve à proximité du village de Bir Ouanas,dans la wilaya d'Oum El Bouaghi .se caractérise par un semi-aridecontinental et des sols argilo-calcaires favorables à la croissance d'une flore variée, notamment des plantes médicinales et aromatiques. Cette zone des Hautes Plaines abrite une riche biodiversité végétale , utilisées traditionnellement par les populations locales pour leurs propriétés thérapeutiques.**(Ababsa et al,.2021) .**



Figure 23: Localisation géographique de la région de récolte.

III.1.3. Matériel du test de l'activité antimicrobienne

III.1.3.1. Les milieu de culture

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour la préparation de l'inoculum fongique ainsi que pour la réalisation des tests antifongiques. Le milieu GN (Gélosé Nutritive) a été employé pour la réactivation des souches bactériennes. L'inoculum bactérien a été préparé à l'aide d'eau distillée stérile. Enfin, le milieu MH (Müller-Hinton) a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

III.1.3.2. Les souches microbiennes

L'activité antimicrobienne de différents extraits de la partie aérienne de la plante *Medicago sativa* L. a été évaluée contre huit souches bactériennes, à la fois Gram positives et Gram négatives, ainsi que contre trois souches fongiques.

Les souches bactériennes testées comprennent : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876 , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* clinique, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiellapneumoniae* clinique, *Salmonella enterica* ATCC 14028 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En parallèle, trois souches fongiques ont également été utilisées : *Fusarium oxysporum* , *Alternaria* sp.et *Botrytis* sp.

Les souches cliniques ont été fournies par le laboratoire de l'hôpital Tidjani Haddam de Bir El Ater, Tebessa tandis que les souches de référence (ATCC) proviennent des

laboratoires de microbiologie et de mycologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation des extraits végétaux par macération

L'objectif de l'extraction à l'aide de différents solvants est de désorber les molécules d'intérêt fixées sur les sites actifs de la matrice végétale. Le choix du solvant influence directement la nature et la quantité des composés extraits.

La polarité du solvant joue un rôle déterminant dans la solubilité des composés phénoliques. Une solution à 70 % de méthanol est couramment utilisée pour l'extraction des flavonoïdes, notamment les catéchines, les épicatéchines, ainsi que des acides phénoliques, leurs dérivés et plusieurs autres sous-groupes de flavonoïdes **(Tabart et al., 2007 ; Al-Farsi et Lee, 2008).** Les solvants apolaires sont particulièrement recommandés pour l'extraction sélective des acides tanniques de haut poids moléculaire. De plus, les arômes dérivés des acides hydroxylés cinnamiques sont généralement extraits à l'aide de solvants apolaires tels que le chloroforme ou le diéthyléther **(Collin et Crouzet, 2011).**

Pour l'extraction expérimentale, 50 g de matière végétale ont été mis en contact avec 500 ml de solvant. Les solvants utilisés sont : le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol à 70 % et le n-butanol. L'extraction a été réalisée par macération, sous agitation continue, pendant trois jours, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les extraits obtenus ont été filtrés à l'aide de papier filtre, puis soumis à une filtration sous pression. Les filtrats ont ensuite été concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapeur). Les résidus secs ont été conservés à 4 °C dans des flacons en verre ambré, en vue d'une utilisation ultérieure.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

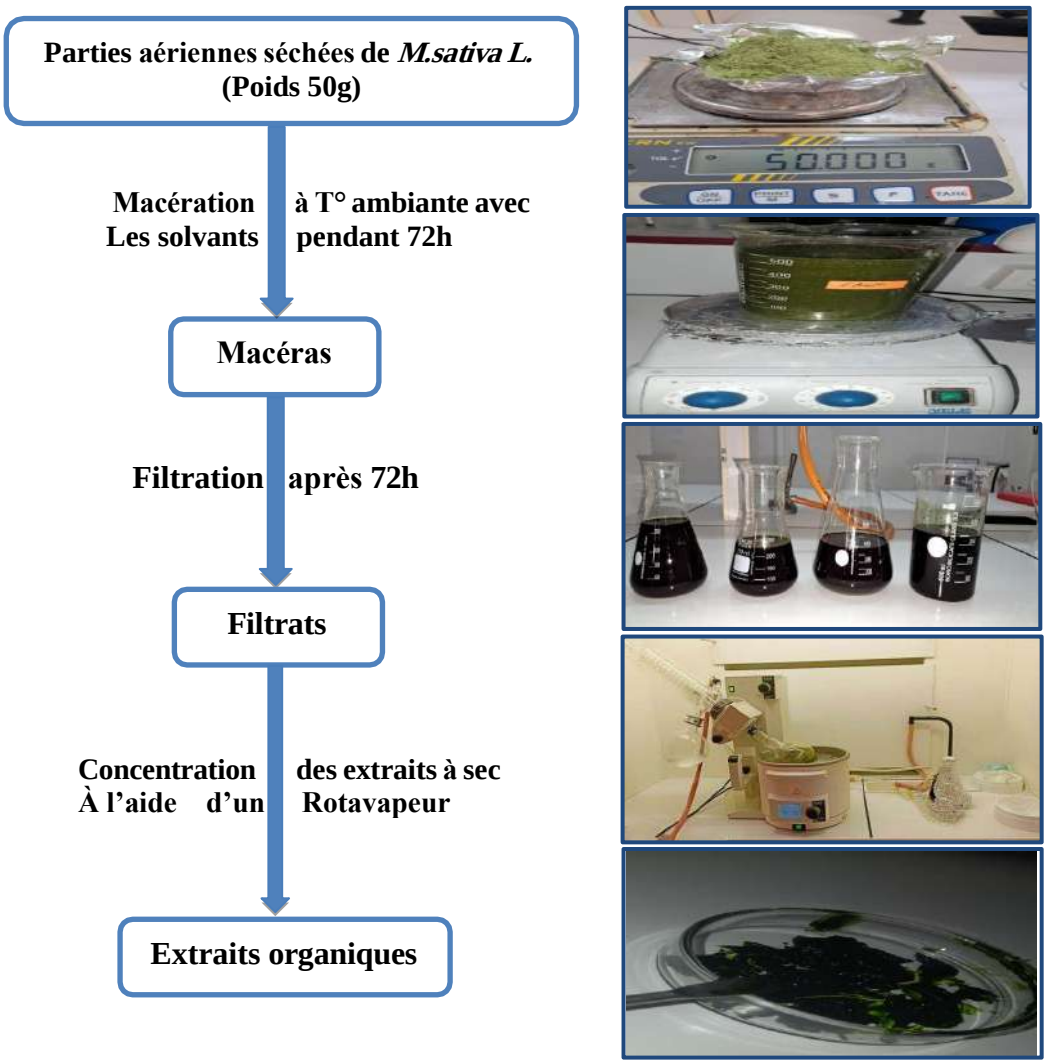


Figure 24: Schéma d'extraction.

III.2.2. Calcul de rendement d'extraction

Le rendement des extraits a été déterminé en fonction du poids total de la poudre de matière végétale utilisée. Exprimé en pourcentage (%), il représente le rapport entre la masse de l'extrait obtenu (PE) et celle de la plante sèche réduite en poudre (PP) **(Soro et al,.2009).**

Le rendement a été calculé à l'aide de la formule suivante : **R (%) = (PE / PP) × 100**

Où **PE** correspond au poids de l'extrait obtenu et **PP** au poids de la poudre végétale initialement utilisée.

III.2.3. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits végétaux de la plante *M.sativa L.* repose sur des protocoles scientifiques bien établis. Les deux méthodes utilisées sont :

III.2.3.1. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de différents extraits a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose, en utilisant le milieu MH .Cette méthode a été choisie pour sa simplicité, sa reproductibilité et sa fiabilité **(Balouiri et al., 2016 ; CLSI, 2012).**

a)Préparation de l'inoculum bactérienne

Les souches sélectionnées ont été réactivées sur gélose nutritive pendant 18 heures à 37 °Cafin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Par la suite, des suspensions bactériennes ont été préparées dans une solution saline stérile ou dans de l'eau distillée stérile, puis ajustées à une densité optique correspondant au standard 0,5 de McFarland (≈ $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

b) Ensemencement du milieu de culture

Le milieu Mueller-Hinton, après stérilisation, a été coulé dans des boîtes de Pétri. Une fois solidifié, chaque boîte a été uniformément ensemencée avec la suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon stérile, en effectuant des mouvements en croix afin d'assurer une couverture homogène. Le frottement de l'écouvillon sur la surface de la même boîte a été répété trois fois, en tournant celle-ci d'un angle de 60° à chaque passage.

c)Application des disques

Des disques d'antibiotiques vierges stériles, d'un diamètre de 6 mm, ont été placés à la surface de la gélose ensemencée. Ensuite, 20 µL d'extrait, dilué dans du DMSO à une concentration de 8 mg/mL, ont été déposés sur chaque disque. Les boîtes de Pétri ont été laissées à température ambiante pendant 15 minutes afin de permettre la diffusion des extraits. Trois disques de même concentration ont été placés dans chaque boîte, afin de garantir des conditions expérimentales comparables. Des disques imprégnés uniquement de DMSO ont servi de témoins négatifs, tandis que des disques contenant de la gentamicine, utilisée comme antibiotique de référence, ont été utilisés comme témoins positifs. Ces témoins ont été traités selon le même protocole que les disques contenant les extraits.

d) Incubation et lecture de résultats

Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant une durée de 24 heures. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres. La présence d'une zone claire autour du disque indique une activité antibactérienne, c'est-à-dire une absence de croissance bactérienne. Cette zone traduit la sensibilité des bactéries vis-à-vis des extraits testés.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

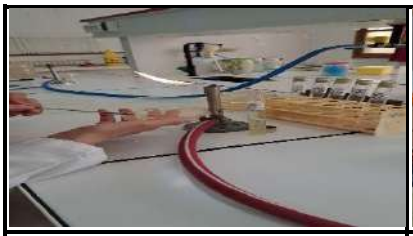
<table>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>1.Préparation des prés cultures</td><td>2.Préparation des suspensions bacteriennes</td><td>3 .Ecoulement des boites</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>4.Ensemencement des milieux</td><td>5.Application des disques</td><td>6. Incubation</td></tr>
</table>

Figure 25 : Les étapes de l'activité antibactérienne.

III.2.3.2. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique de différents extraits a été réalisée à l'aide de la méthode de contact direct, en utilisant le milieu PDA. Cette méthode a été retenue en raison de sa simplicité, de son efficacité et de sa reproductibilité dans la détection de l'effet inhibiteur des extraits sur la croissance mycélienne des champignons. La méthode utilisée est décrite par**(Senhaji et al,.2005)**avec certaines modifications.

a)Préparation du milieu de culture

La préparation du milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) a été réalisée à partir de 280 g de pommes de terre lavées, épluchées et coupées en fines tranches, mélangées à 1400 mL d'eau distillée. Le mélange a été porté à ébullition à 100 °C pendant 20 minutes. L'eau de cuisson, contenant les nutriments extraits des pommes de terre, a ensuite été récupérée par filtration. À ce filtrat, 27 g de dextrose ont été ajoutés sous agitation pendant 10 minutes, suivis de l'ajout de 21 g d'agar, toujours sous agitation, afin d'éviter toute précipitation ou début de solidification. Le mélange ainsi obtenu a été transféré dans des fioles Erlenmeyer, puis stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 2 heures et 30 minutes.

b)Préparation de l'inoculum fongique

Les souches fongiques sélectionnées ont été réactivées sur milieu PDA, puis incubées à une température de 28 °C pendant 7 jours, jusqu'à obtention d'un développement mycélien suffisant. Des suspensions sporales ont ensuite été préparées à partir des cultures matures en ajoutant de l'eau distillée stérile contenant 0,1 % de Tween 80, puis en homogénéisant et en filtrant la solution. La concentration de la suspension a été ajustée à environ 10^6 spores/mL.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

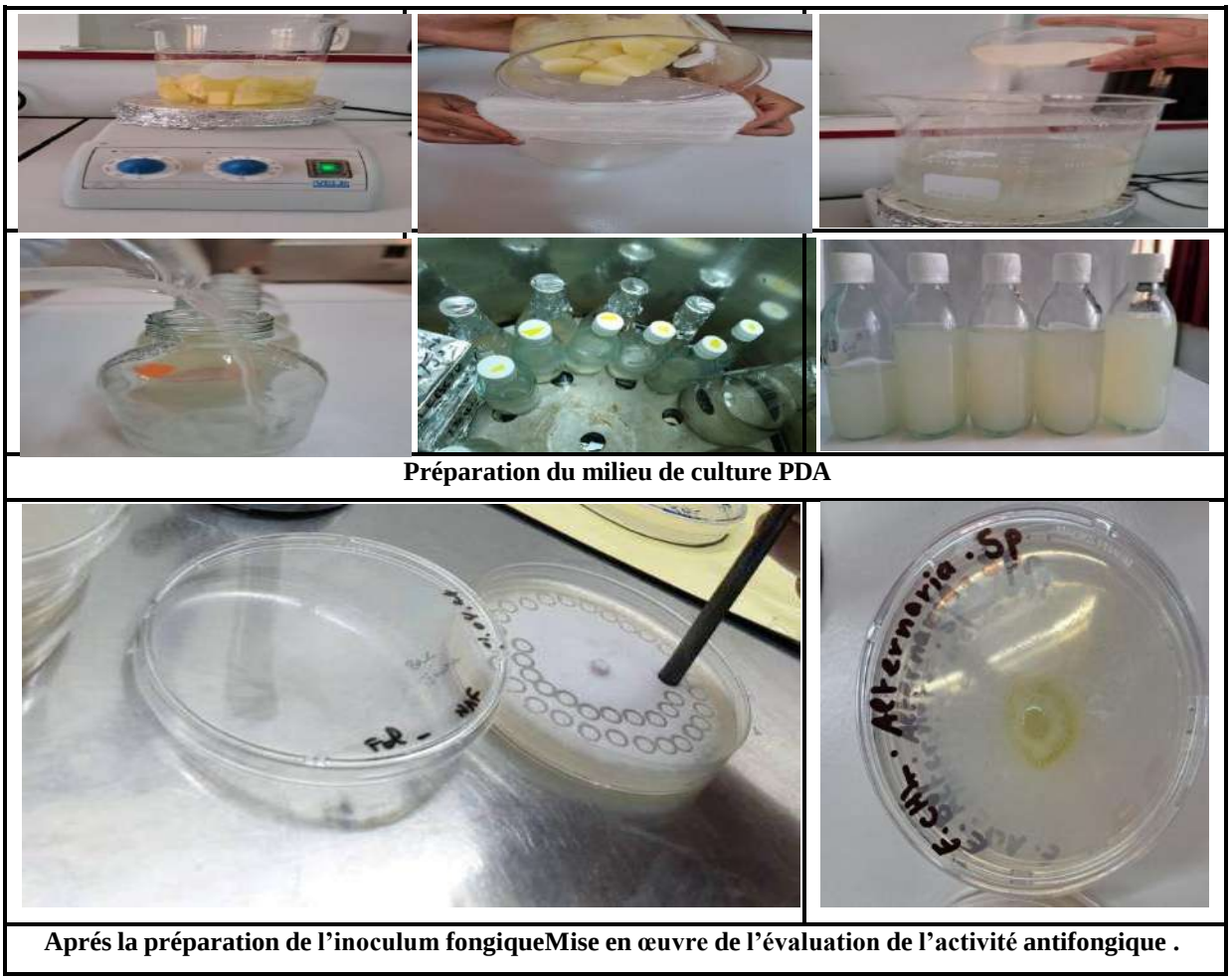
c)Mise en œuvre de l'évaluation de l'activité antifongique

Un disque mycélien de 6 mm de diamètre, prélevé à partir d'une culture fongique âgée de 7 jours, a été déposé de manière aseptique au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA solidifié. Par la suite, un volume de 35 µL d'extrait, préalablement dilué dans du DMSO, a été appliqué directement sur le disque fongique. Les boîtes ont ensuite été incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 heures. À l'issue de l'incubation, la croissance mycélienne a été mesurée en millimètres à l'aide d'une règle. Chaque test a été réalisé en triplicat pour chaque extrait et chaque souche fongique. Un témoin négatif a été préparé selon le même protocole, mais avec du DMSO pur à la place de l'extrait. L'activité antifongique est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule :

$$I = (D\ témoin - D\ test / D\ témoin) \times 100$$

D test : Diamètre de la croissance du champignon dans le test en mm

D témoin : Diamètre de la croissance du champignon dans le témoin en mm



Préparation du milieu de culture PDA

Aprés la préparation de l'inoculum fongiqueMise en œuvre de l'évaluation de l'activité antifongique .

Figure 26: Les étapes de l'activité antifongique.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

III.2.4. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante repose sur plusieurs méthodes complémentaires permettant de mesurer la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres ou à réduire des agents oxydants. Parmi les tests les plus couramment utilisés, on peut citer : le test DPPH, le test ABTS.

Dans notre étude, les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de la plante *Medicago sativa* L. sont les suivantes :

III.2.4.1. Le test DPPH

a)Principe de test

Le test DPPH repose sur la capacité des composés antioxydants à réduire le radical libre stable DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Ce radical, de couleur violette, est transformé en sa forme réduite DPPH-H, de couleur jaune pâle, à la suite d'un transfert d'atome d'hydrogène depuis l'antioxydant comme illustré à **la figure (27).** Cette réaction permet ainsi d'évaluer le pouvoir antioxydant des extraits **(Brand-william, 1995).**

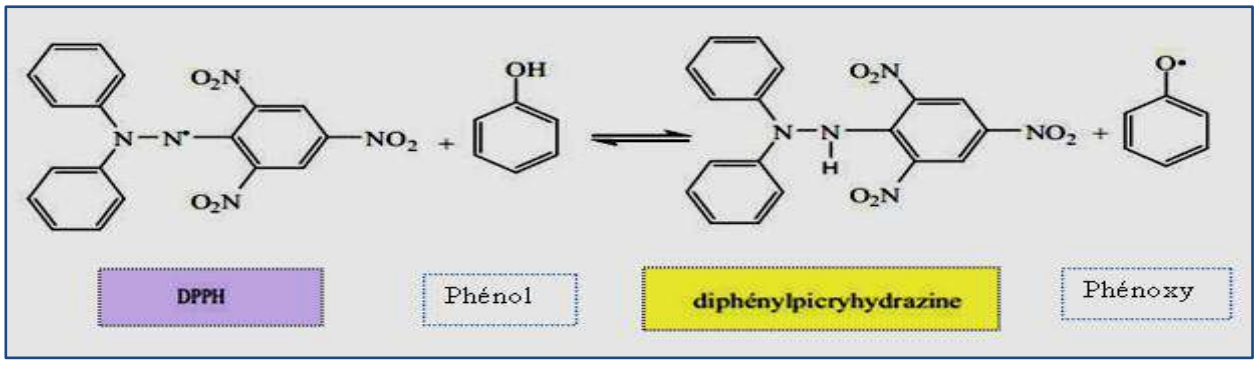


Figure 27 : Principe de test DPPH**(Molyneux, 2004).**

b) Protocole expérimentale

L'activité antioxydante des extraits de M.sativa L. par le test DPPH, a été réalisée selon la méthode décrite par **Blois (1958),** avec quelques modifications mineures adaptées au protocole expérimental.

Pour ce faire, un volume de 40 µL de chaque extrait, préparé à différentes concentrations, a été ajouté à une microplaque à 96 puits contenant 160 µL de solution de DPPH˙ dissoute dans du méthanol. La réaction a été incubée pendant 30 minutes à l'obscurité, afin de prévenir toute dégradation photochimique du radical. L'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Une solution de DPPH˙ sans ajout d'extrait a été utilisée comme témoin négatif.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

Le BHT (butylhydroxytoluène) et le BHA (butylhydroxyanisole) ont été utilisés comme standards de référence. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage d'inhibition, calculé selon la formule suivante :

I % = [(Abs C – Abs E) / Abs C] × 100où :

Abs C = Absorbance du contrôle (sans extrait),

Abs E = Absorbance de l'échantillon ou du standard

La concentration inhibitrice médiane (IC_{50})**,** correspondant à la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité radicalaire, a été déterminée à partir de la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations.

III.2.4.2. Le test ABTS

a) Principe de test

Le test ABTS repose sur la capacité des composés antioxydants à réduire le radical cationique $ABTS^{+\bullet}$ (acide 2,2′-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), un radical stable de couleur bleu-vert. En présence d'antioxydants, notamment des composés phénoliques, des thiols ou tout autre donneur d'électrons ou d'atomes d'hydrogène, le radical $ABTS^{+\bullet}$ est réduit en une forme non colorée, ABTS-H comme illustré à **la figure (28).**Cette diminution d'intensité colorimétrique reflète l'activité antioxydante du composé testé **(Re et al., 1999 ; Antolovich et al., 2002).**



Figure 28 : Principe de test ABTS **(Üstündaş, 2018) .**

b) Protocole expérimentale

L'activité antioxydante des extraits de *M.sativa* L. par le test ABTS, a été évaluée selon la méthode décrite par **Re et al. (1999)** avec quelques modifications mineures adaptées au protocole expérimental.

Pour ce faire, 160 µL de la solution d'$ABTS^{+\bullet}$ ont été ajoutés à 20 µL d'extrait de plante, préparé à différentes concentrations, dans une microplaque à 96 puits. Après une incubation de 10 minutes à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

Le BHT et le BHA ont été utilisés comme antioxydants de référence. Le pouvoir scavenger des extraits vis-à-vis du radical $ABTS^{+\bullet}$ a été exprimé en pourcentage d'inhibition, calculé selon la formule suivante :

I % = [(Abs C – Abs E) / Abs C] × 100 où :

Abs C = Absorbance du contrôle (sans extrait),

Abs E= Absorbance de l'échantillon ou du standard

L'activité antioxydante est exprimée par la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), qui correspond à la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité radicalaire. Cette valeur est déterminée à partir de la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations testées.

III.2.5. Méthode d'évaluation de l'activité antidiabétique

a) Principe de test

La méthode repose sur la capacité des extraits à inhiber l'activité de l'enzyme α-amylase, impliquée dans l'hydrolyse de l'amidon en sucres réducteurs. En absence d'inhibiteur, l'action de l'α-amylase sur l'amidon entraîne la libération de maltose, détectable par une coloration brun-jaune en présence du réactif IKI (iode/iodure). Lorsqu'un composé inhibiteur est présent, la production de maltose est réduite, ce qui se traduit par une baisse de l'intensité colorimétrique, mesurée par une diminution de l'absorbance à 630 nm

(Layer et al., 1987).

b) Protocole expérimentale

L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été évaluée selon un protocole adapté de la méthode de **Bernfeld (1955),** avec quelques modifications. Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 50 µL d'une solution d'α-amylase (1 U/mL) sont incubés avec 25 µL d'extrait à différentes concentrations, pendant 20 minutes à 37 °C. Ensuite, 50 µL d'une solution d'amidon à 1 % sont ajoutés, suivis d'une seconde incubation de 10 minutes à la même température.La réaction est arrêtée par l'ajout de 25 µL d'acide chlorhydrique (HCl), puis 100 µL du réactif IKI (iode/iodure de potassium) sont ajoutés pour détecter l'amidon résiduel non hydrolysé. L'absorbance est mesurée à 630 nm. Un témoin contenant tous les réactifs sauf l'extrait sert de contrôle négatif.

L'acarbose est utilisée comme contrôle positif selon le même protocole. L'inhibition de l'α-amylase est calculée en pourcentage à l'aide de l'équation suivante :

% d'inhibition= (Abs C−Abs E) Abs controle×100

Où : **Abs C** = Absorbance du contrôle (sans extrait) (Enzyme + Substrat + Solvant de l'extrait)

CHAPITRE III :Matériels et Méthodes

Abs E = Absorbance de l'échantillon ou du standard

L'activité antidiabétique est exprimée par la valeur d'IC_{50}, qui correspond à la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique. Cette valeur est déterminée à partir de la courbe dose-réponse représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations testées.

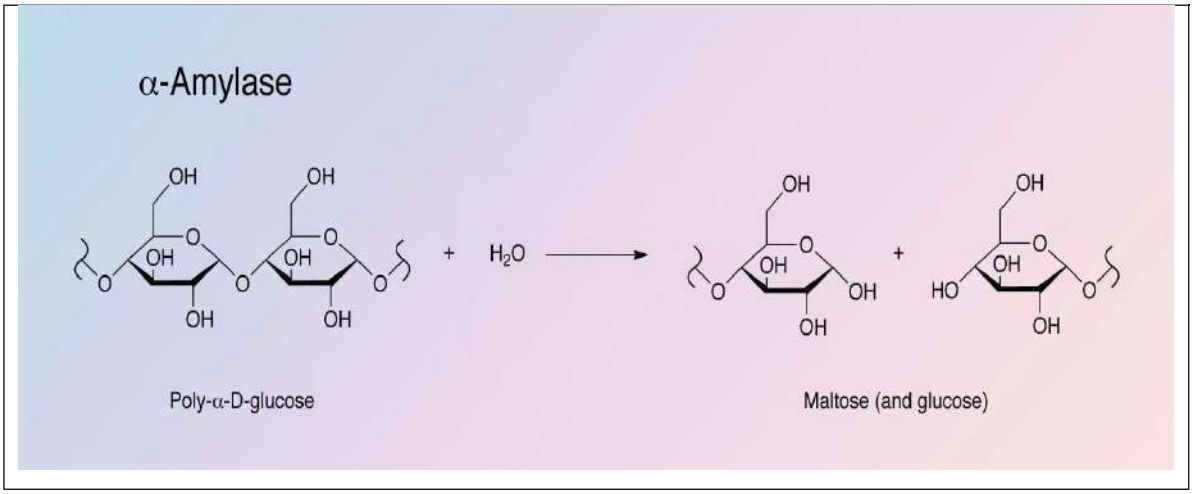


Figure 29: Principe de l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase **Bernfeld (1955).**

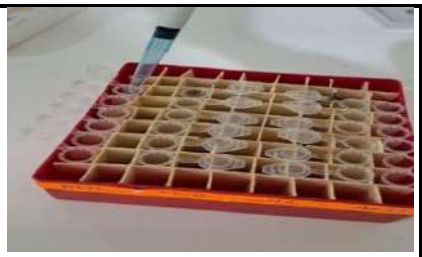
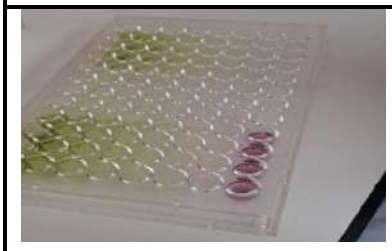
		
1.Préparation des Extraits	**2.Préparation des dilitions**	**3 . L'ajoutde methanol dans les puits**
		
4.L'ajout de l'extrait	**5.L'ajoutde du réactif IKI**	**6. Incubation**

Figure 30: Les étapes de l'activité antioxydante .

CHAPITRE IV :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV :Résultats et discussion

IV.1. Le rendement d'extraction

La poudre de la partie aérienne de la plante étudiée, *Medicago sativa*, récoltée à Oum El Bouaghi, a été soumise à une extraction par macération simple à l'aide de solvants de polarités croissantes. Les pourcentages massiques des extraits bruts méthanolique, n-butanolique, chloroformique et d'acétate d'éthyle issus de cette plante sont présentés dans le tableau (15).

Tableau 15 : Rendements des divers d'extraits de *M.sativa* L. en pourcentage par rapport au poids total.

Extrait testé	Extrait Chloroformique	Extrait acétate D'éthyle	Extrait n-butanolique	Extrait méthanolique
Rendement d'extraction en %	1.27	1.31	1.97	7.64

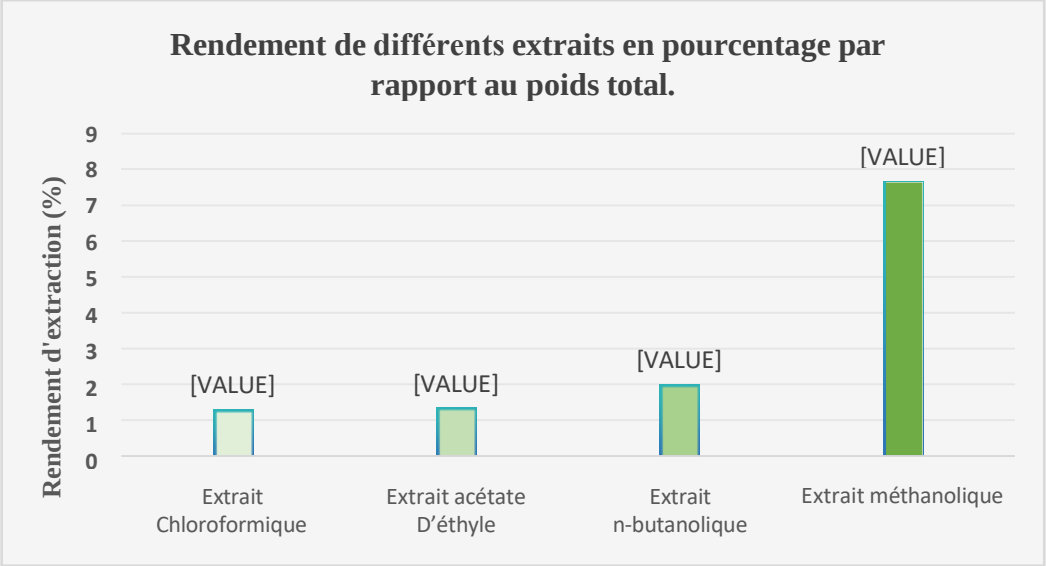


Figure 31 : Comparaison du rendement d'extraction de divers extraits de *M.sativa L.*

L'analyse des résultats présentés dans la figure (31) met en évidence une variation notable des rendements d'extraction des différents extraits de la plante *Medicago sativa* L. Le rendement le plus élevé est observé avec l'extrait méthanolique, atteignant 7,64 %, ce qui reflète la forte solubilité des composés polaires majoritairement présents dans la plante, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, etc. L'extrait n-butanolique présente un rendement intermédiaire de 1,97 %, tandis que les extraits d'acétate d'éthyle et de chloroforme affichent des rendements plus faibles, respectivement 1,31 % et 1,27 %. Ces différences peuvent être attribuées à la polarité plus modérée de ces solvants, qui limite leur capacité à extraire efficacement les métabolites secondaires polaires prédominants dans *M. sativa L.*

Les données mettent ainsi en évidence l'impact déterminant de la polarité du solvant sur l'efficacité d'extraction. Les solvants polaires, tels que le méthanol, le n-butanol et l'acétate d'éthyle, montrent des rendements supérieurs comparés au chloroforme, un solvant apolaire.

Le rendement élevé obtenu avec le méthanol aqueux (70%)peut s'expliquer par le fait que l'eau, fortement polaire, est capable d'extraire une large gamme de molécules, incluant non seulement des composés phénoliques, mais aussi une quantité significative de composés non phénoliques tels que les protéines et les glucides **(Bonnaillie et al., 2012).**

Par ailleurs, le rendement d'extraction ne dépend pas uniquement du choix du solvant. Des études récentes soulignent l'influence de multiples paramètres, notamment le protocole d'extraction (température, durée), la variabilité génétique des plantes, les stress environnementaux subis lors de la croissance, ainsi que les méthodes de conservation post-récolte **(Gupta & Verma, 2020).** Ces facteurs modulent non seulement la quantité de métabolites extraits, mais également leur profil chimique, ce qui peut influencer directement leurs propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante ou antimicrobienne **(Wang et al., 2019).** Une standardisation rigoureuse de ces variables s'avère donc essentielle pour garantir la reproductibilité des activités biologiques mesurées **(Alara et al., 2021).**

IV.2. Résultats des activités pharmacologiques

IV.2.1. L'activité antimicrobienne

IV.2.1.1. L'activité antibactérienne

Les résultats du test de sensibilité bactérienne aux divers extraits organiques de la partie aérienne de *Medicago sativa* L. sont présentés dans le Tableau (16) et les Figures (32,33,34,35,36).

Ce test a été réalisé par la méthode d'ensemencement en surface sur milieu solide, et les valeurs obtenues correspondent à la moyenne de trois mesures.

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique vierge imprégné d'extrait organique tété. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la bibliographie, nous avons considéré qu'un extrait a un effet antibactérien élevé si son diamètre d'inhibition est supérieur à 13mm, un effet intermédiaires son diamètre d'inhibition compris entre 6mm et 13mm, et un effet nul si son diamètre d'inhibition est inférieur de 6mm **(De Billerbeck, 2007).**

CHAPITRE IV :Résultats et discussion

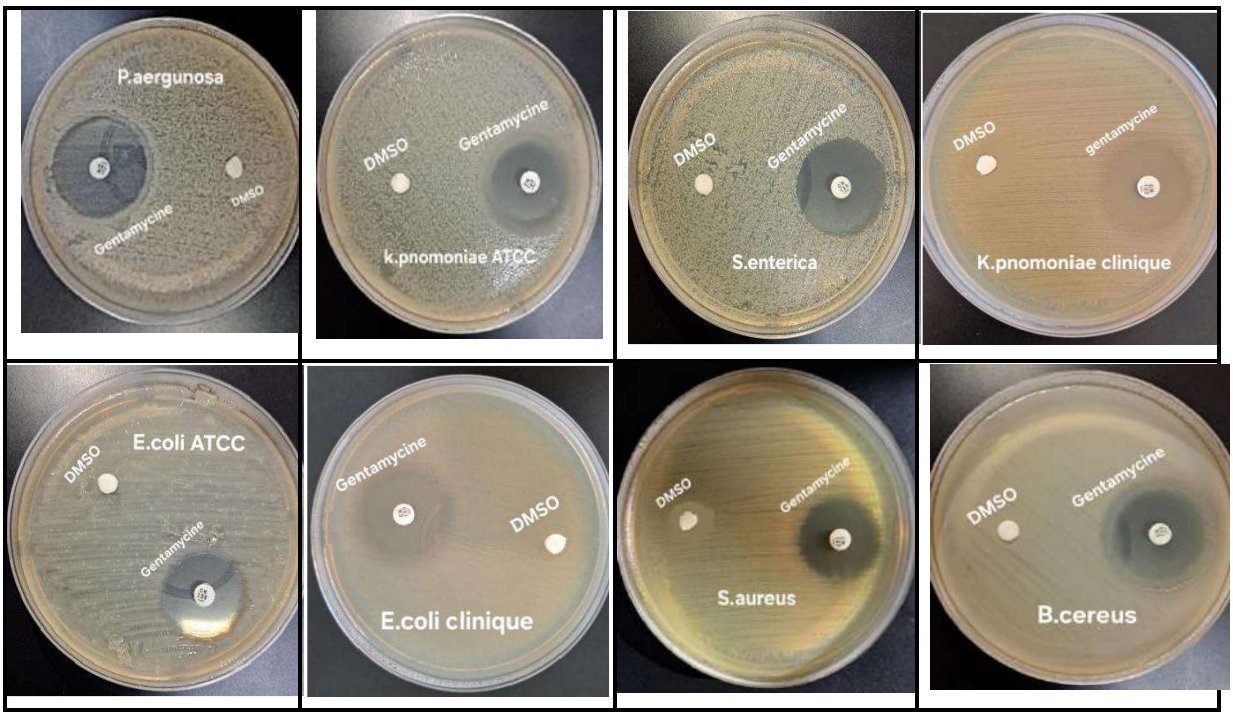


Figure 32 : Photographies illustrant l'effet de la gentamicine et du DMSO sur la croissance des souches bactériennes testées.

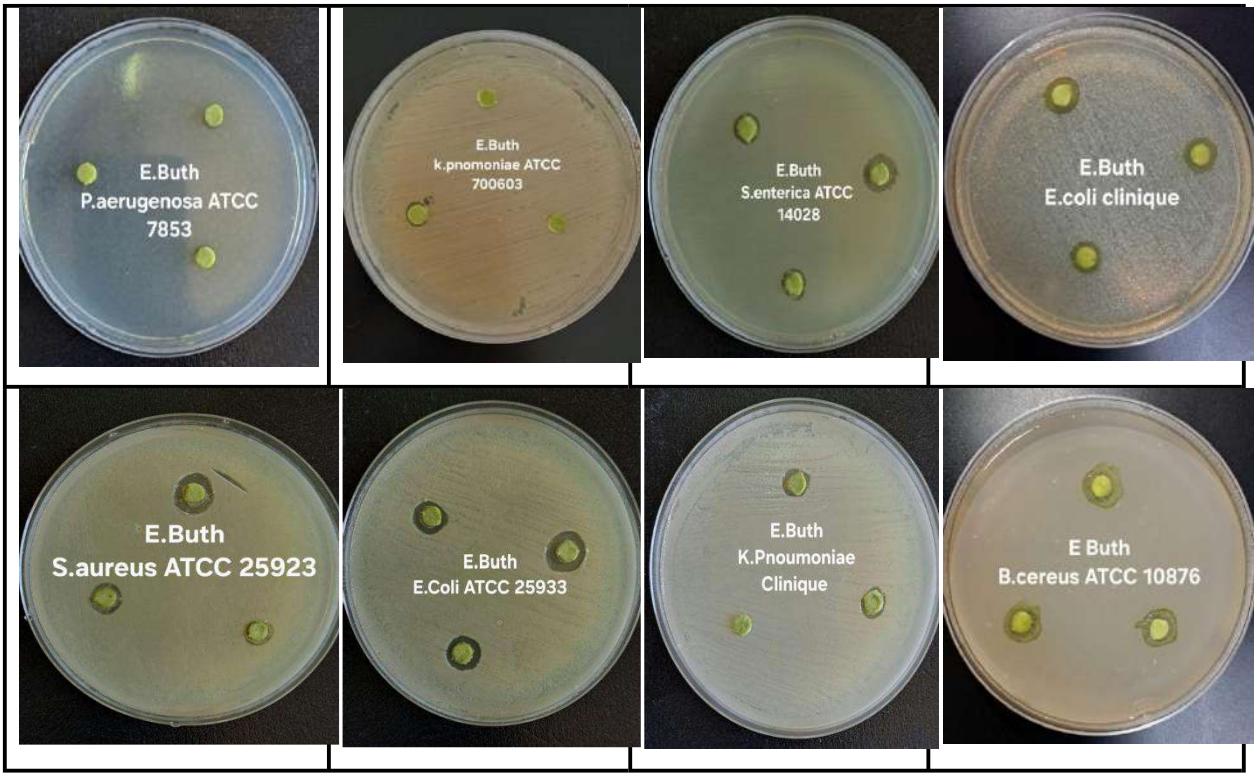


Figure 33 : Photographies illustrant l'effet de l'EBuOH de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.

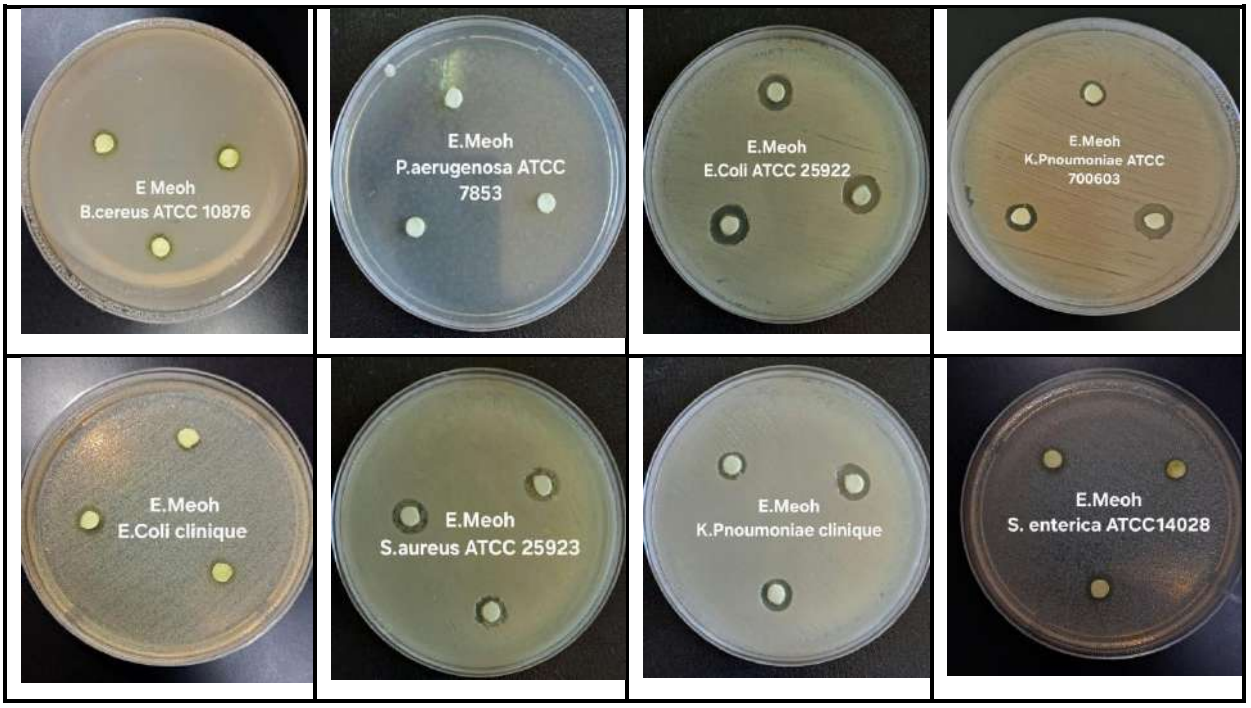


Figure 34 : Photographies illustrant l'effet de l'EMeOH de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.

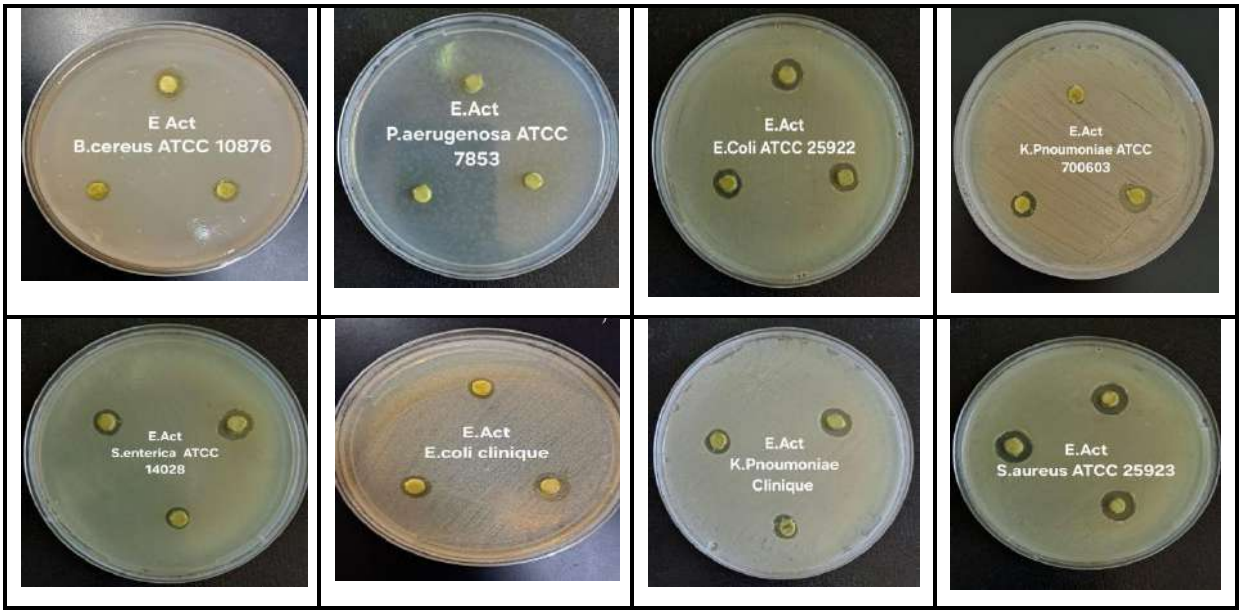


Figure 35 : Photographies illustrant l'effet de l'EAcE de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.

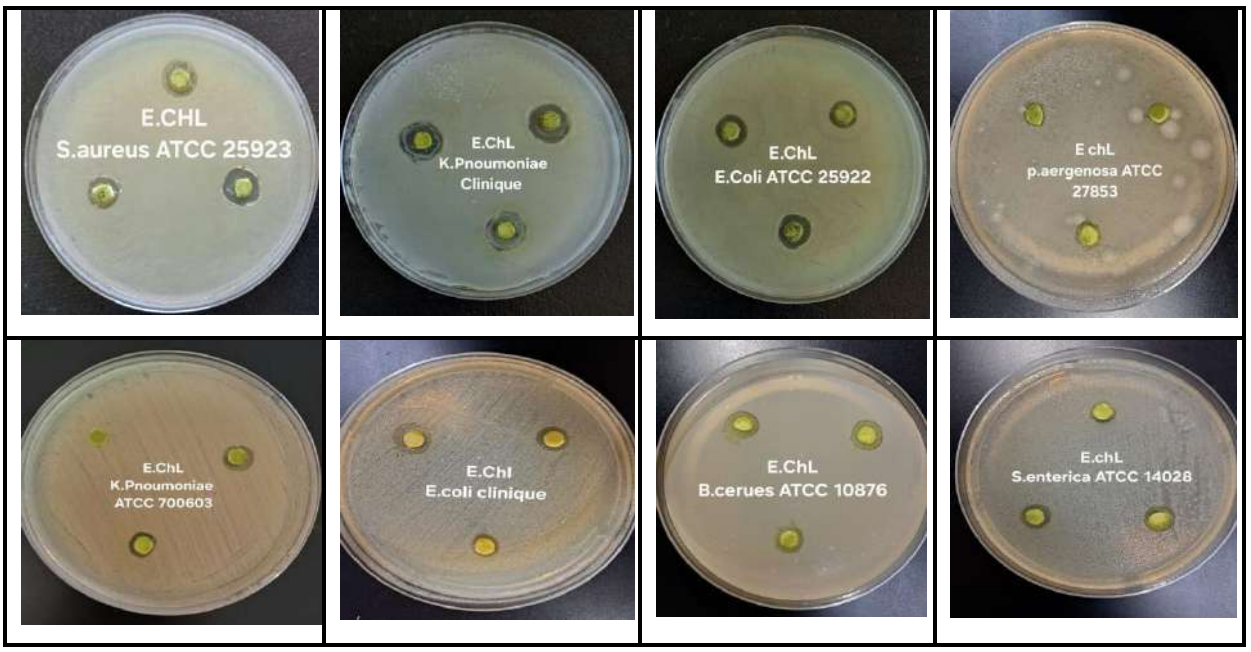


Figure 36 : Photographies illustrant l'effet de l'de l'EChL de *M.sativa L*. sur la croissance des souches bactériennes testées.

Tableau 16: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne induite par différents extraits de la partie aérienne de *Medicago sativa L*.

Souches Testées/ Extraits testés	**Diamètres des zones d'inhibition en mm**							
	Bactérie Gram négatif						**BactérieGram positif**	
	***K.p* ATCC 27853**	***K.p* clinique**	***E.c* ATCC 25922**	***E.c* clinique**	***P.a* ATCC 27853**	***S.e* ATCC 14028**	***S.a* ATCC 25923**	***B.s* ATCC 10876**
EBuOH	7.00±0.57	07.70±0.57	10.67±0.57	10.67±1.15	09.67±0.57	09.33±0.57	09.67±2.08	**11.67**±0.57
EMeOH	09.33±1.53	10.33±1.53	08.33±01.0	**11.67**±0.57	09.00±1.00	**12.00**±1.00	10.67±0.57	10.67±0.57
EAcE	09.33±2.52	09.70±01.0	10.67±1.52	11.00±00	09.67±1.00	10.67±1.15	**12.00**±0.00	09.00±2.52
EChL	07.00±1.53	**13.00**±0.00	10.00±01.0	11.33±0.57	08.33±1.00	09.00±2.00	**11.67**±4.93	08.33±0.57
GN	25.00±0.57	25.00±1.00	29.00±0.57	28.00±0.57	30.00±1.00	28.00±0.57	25.00±1.00	25.00±1.00
DMSO	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00

EBuOH(Extrait n-butanolique), **EMeOH**(Extrait méthanolique), **EAcE(**Extrait acétate d'ethyle), **EChL** (Extrtait chloroformique)**, *K.p*** *(Klebseilla pneumonea),* ***E.c*** *(Escherichia coli),* ***P.a*** *(Pseudomonas aerugenosa),* ***S.e*** *(Salmonella enterica),* ***B.s****(Bacillus subtilis),***GN**(Gentamycine) : control positif , **DMSO** : control négatif

Les résultats du tableau révèlent que les extraits organiques issus de la partie aérienne de *Medicago sativa* L. présentent une activité antibactérienne variable, influencée à la fois par le solvant d'extraction et par la souche bactérienne testée.

L'extrait méthanolique (EMeOH) s'est distingué par une inhibition notable sur plusieurs souches, notamment *Escherichia coli* clinique (11,67 ± 0,57 mm), *Salmonella enterica* (12,00 ± 1,00 mm) et *Bacillus subtilis* (10,67 ± 0,57 mm), traduisant une activité antibactérienne modérée. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Cowan (1999) et Poole (2001),** qui attribuent l'effet antimicrobien du genre *Medicago* à la présence de

flavonoïdes, saponines et tanins. D'autres études mentionnent également des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 11 et 37 µg/mL pour *E. coli* et *P. aeruginosa* dans des extraits méthanoliques de *M. sativa*, soulignant l'intérêt de ce solvant pour l'extraction des principes actifs. (**Cowan,1999).**

L'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcE) a montré une activité comparable contre *E. coli* clinique (11,00 mm) et *S. enterica* (10,67 mm), ce qui est en accord avec les travaux de **Mansouri et al. (2015),** ayant mis en évidence l'efficacité de cet extrait sur des bactéries à Gram positif et négatif. Cela suggère un rôle potentiel des composés semi-polaires dans l'activité antimicrobienne.

Un résultat particulièrement intéressant concerne l'extrait chloroformique (EChL), qui a présenté la meilleure inhibition contre la souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* (13,00 mm). Cette activité pourrait être liée à des composés lipophiles extraits par le chloroforme, susceptibles d'interagir efficacement avec les membranes des bactéries à Gram négatif, réputées pour leur résistance naturelle.

En revanche, l'extrait butanolique (EBuOH) a montré une activité relativement faible, avec des zones d'inhibition inférieures à 10 mm pour la majorité des souches, à l'exception de *B. subtilis* ATCC 6633 (11,67 mm). Cela laisse penser que les composés polaires ou amphiphiles extraits par le butanol sont soit peu actifs, soit présents en quantité insuffisante.

Par ailleurs, la résistance marquée observée chez certaines bactéries à Gram négatif, comme *Pseudomonas aeruginosa* et *K. pneumoniae*, est conforme à la littérature. Elle s'explique en grande partie par la présence d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS), qui constitue une barrière limitant la pénétration des molécules antimicrobiennes, notamment les composés hydrophobes tels que les terpènes **(Poole, 2001 ; Nikaido, 2003).** Leur mobilité pourrait également contribuer à limiter leur exposition aux substances actives présentes en surface du milieu de culture.

Enfin, comme attendu, la gentamycine (antibiotique de référence) a généré les plus larges zones d'inhibition (23 à 30 mm), illustrant son efficacité supérieure par rapport aux extraits végétaux.

Dans l'ensemble, nos résultats confirment que *Medicago sativa* L. possède une activité antibactérienne modérée, en accord avec des travaux antérieurs sur d'autres espèces du genre. Cette activité dépend fortement de la polarité du solvant, de la nature des composés extraits et de la sensibilité des souches bactériennes ciblées.

IV.2.1.2. L'activité antifongique

L'activité antifongique de divers extraits de *M.sativa* L. contre *Fusarium oxysporum, Botrytis sp.Alternaria* sp. estillustrée à la figure (37) et résumée dans le tableau (17).

Tableau: 17 Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique induite par différents extraits de *M .sativa*

Extrait testé	**EChL**	**EAcE**	**EBuOH**	**EMeOH**
Souche fongique	**Pourcentage d'inhibition**			
Botrytis sp.	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum	26.31	23.15	24.73	47.36
Alternaria sp	NA	NA	NA	NA

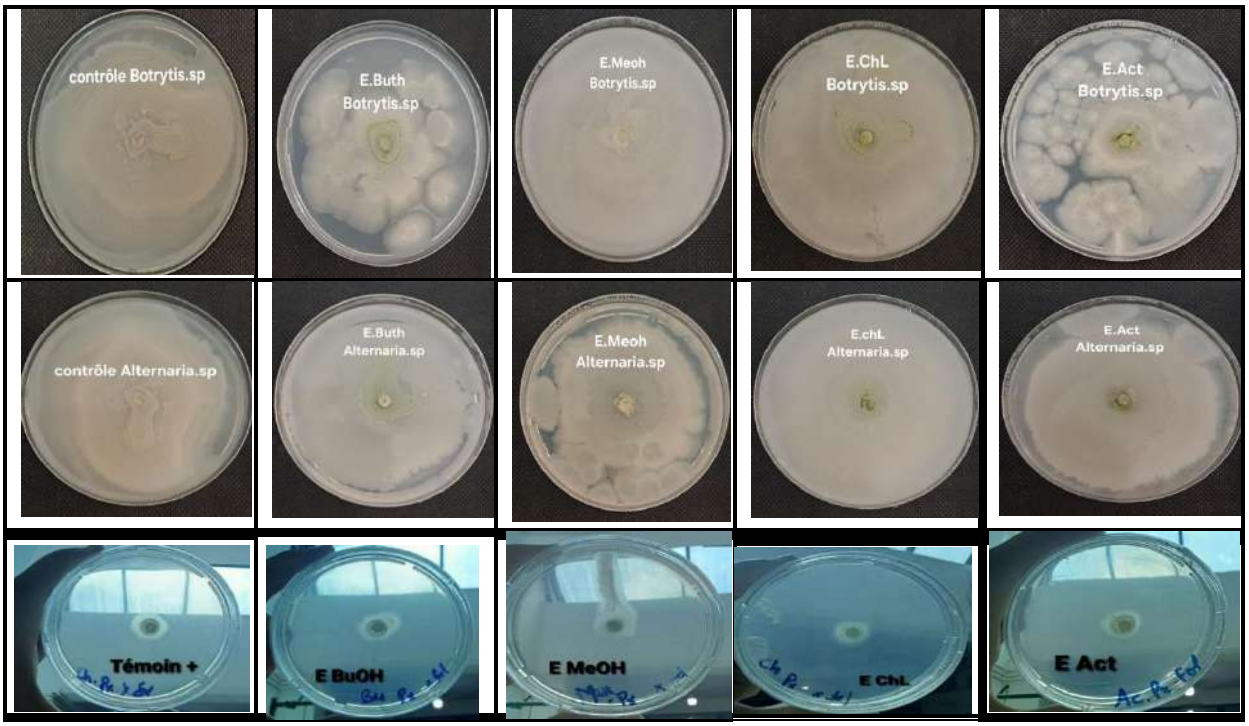


Figure 37: Photographies montrant l'effet de différents extraits de *M.sativa* sur la croissance de champignons testés

Les résultats obtenus ont montré que les extraits de *Medicago sativa* présentent une activité antifongique significative contre *Fusarium oxysporum*, avec un effet inhibiteur maximal observé pour l'extrait méthanolique (EMeOH), atteignant 47,36 %. Les autres extraits (EChL, EBuOH, EAcE) ont montré une inhibition plus faible, tandis qu'aucun effet n'a été détecté contre *Botrytis* sp. et *Alternaria* sp.

Cette efficacité de l'extrait méthanolique peut être attribuée à sa richesse en composés polaires bioactifs tels que les flavonoïdes, les tanins et les saponines, connus pour leurs propriétés antifongiques **(Bouyahya et al., 2018 ; Akroum et al., 2009).**

Des études antérieures ont également rapporté l'activité antifongique de Medicago sativa contre certaines espèces de *Fusarium*, confirmant nos observations **(Djeussi et al., 2013 ; El-Hadri et al., 2010).** En revanche, une faible efficacité contre *Botrytis* et *Alternaria* a été notée dans d'autres travaux, ce qui suggère une sélectivité d'action liée à la composition des parois fongiques ou à la tolérance intrinsèque de ces champignons **(Pinto et al., 2020).**

Ces résultats soulignent l'importance de poursuivre les recherches en vue d'isoler les composés actifs, de comprendre leurs mécanismes d'action, et d'améliorer leur biodisponibilité à travers des techniques de formulation appropriées.

Plusieurs études ont déjà mis en évidence le potentiel antifongique de certaines plantes médicinales, dont *Medicago sativa.* Par exemple, **Djeussi et al. (2013)** ont montré que les extraits méthanoliques de M. sativa possèdent une activité significative contre *Fusarium* spp., ce qui corrobore nos résultats. De plus, la richesse de *M. sativa* en composés phénoliques, flavonoïdes et saponines, bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, pourrait expliquer l'efficacité marquée de l'extrait méthanolique **(Bouyahya et al., 2018 ; Akroum et al., 2009).**

Cependant, d'autres travaux ont rapporté une faible activité contre *Botrytis* et *Alternaria* **(Pinto et al., 2020),** ce qui confirme également nos observations. Cela met en évidence le spectre d'activité restreint de certains extraits végétaux, qui peuvent agir sélectivement sur certaines espèces fongiques, en raison des différences dans la structure de leurs parois cellulaires ou dans leurs mécanismes de défense.

Ces données suggèrent qu'il est essentiel d'orienter les recherches futures vers l'isolement des molécules actives, l'étude de leur mode d'action, ainsi que l'utilisation de techniques modernes de formulation (comme les nanoparticules ou l'encapsulation) afin d'en améliorer l'efficacité, la stabilité et l'applicabilité comme agents antifongiques naturels.

IV.2.2. L'activité antioxydante

Dans ce travail, deux méthodes *in vitro* couramment utilisées dans la littérature ont été appliquées pour évaluer l'activité antioxydante : le test DPPH, le test ABTS.

CHAPITRE IV :Résultats et discussion

IV.2.2.1. Test DPPH

Ce test permet d'évaluer la capacité antioxydante d'un extrait en mesurant sa faculté à réduire le radical libre stable DPPH. Cette réaction de réduction se manifeste par un changement de couleur, dont l'intensité est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. L'IC_{50}, qui correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH, est généralement utilisée comme indicateur comparatif de l'efficacité antioxydante des extraits **(Brand-Williams et al., 1995).**

Les résultats du test appliqué à différents extraits de *Medicago sativa* sont présentés dans la figure et le tableau ci-dessous.



Figure 38: Test DPPH sur microplaque .

Tableau 18 : Inhibition du radicale libre DPPH par les extraits de *M.sativa* L.

Extrais	12,50µg	25µg	50µg	100µg	200µg	400µg	800µg	IC50µg/ml
EBuOH	1,10±3,81	3,93±3,92	4,74±2,03	19,82± 2,65	33,89± 4,15	51,17± 2,41	64,54± 6,10	325,25±50, 77
EMeOH	33,68±50, 13	32,28±51, 02	35,28±46, 85	36,30±41, 84	37,79±35, 28	48,01±21, 83	52,56 ±3,17	721,16±30, 21
EChL	32,77±51, 84	35,28±48, 84	35,39±49, 67	37,85±46, 28	45,66±40, 87	55,23±31, 57	63,25±23, 21	762,77±47, 38
EAcE	31,75±51, 75	32,87±49, 66	34,16±48, 42	36,56±42, 99	40,15±35, 85	46,41±16, 69	47,80±19, 26	227,57±15, 72
BHA	76,55±0,4 8	79,89±0,2 6	81,73±0,1 0	84,18±0,1 0	87,13±0,1 7	89,36±0,1 9	90,14±0,0 0	6.14±0.41
BHT	49,09±0,7 6	72,63±2,0 6	88.73±0,8 9	94.00±0,3 1	94.97±0,0 8	95.38±0,4 1	95.02±0,2 3	12.99±0.41
αTocopher ol	37,21±1,8 2	81,53±1,5 1	89,23±0,1 2	89,38±0,1 9	89,45±0,2 2	89,99±0,2 3	89,52±0,3 3	13.02±5,17

L'analyse des résultats présentés dans le tableau a montré que les extraits de *Medicago sativa* L. présentent des capacités antioxydantes variables selon le solvant d'extraction utilisé. L'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcE) a affiché la valeur d'IC_{50} la plus faible parmi les extraits testés (227,75 ± 17,53 µg/mL), indiquant une meilleure efficacité antioxydante. Cette activité pourrait s'expliquer par la capacité de ce solvant semi-polaire à extraire efficacement les composés phénoliques et flavonoïdes à fort potentiel antioxydant.

L'extrait butanolique (EBuOH) a montré une activité modérée, avec une IC_{50} de 325,25 ± 50,77 µg/mL, tandis que les extraits méthanolique brut (EMeOH) et chloroformique (EChL) se sont révélés nettement moins actifs, avec des IC_{50} respectives de 721,16 ± 30,21 µg/mL et 762,77 ± 47,38 µg/mL. Ces valeurs élevées traduisent une faible capacité à neutraliser les radicaux libres, probablement en raison d'une moindre teneur en composés antioxydants ou d'un profil chimique moins favorable.

L'ordre décroissant d'activité antioxydante observé est le suivant : EAcE > EBuOH > EMeOH > EChL.

IV.2.2.2. Test ABTS

Ce test permet d'évaluer la capacité antioxydante d'un extrait à neutraliser le radical cationique $ABTS^{+}$, mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm. Il est considéré comme complémentaire au test DPPH, en raison de la solubilité du radical $ABTS^{+}$ dans les milieux à la fois aqueux et lipidiques, ce qui permet une évaluation plus large de l'activité antioxydante **(Re et al., 1999).**

Les résultats du test appliqué à différents extraits de *Medicago sativa* sont présentés dans la figure et le tableau ci-dessous.

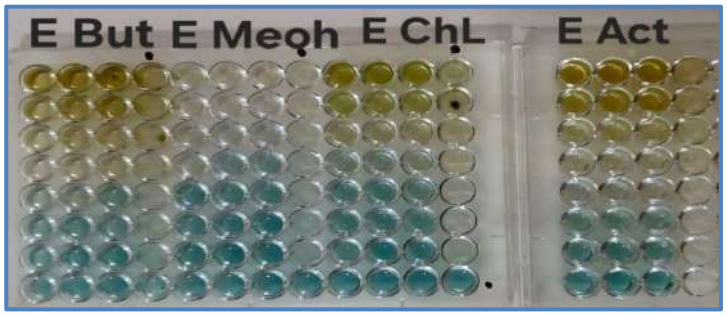


Figure 39: Test ABTS sur microplaque.

Tableau 19 : Inhibition du radicale libre ABTS par les extraits de *M.sativa L.*

Extrais	12,50µg	25µg	50µg	100µg	200µg	400µg	800µg	IC50µg/ml
EBuOH	11,85±4,34	29,40±29,40	29,40±29,40	52,52±1,79	60,47±5,37	68,36±5,31	69,70±7,00	70,02±6,21
EMeOH	3,33±4,65	8,19±4,03	14,12±5,47	28,73±3,41	42,09±2,09	61,48±2,82	80,65±1,48	275,25±50,62
EChL	20,73±17,92	18,09±4,36	18,30±3,19	33,73±2,34	45,76±2,52	60,88±2,09	74,25±1,99	263,53±1,57
EAcE	27,21±0,57	35,26±1,48	49,64±0,42	68,00±1,44	77,31±11,93	83,89±1,57	85,36±4,05	59,17±8,47
BHT	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

Parmi les extraits testés, l'extrait d'acétate d'éthyle (EAcE) a présenté la plus forte capacité de piégeage des radicaux libres $ABTS^{\bullet+}$, avec une valeur d'IC_{50} faible (59,17 ± 8,47 µg/mL). Ce résultat suggère une richesse en composés antioxydants de polarité intermédiaire, bien connus pour leur efficacité dans la neutralisation des radicaux libres. En comparaison, les antioxydants de référence BHT et BHA ont affiché des IC_{50} nettement plus faibles (respectivement 1,29 ± 0,30 et 1,81 ± 0,10 µg/mL), confirmant leur grande efficacité.

L'extrait butanolique (EBuOH) a également montré une activité antioxydante appréciable (IC_{50} = 70,02 ± 6,21 µg/mL), indiquant la présence de composés hydrophiles actifs, bien que moins efficaces que ceux présents dans l'extrait EAcE.

À l'inverse, les extraits méthanolique (EMeOH) et chloroformique (EChL) ont présenté les plus faibles activités antioxydantes, avec des IC_{50} respectives de 275,25 ± 50,62 µg/mL et 263,53 ± 1,57 µg/mL. Ces résultats traduisent une faible affinité des solvants très polaires ou très apolaires pour l'extraction des métabolites secondaires responsables de l'activité antioxydante.

Ces observations confirment que la polarité du solvant influence significativement l'efficacité d'extraction des composés bioactifs. Le rendement antioxydant optimal obtenu avec l'extrait EAcE met en évidence la prédominance des molécules de polarité intermédiaire dans l'activité antiradicalaire de *Medicago sativa*. Ce constat est en accord avec plusieurs études antérieures ayant démontré que les extraits à l'acétate d'éthyle concentrent efficacement les flavonoïdes et autres composés phénoliques à fort pouvoir antioxydant.

L'ordre décroissant d'activité antioxydante, basé sur l'inhibition du radical ABTS$\bullet^{+}$, est le suivant : EAcE > EBuOH > EChL > EMeOH.

IV.2.3. L'activité antidiabétique

Dans le cadre de cette étude, l'activité antidiabétique des différents extraits de *M.sativa* a été évaluée par inhibition de l'enzyme α-amylase. Les résultats obtenus, exprimés en valeurs d'IC_{50}, sont présentés dans la tableau ci-dessous.

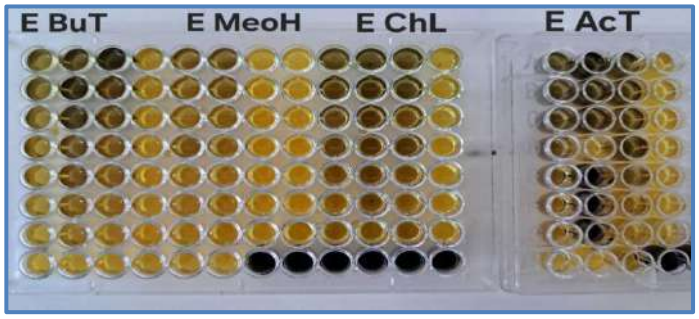


Figure 40 : Inhibition de l'alpha amylase sur microplaque.

CHAPITRE IV :Résultats et discussion

Tableau 20 : Effet des différents extraits de *M.sativa L*. vis-à-vis l'enzyme α-amylase

	% d'inhibition							
Extraits	**6.25 µg/ml**	**12.5 µg/ml**	**25 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**	**200 µg/ml**	**400 µg/ml**	**IC50 (µg/ml)**
EBuOH	28,70±3,23	37,83±6,47	47,45±11,27	60,50±9,32	85,40±23,19	113,35±26,45	132,24±46,06	**33,94±16,01**
EMeOH	17,76±5,54	20,99±6,16	23,91±8,25	33,79±13,81	31,74±12,50	41,93±18,46	55,34± 24,61	**197,35±25,25**
EChL	27,64±0,57	42,55±16,25	54,72±6,62	73,60±1,62	75,16±7,68	100,50±6,90	133,66±31,60	**26,28±3,72**
EAcE	112,17±84,50	101,18±94,58	119,81±82,69	77,27±44,76	109,75±8,23	129,81±11,65	170,99±31,38	**12,19±2,28**
Acarbose	116,17±83,43	115,18±81,15	125,18±80,58	129,27±44,76	135,75±8,23	140,81±11,65	180,99±31,38	**10,7±10,7**

L'enzyme α-amylase joue un rôle central dans l'hydrolyse de l'amidon alimentaire en sucres simples. Son inhibition constitue une stratégie thérapeutique bien établie dans la gestion du diabète de type 2, visant à ralentir la digestion des glucides et à atténuer les pics glycémiques postprandiaux. Dans ce contexte, l'étude de l'effet inhibiteur des extraits de *Medicago sativa* L. sur cette enzyme apporte des éléments pertinents quant à leur potentiel antidiabétique **(Sales et al., 2012 ; Tundis et al., 2010).**

L'évaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *M. sativa* a révélé une efficacité variable selon le solvant d'extraction utilisé. L'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcE) s'est distingué par une IC_{50} de 12,19 ± 2,28 µg/mL, très proche de celle de l'acarbose (IC_{50} = 10,7 µg/mL), médicament de référence. Ce résultat suggère que cet extrait est riche en composés bioactifs semi-polaires, tels que les flavonoïdes ou les coumarines, capables d'interagir efficacement avec le site actif de l'enzyme. La variabilité relativement élevée des pourcentages d'inhibition à faibles concentrations pourrait s'expliquer par la complexité chimique de l'extrait ou la stabilité des composés présents, mais l'activité globale reste remarquable.

L'extrait chloroformique (EChL) a également montré une bonne activité (IC_{50} = 26,28 ± 3,72 µg/mL), soit environ deux fois moins efficace que l'extrait EAcE, ce qui met en évidence le rôle possible de composés lipophiles dans l'inhibition enzymatique.

L'extrait butanolique (EBuOH) présente une activité modérée (IC_{50} = 33,94 ± 16,01 µg/mL), bien que la variabilité expérimentale soit notable. Cela suggère la présence de composés hydrophiles actifs, mais en moindre quantité ou avec une affinité réduite pour l'enzyme.

CHAPITRE IV :Résultats et discussion

En revanche, l'extrait méthanolique (EMeOH) a montré une activité inhibitrice faible, avec une IC_{50} significativement plus élevée (197,35 ± 25,25 µg/mL). Cette inefficacité pourrait être liée à une prépondérance de composés très polaires, moins aptes à se fixer au site actif de l'α-amylase, ou à une faible concentration en métabolites secondaires actifs.

Cette étude met en évidence que l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Medicago sativa* L. possède une activité inhibitrice de l'α-amylase comparable à celle de l'acarbose, confirmant son fort potentiel antidiabétique. L'efficacité décroissante observée avec les autres solvants souligne l'importance du choix du solvant dans l'extraction ciblée des composés bioactifs. Ces résultats confirment la valeur pharmacologique de *M. sativa* et ouvrent des perspectives intéressantes pour son utilisation en tant qu'agent antidiabétique naturel dans des formulations phytothérapeutiques ou nutraceutiques.

CONCLUSION GENERALE

La présente étude s'est intéressée à l'évaluation des propriétés pharmacologiques de *Medicago sativa L*. (luzerne), une plante de la famille des Fabacées, largement reconnue pour ses usages traditionnels et sa richesse en métabolites secondaires bioactifs. En s'inscrivant dans une démarche de valorisation des plantes médicinales locales, ce travail a permis de combiner une synthèse bibliographique approfondie à une investigation expérimentale rigoureuse.

Les extraits issus des parties aériennes de *M. sativa,* obtenus par macération dans des solvants de polarité croissante, ont été soumis à des analyses ciblant trois activités biologiques majeures : antimicrobienne, antioxydante et antidiabétique.

Les résultats ont mis en évidence un potentiel antimicrobien modéré, notamment de l'extrait méthanolique contre plusieurs souches bactériennes, et une activité antifongique significative contre *Fusarium oxysporum*. L'étude a également démontré que l'activité antioxydante la plus remarquable a été obtenue avec l'extrait à l'acétate d'éthyle, qui a affiché des valeurs IC_{50} inférieures dans les tests DPPH et ABTS, traduisant une capacité efficace à neutraliser les radicaux libres. Enfin, l'évaluation de l'activité antidiabétique par inhibition de l'α-amylase a révélé une forte activité pour ce même extrait, dont l'IC_{50} s'est avérée équivalente à celle de l'acarbose, médicament de référence.

Ces résultats confirment que *Medicago sativa L*. est une plante d'intérêt pharmacologique, capable de fournir des extraits aux propriétés biologiques notables, particulièrement en tant qu'agents naturels antioxydants et antidiabétiques. L'efficacité de ces extraits dépend fortement du type de solvant utilisé, soulignant l'importance du choix méthodologique dans l'extraction des principes actifs. Ainsi, cette étude apporte une contribution pertinente à la connaissance scientifique des plantes médicinales locales et ouvre des perspectives intéressantes pour la recherche de composés naturels bioactifs, potentiellement exploitables dans le développement de produits thérapeutiques alternatifs. Des travaux complémentaires, portant notamment sur l'isolement, la caractérisation structurale et l'évaluation in vivo des molécules actives, seraient nécessaires pour approfondir ces résultats et valider leur application clinique future.

REFERENCES

Références

1. **Adorjan, B., & Buchbauer, G**. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour and fragrance journal, 25(6), 407-426.
2. **Ahmad, F., Anwar, F., & Hira, S**. (2016). Review on medicinal importance of Fabaceae family. Pharmacologyonline, 3, 151-157.
3. **Alain, K. Y., Cokou, A. D. P., Diane, B., Reine, B. S., Alain, A. G., Felicien, A., & Dominique, S. C. K.** (2018). Métabolites secondaires et activités biologiques des extraits de l'écorce de tronc de Khaya senegalensis, une plante à usage vétérinaire récoltée au Bénin. International Journal of Innovation and Applied Studies, 23(4), 441-450.
4. **AL-Farsi M.A. and Lee C.Y**. (2008). Optimisation of Phenolics and Dietary Fibre Extraction from Date Seech. Food chemistry, 108: 977-985.
5. **Ali, B.H. et al**. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale). Food and Chemical Toxicology.
6. **Al-Snafi, A. E., Khadem, H. S., Al-Saedy, H. A., Alqahtani, A. M., Batiha, G. E.-S., & Abolfazl, J.-S.** (2021). A review on Medicago sativa: A potential medicinal plant.
7. **Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K**. (2002). Methods for testing antioxidant activity. Analyst, 127(1), 183-198.
8. **Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., et al**. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology Advances, 33(8), 1582–1614.
9. **Bahadur, B., Reddy, K. J., & Rao, M. L. N**. (2007). Medicinal plants: an overview. Adv Med plants Univ Press Hyderabad.
10. **BELKHIRI, A., DEROUICHE, T., MOULAHOUM, T., BOULEBDA, N., & PACHA, Y. H.** (2007); Médicaments À Base De Plantes Médicinales Traditionnelles: Necessite D'une Reglementation Adaptee Concernant Leur Mise Sur Le Marche En Algerie.
11. **Ben-Moussa, M. T., Khelil, K., Harkat, H., Lakehal, S., & Hadef, Y**. (2020). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de Brocchia cinerea VIS. d'Algérie. Med Sci, 7(2), 122-8.
12. **Bennett, R. W., & Monday, S. R**. (2003). Staphylococcus aureus. In International handbook of foodborne pathogens (pp. 61-80). CRC Press.

13. **Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K**. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de Fredolia aretioides de la région de Béchar en Algérie. Phytothérapie, 12(6), 364-371.
14. **Benzie, I.F.F., & Strain, J.J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1), 70–76
15. **Bernfeld, P.** (1955). Amylases, α and β. In S.P. Colowick & N.O. Kaplan (Eds.), Methods in Enzymology (Vol. 1, pp. 149–158). Academic Press.
16. **Boukhatem et al.,** (2014.) Thymus vulgaris L. essential oil as a natural preservative. Journal of Essential Oil Research.
17. **Brand-william W, Cuvelier ME, Berset C**. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmmittel Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.
18. **Burt, S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253.
19. **Caser, M., Scariot, V., et al.** (2019). Activité antioxydante - Test ABTS. Università degli Studi di Torino.
20. **Chaabena, A.** (2001). Situation des cultures fourragères dans le sud–est septentrionale du Sahara algérien et caractérisation de quelques variétés introduites et population sahariennes de la luzerne cultivée, thèse de Magis. Agro. INA EL Harrach, 141 p.
21. **Chaabena, A., &Abdelguerfi, A**. (2001). Situation de la luzerne pérenne dans le Sahara et comportement de quelques populations locales et variétés introduites dans le sud-est du Sahara algérien. Zaragoza et Lleida, Espagne, 12, 57-60.
22. **Cheeke, P. R**. (1998). Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants. Interstate Publishers.
23. **Chen, X., Ren, T., Mei, D., Wei, X., Guo, Y., Li, Y., Nan, Z., & Song, Q**. (2025, March 4). Infection of various Medicago sativa varieties by Ascochyta medicaginicola triggers the synthesis of defensive secondary metabolites and their antifungal mechanisms. Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions.https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c12848
24. **Christenhusz, M. J., & Byng, J. W.** (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa, 261(3), 201-217.
25. **CollinS. Et Crouzet J**. (2011). Polyphénols et Procèdes: Transformation des Polyphénols au travers des Procédés Appliqués à l'Agroalimentaire. Lavoisier Tec et Doc. Paris. 336p.

26. **Cowan, M. M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564–582.
27. **Didier, D. S., Emmanuel, M. M., Alfred, N., France, K. M., & Lagarde, B. J**. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences, 37(9), 2496-2507.
28. **Doyle, J. J., & Luckow, M. A.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology, 131(3), 900–910.
29. **Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M**. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5), 1768–1774.
30. **Duranti, M**. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia.
31. **Dzoyem, J. P., Tchinda, A. T., Kuete, V**. (2013). Plant-derived agents with antimicrobial activity. In: Kuete, V. (Ed.) Medicinal Plant Research in Africa, Elsevier, pp. 33–61.
32. **Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R.** (2008). Ecology and genomics of Bacillus subtilis. Trends in Microbiology, 16(6), 269–275. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004
33. **Ekor, M.** (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Frontiers in pharmacology, 4, 177.
34. **Eslahi, H., Fahimi, N., & Sardarian, A. R**. (2017). Chemical composition of essential oils. Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications, 119-171.
35. **Etxeberria, U., de la Garza, A. L., Martìnez, J. A., & Milagro, F. I**. (2020). Impact of nutritional and industrial plant-based bioactives on metabolic health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(4), 546–560.
36. **Ghedadba, N., Khelil, A., & Saidi, N.** (2014). Effets antimicrobiens de quelques extraits végétaux contre les bactéries multirésistantes. Revue Sciences & Technologie, 30, 59–65.
37. **Grau, J., & Rechinger, K. H**. (1981). Medicago minima. In Rechinger, K.H. (Ed.), Flora Iranica (Vol. 147). Akademische Druck- und Verlagsanstalt.
38. **Graziano, D., Di Giorgio, G., Ruisi , P., Amato, G., & Giambalvo , D**. (2010). Variation
39. **Greuter, W., Burdet, H. M., & Long, G**. (1984). Med-Checklist. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève.

40. **Haddouche F et Benmansour A** (2008).Article de synthèse: Huiles essentielles et activités biologiques, Application à deux plantes aromatiques. Journal les technologies de laboratoire N°8.
41. **Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C**. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
42. **Sies, H.** (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology, 82(2), 291–295.
43. **Hamel, T., Sadou, S., Seridi, R., Boukhdir, S., & Boulemtafes, A**. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). Ethnopharmacologia, 59, 65-71.
44. **Hirsch, A. M.** (2010). Alfalfa and the origins of plant-bacterial symbioses. Plant Physiology, 154(2), 590–592.
45. **Jansen, G., Jurgens, H. U., Schliephake, E., et al**. (2012). Lupin alkaloids in seeds of Lupinus mutabilis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(25), 6371–6379.
46. **Jiang, Y., Tang, Y., Sun, Z., & Wang, M**. (2020). Nutritional and medicinal properties of alfalfa (Medicago sativa L.). Journal of Food Science and Technology, 57(12), 4567–4577. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04503-3
47. **Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, B. A., ... & Tsabang, N.** (2010). Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. International Journal of Medicine and Medical Sciences, 2(3), 60-79.
48. **Judd, W. S. et al**. (2002). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates.
49. **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J**. (2016). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach (4th ed.). Sinauer Associates.
50. **Katoch, D., Singh, B., & Meena, R. L**. (2013). Traditional use and pharmacological properties of Fabaceae family plants: A review. International Journal of Ayurveda and Pharma Research, 1(3), 1–12.
51. **Khairy, A., Hammoda, H. M., Metwally, A. M., Zaatout, H. H., & Ibrahim, R. S**. (2025). Therapeutic potential of Medicago sativa (Alfalfa): A comprehensive review of its bioactive compounds and pharmacological properties. Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences, 1-27.

52. **Koné, D**. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante. Université Paul Verlaine-Metz, Metz.
53. **Kumar, S., Malhotra, R., & Kumar, D**. (2013). Euphorbia hirta: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. Pharmacognosy Reviews, 7(1), 58–62. *(Référence adaptée à Medicago sativa)
54. **Kuo, Y. H., & Lambein, F**. (1991). Neurotoxins in legume seeds. Toxicon, 29(1), 29–36.
55. **Langenheim, J. H**. (2003). Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. Timber Press.
56. **Lesins , K., & Lesins , A.** (1979). Genus Medicago (Leguminosae) : a taxogenetic study
57. **Lévy, R**. (2016). Les antibiotiques. Paris: Presses Universitaires de France.
58. **Lewis, G**., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.
59. **Lowy, F. D.** (1998). Staphylococcus aureus infections. New England Journal of Medicine, 339(8), 520–532. https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806
60. **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C**. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. EPFL Press.
61. **Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., & Stahl, D.A**. (2021). Brock – Biologie des micro-organismes (15e éd.). Pearson Éducation.
62. **Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., & Stahl, D.A**. (2021). Brock: Biologie des micro-organismes (15e éd.). Pearson Education.
63. **Maridass, M., & De Britto, A. J**. (2008). Origins of Plant Derived Medicines. Ethnobotanical Leaflets, 2008(1), 44.
64. **Marouf, M. & Reynaud, J**. (2007). Biologie et physiologie des légumineuses.
65. **Matthias Erb, Daniel J**. (2020) Kliebenstein, Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy, Plant Physiology, Volume 184, Issue 1, September 2020, Pages 39–52, https://doi.org/10.1104/pp.20.00433
66. **Mauriès, M**. (2003). La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France Agricole Editions.
67. **Melis, R. A., Julier, B., Pecetti, L., Thami-Alami, I., Abbas, K., Laouar, M., ... &Porqueddu, C**. (2017). La culture de la luzerne dans un climat méditerranéen.

68. **Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., & Leitao, S. G.** (2001). Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(19), 4251–4260.
69. **Messina, M**. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. The American Journal of Clinical Nutrition, 100(suppl_1), 423S–430S.
70. **Molyneux P**. (2004). The Use of the Stable Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity.Songklanakarin Journal of Science and Technologie, 26: 211-219.
71. **Mondal, A., & Kundu, D**. (2024). Role of phenol and its derivative biometabolic compounds in bioregulation. 57(1). https://doi.org/10.59094/emsj.v57i1.16
72. **Morel, S**. (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de Derris ferruginea Benth.(Fabaceae) (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
73. **Nakashima, C., Uematsu, S., & Kakishima, M**. (2011). Taxonomic studies of Alternaria species on Solanaceous plants in Japan. Mycoscience, 52(4), 282–295
74. **Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M**. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. International Journal of Preventive Medicine, 5(12), 1487–1499.
75. **Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M**. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. International Journal of Preventive Medicine, 5(12), 1487–1499.
76. **Nestor, A. O., Cyrille, B. K., Philippe, S., Mahudro, Y., Gwladys, K. S., Yannick, A., ... & Dominique, S. K. C**. (2019). Antibacterial activity of essential oil of Aeollanthus pubescens on multidrug resistant strains of Salmonella and Escherichia coli Isolated from laying hens farming in Benin. Advances in Microbiology, 9(9), 804-823.
77. **Peirs, A.** (2005). Morphologie des plantes vasculaires. Presses Universitaires.
78. **Podschun, R., & Ullmann, U**. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589–603.
79. **Polyphenols**: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. Phytotherapy Research, 33(9), 2221–2243. https://doi.org/10.1002/ptr.6419

80. **Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R**. (2021). Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. International Journal of Physical Education, Sports and Health, 6(1), 293–301. https://doi.org/10.22271/JOURNALOFSPORT.2021.V6.I1E.2236
81. **Pusztai, A., & Bardocz, S.** (1996). Lectins: Biomedical perspectives. Taylor & Francis.
82. **Putnam, D. H., Orloff, S. B., & Lanini, W. T**. (2007). Alfalfa: Wildlife, agriculture and the environment. University of California Agriculture and Natural Resources.
83. **Quézel, P. & Santa, S.** (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS.
84. **rame, J., Charlton, J. F. L., & Laidlaw, A. S.** (1998). Temperate forage legumes. CAB International.
85. **Raut, J. S., & Karuppayil, S. M.** (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial crops and products, 62, 250-264.
86. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C**. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9-10), 1231–1237.
87. **Rouibi, A., Boukhatem, M., Benouaklil, F., Chabane, D., Feknous, S., & Boulaghmen, F.** (2015). Les sites secreteurs de quelques plantes aromatiques et médicinales d'Algérie. Revue Agrobiologia,(7), 38-42.
88. **Sabrina, D. J. E. H. I. C. H. E.** (2022). Effets Thérapeutiques des Huiles Essentielles des Plantes Médicinales (Doctoral dissertation, university center of abdalhafid boussouf-MILA).
89. **Sagdic, O., Kuscu, A., Özcan, M., Özcelik, S**. (2002) Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157:H7. Food Microbiology. 19: 473-480
90. **Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y**. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 8(1), 1–10.
91. **Sharangi, A. B., & Peter, K. V.** (Eds.). (2022). Medicinal Plants: Bioprospecting and Pharmacognosy. CRC Press.
92. **Sharma, S. C., & Ahmad, S. A**. (1992). Traditional medicinal plants: ancient and modern approach. Ancient Science of Life, 12(1 & 2), 197-200.

93. Small, E. (2011). Alfalfa and relatives: Evolution and classification of Medicago. NRC Research Press.

94. Small, E., & Jomphe, M. (1989). A synopsis of the genus Medicago (Leguminosae). Canadian Journal of Botany, 67(11), 3260–3294.

95. Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes. New Phytologist, 215(1), 40–56.

96. Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C., & Leslie, J. F. (2010). Biogeography and phylogeography of Fusarium: A review. Fungal Diversity, 44, 3–13. https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2

97. Surjushe, A. et al. (2008). Aloe vera: A short review. Indian Journal of Dermatology.

98. Tabart J., Kevers C., Sipel A., Paincemail J. Defraigne J. and Dommes J. (2007). Optimisation of Extraction of Phenolics and Antioxidant from Black Currant Leaves and Buds and Stability during Storage. Journal of Food Chemistry, 105:1268-1277.

99. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Industrial crops and products, 43, 587-595.

100. Teixeira, H., Shahidian, S., & Fonseca, C. (2011). Alfalfa root system characterization and its implication on forage yield in Mediterranean climate. Grass and Forage Science, 66(4), 432–441.

101. Tijjani, H., Zangoma, M. H., Mohammed, Z. S., Obidola, S. M., Egbuna, C., & Abdulai, S. I. (2020). Polyphenols: Classifications, Biosynthesis and Bioactivities (pp. 389–414). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42319-3_19

102. Todar, K. (2020). Todar's Online Textbook of Bacteriology. (Madigan.2021).

103. Tortora, G.J., Funke, B.R., & Case, C.L. (2020). Microbiologie (12e éd.). Pearson Éducation.

104. Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. Comprehensive reviews in food science and food safety, 12(1), 40-53.

105. Turk, M. A., Tawaha, A. R., & Alu'datt, M. H. (2011). Ecological distribution and biodiversity of Medicago species in Jordan. Australian Journal of Crop Science, 5(2), 195–201.

106. Üstündaş, M., Yener, H. B., & Helvacı, Ş. Ş. (2018). Parameters affecting lycopene extraction from tomato powder and its antioxidant activity. Anadolu University Journal of Science and Technology A-Applied Sciences and Engineering, 19(2), 454-467.

107. Van Wyk, B. E., & Albrecht, C. (2008). A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of Sutherlandia frutescens (Fabaceae). Journal of ethnopharmacology, 119(3), 620-629.

108. Xu, Z., Deng, M., Xu, Z., & Deng, M. (2017). Fabaceae or leguminosae. Identification and Control of Common Weeds: Volume 2, 547-615.

109. Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., ... & Roe, B. A. (2011). The Medicago truncatula genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature, 480(7378), 520–524.

110. Zakaria, B. D., & Nassira, G. H. E. M. B. A. Z. A. (2022). Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles du Myrtus communis. L (Rayhane) (Doctoral dissertation).