

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABÈS Sidi Bel Abbès

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

M^{me} SAIDI. Imene

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Enzymes, Micro-organismes et Bio-industries

Intitulé

Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des fabaceae : *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès : Extraction des substances bioactives.

Soutenu le :

Devant le Jury composé de :

Président : Dr. Miloud MISSOURI, Université DJILLALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès.
Examineurs : Dr. Ahmed HARIRI, Université Mustapha STAMBOULI de Mascara.
Dr. Rabah KERROUCHA, Université Ahmed BENBELLA d'Oran 1
Directrice de thèse : Dr. Hassiba MAHDJOURBESSAM, Université DJILLALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès.

Année universitaire 2018/2019

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir cette thèse.

Le présent travail de thèse a été réalisé sous la direction de M^{me} MAHDJOUR BESSAM Hassiba que je tiens à remercier pour l'avoir dirigé avec enthousiasme me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques.

Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour les encouragements sa disponibilité et la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur MISSOURI Miloud Maître de conférences à l'Université DJILALI LIABÈS d'avoir accepté de présider cette thèse.

Je remercie également Monsieur HARIRI Ahmed de l'Université Mustapha STAMBOULI pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de l'examiner.

Mes remerciements s'adressent pareillement à Monsieur KERROUCHA Rabah de l'Université Ahmed BENBELLA Oran1 pour sa disponibilité d'avoir bien voulu accepter la charge d'examineur.

Il m'est aussi agréable de remercier M^{me} EL ZEREY-BELASKRI Asma de l'Université DJILALI LIABÈS pour m'avoir aidé à identifier l'espèce végétale étudiée.

Mes remerciements vont aussi à l'égard de Monsieur BOUKHARI Yahia, de l'Université Mustapha STAMBOULI, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse.

Je remercie très vivement ma collègue et mon amie M^{me} BENCHACHOUA Abbassia, de l'Université de Mustapha STAMBOULI pour son soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche et surtout pour ses précieux encouragements.

Je souhaiterais remercier toute personne ayant contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

J'adresse mes remerciements particuliers à ma petite et grande famille pour leur amour leur soutien émotionnel inconditionnel et leur encouragement. MERCI....

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette thèse

À Mon très cher père, Merci pour tout ce que tu fais pour moi papa,

À Ma très chère maman, Que Dieu le tout puissant te préserve,

À Mon mari, Merci pour ton soutien et ta gentillesse,

À Ma petite Farida, je t'aime mon ange,

À Ma famille et ma belle-famille.

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydants à partir de sources naturelles, l'objectif premier est d'évaluer les activités biologiques des extraits du fruit de *Gleditsia triacanthos* (févier d'Amérique) puis d'identifier de manière séquentielle les différents métabolites secondaires bioactifs.

Le screening phytochimique des extraits hydrométhanoliques bruts des graines et de la pulpe, des gousses et de leurs fractions, a été réalisé afin de déterminer les grands groupes chimiques contenus dans le fruit du févier d'Amérique par des méthodes standards. Les quantités en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des différents extraits ont été déterminées par des dosages spectrophotométriques. L'évaluation *in vitro*, du pouvoir antioxydant a été réalisée par deux méthodes ; la détermination de la capacité antioxydante totale (CAT) et le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Les extraits végétaux ont également été soumis à une évaluation de leur activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé sur des souches de références de types ATCC. La détermination de la composition phénolique des extraits actifs a été réalisée par HPLC-UV.

L'investigation phytochimique a permis de mettre en évidence la détection de quelques groupes chimiques à savoir : flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, stérols, terpènes, hétérosides cardiotoniques, et saponosides, dont la présence nous renseigne sur le profil phytochimique de nos extraits et fractions. Les résultats du dosage montrent la richesse des extraits en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés dont les teneurs dépendent de la nature du solvant d'extraction. Les teneurs les plus importantes ont été observées dans la fraction chloroformique (de la pulpe), avec 131.667 ± 2.055 mg EAG/g de polyphénols totaux et la fraction acétates d'éthyle (de la pulpe) avec de 25.160 ± 0.01 mg EC/g de flavonoïdes.

Les méthodes de l'activité antioxydante *in vitro* montrent que tous les extraits étudiés présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes présents dans les extraits et fractions. Les résultats du test du DPPH ont révélé que les fractions acétate d'éthyle ($IC_{50} = 50.455 \pm 1.315$ µg/ml des graines et $16,288 \pm 0,299$ µg/ml de la pulpe) et chloroformiques ($IC_{50} = 78.027 \pm 3.922$ µg/ml des graines et $95,583 \pm 3,529$ µg/ml de la pulpe) sont les plus antioxydantes.

Quant au test de la capacité antioxydante totale, les résultats soulignent que les fractions chloroformiques, couvrent les meilleures capacités antioxydantes totales, avec des capacités de $12,484 \pm 0,458$ et $750,584 \pm 129,793$ mg EAA/g pour les graines et la pulpe respectivement, suivies par les fractions acétate d'éthyle. Nous avons enregistré des corrélations positives entre les tests antioxydants réalisés et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de nos extraits et fractions, ce qui précise la contribution des antioxydants de cette plante particulièrement les polyphénols et les flavonoïdes dans le mécanisme de défense antioxydant.

Les meilleures inhibitions antibactériennes ont été obtenues pour les fractions éther de pétrole vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). La détermination des CMI des fractions les plus actives montre que celles-ci présentent un pouvoir antibactérien généralement modeste envers les souches bactériennes testées.

La caractérisation par chromatographie HPLC nous a permis d'identifier la présence de quelques composés phénoliques principalement des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les flavonoïdes glycosylés (vitexine, isovitexine, myricétine-3-O-rutinoside, myricétine-3-O-glucoside, apéginine glycoside, myricétine rhamnoside et isorhamnetin-3-O-glucoside) et les acides caféoylquiniques prédominent dans les extraits de la pulpe du fruit de *Gleditsia triacanthos*.

Il ressort de cette étude que le fruit de *Gleditsia triacanthos* (févier d'Amérique) constitue une source majeure de principes actifs possédant diverses activités biologiques qui pourraient jouer un rôle reconnu dans la phytothérapie.

Mots clés : *Gleditsia triacanthos*, extrait, screening phytochimique, Composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne, HPLC.

Abstract

As part of the search for new antioxidants from natural sources, the main objective is to evaluate the biological activities of the extracts of the fruit of *Gleditsia triacanthos* (honey locust) and then to identify sequentially the various bioactive secondary metabolites. .

The Phytochemical screening of crude hydromethanolic extracts of seeds and pulp and their fractions was performed to determine the major chemical groups contained in honey locust fruit by standard methods. The amounts of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins of the various extracts were determined by spectrophotometric assays. The *in vitro* evaluation of the antioxidant potency was carried out by two methods; Determination of total antioxidant capacity (TAC) and 2,2-diphenyl-1-1-1-1-tetraphenylhydrazyl free radical scavenging test (DPPH). The plant extracts were also subjected to an evaluation of their antibacterial activity by the method of diffusion of the disks in agar medium on strains of the ATCC type collection. The determination of the phenolic composition of the active extracts was carried out by HPLC-UV.

The phytochemical investigation has highlighted the detection of some chemical groups namely: flavonoids, tannins, alkaloids, sterols and terpenes, cardiogenic glycosides, and saponosides. The presence of these compounds informs us about the phytochemical profile of our extracts and fractions. The results of the assay show the richness of the extracts in total polyphenols, flavonoids and condensed tannins and that these contents depend on the nature of the extraction solvent. The highest levels were observed in the chloroform fraction (of the pulp), with 131.667 ± 2.055 mg GAE / g of total polyphenols and in the ethyl acetate fraction (of the pulp), with 25.160 ± 0.01 mg CE / g of flavonoids.

The methods of the antioxidant activity *in vitro* show that all the extracts studied have antioxidant properties at different levels depending on the content of total polyphenols and flavonoids present in the extracts and fractions. The results of the DPPH test, revealed that the ethyl acetate fractions ($IC_{50} = 50.455 \pm 1.315$ μ g / ml of the seeds and 16.288 ± 0.299 μ g / ml of the pulp) and chloroformic fractions ($IC_{50} = 78.027 \pm 3.922$ μ g / ml of seeds and 95.583 ± 3.529 μ g / ml of the pulp) are the most antioxidant.

As for the total antioxidant capacity test, the results indicate that the chloroform fractions, cover the best total antioxidant capacities, with capacities of 12.484 ± 0.458 and 750.584 ± 129.793 mg AAE / g of seeds and the pulp respectively, followed by the ethyl acetate fractions. Positive correlations were established between the antioxidant tests performed and the total polyphenol and flavonoid contents of our extracts and fractions, which show the contribution of antioxidants from this plant, particularly the total polyphenols and flavonoids in the antioxidant defense mechanism.

The best antibacterial inhibitions were obtained for petroleum ether fractions against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). The determination of the MIC of the most active fractions shows that it has generally a modest antibacterial power against the bacterial strains tested.

Characterization by HPLC chromatography allowed us to identify the presence of some phenolic compounds mainly phenolic acids and flavonoids. The glycosylated flavonoids (vitexin, isovitexin, myricetin-3-O-rutinoside, myricetin-3-O-glucoside, apeginine glycoside, myricetin rhamnoside and isorhamnetin-3-O-glucoside) and the caffeoylquinic acids predominate in the extracts of the pulp's fruit of *Gleditsia triacanthos*.

This study shows that the fruit of *Gleditsia triacanthos* is a major source of active compounds with various biological activities that could play a recognized role in herbal medicine.

Key words: *Gleditsia triacanthos*, extract, phytochemical screening, Phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity, HPLC.

ملخص

كجزء من البحث عن مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر الطبيعية، فإن الهدف الأساسي هو تقييم الأنشطة البيولوجية لمستخلصات ثمرة *Gleditsia triacanthos* (جراد العسل) وتحديد مختلف المركبات الثانوية النشطة بيولوجيا.

تم إجراء فحص كيميائي نباتي للمستخلصات الهيدروميتانولية الخام لبذور ولب القرون وأجزائها لتحديد المجموعات الكيميائية الرئيسية المحتواة في ثمار *Gleditsia triacanthos* بالطرق القياسية. تم تحديد كميات من البوليفينول الكلي، والفلافونيدات والتانينات المكثفة من المستخلصات المختلفة بواسطة تقنيات طيفية. تم أيضا تقييم للنشاط المضاد للأكسدة بطريقتين: تحديد القدرة الكلية لمضادات الأكسدة (CAT) وتثبيط جذر (DPPH) 2،2-ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل. كما خضعت المستخلصات النباتية لتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا من خلال طريقة نشر الأقراص في وسط جامد على السلالات المرجعية لنوع ATCC. تم إجراء تحديد التركيب الفينولي للمستخلصات النشطة بواسطة HPLC-UV.

التحقيق الكيميائي النباتي ساعد على تسليط الضوء للكشف عن بعض المجموعات الكيميائية هم: الفلافونيدات، التانينات، قلويدات، ستيروول وتربينات، جليكوسيدات مقوية، وسابونوسيدات، والذين يعطينا وجودهم تعريف كيميائي نباتي لمستخلصاتنا وأجزائها. تظهر نتائج الفحص ثراء المستخلصات في البوليفينول الكلي والفلافونويد والتانينات المكثفة، وأن كمية هذه المحتويات تعتمد على طبيعة مذيب الاستخلاص. وقد لوحظت أعلى المستويات في جزء الكلوروفورم من اللب، بقيمة 2.055 ± 131.667 ملغ مكافئ حمض غاليك/ غ من إجمالي البوليفينول وجزء اسيتات الإيثيل بقيمة 0.01 ± 25.160 ملغ مكافئ كاتشين/ غ من الفلافونويد.

تظهر تقنيات تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن جميع المستخلصات التي تمت دراستها لها خصائص مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة بحسب محتوى البوليفينول الكلي والفلافونويد الموجود في المستخلصات والأجزاء. أظهرت نتائج اختبار DPPH أن أجزاء اسيتات الإيثيل ($IC_{50} = 1.315 \pm 50.455$ للبذور و 0.299 ± 16.288 ميكروجرام / مل لللب) والأجزاء الكلوروفورمية ($IC_{50} = 3.922 \pm 78.027$ للبذور و 3.529 ± 95.583 ميكروجرام / مل لللب) هي الأكثر مضادة للأكسدة.

أما بالنسبة لاختبار القدرة على مضادات الأكسدة الكلية، فإن النتائج تؤكد أن أجزاء الكلوروفورم، تحتوي على أفضل القدرات المضادة للأكسدة الكلية، بقيمة 0.458 ± 12.484 g / mg و 89 ± 129.793 مغ مكافئ حمض الاسكوربيك/غ للبذور واللب على التوالي، يليها أجزاء إيثيل الأسيتات للبذور. تم العثور على علاقات خطية إيجابية بين الاختبارات المضادة للأكسدة التي أجريت ومحتوى البوليفينول الكلي ومحتويات الفلافونويد لمستخلصاتنا وأجزائها، مما يشير إلى مساهمة مضادات الأكسدة من هذا النبات، وخاصة البوليفينول وفلافونيدات في آلية الدفاع المضاد للأكسدة.

تم الحصول على أفضل نشاط مضادة للبكتيريا لأجزاء إيثر النفط ضد *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). إن تحديد CMI من الأجزاء الأكثر نشاطاً يدل على أن لها قوة مضادة للبكتيريا متواضعة بشكل عام تجاه السلالات البكتيرية التي تم اختبارها.

سمح لنا التحديد عن طريق الكروماتوغرافيا HPLC بمعرفة وجود بعض المركبات الفينولية بشكل رئيسي الأحماض الفينولية والفلافونويد. مركبات الفلافونويد الغليكوزيلي (vitexine و isovitexine و myricétine-3-O-rutinoside و isorhamnetine-3-O-glucoside و myricétine-3-O-glycoside و apéginine و rhamnoside myricétine و isorhamnetine-3-O-glucoside) والأحماض الكافيليكينية تسود في مستخلصات اللب لفاكهة *Gleditsia triacanthos*.

تبين دراستنا أن ثمار هذا النبات تعد مصدرا رئيسيا للمكونات النشطة ذات الأنشطة البيولوجية المختلفة التي يمكن أن تلعب دورا معينا في الحفاظ على الصحة الجيدة. لي

الكلمات المفتاحية: *Gleditsia triacanthos*، مستخلص، فحص كيميائي نباتي، مركبات فينولية، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا، HPLC.

Table des matières

Résumé	
ملخص	
Abstract	
Table des matières	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	IV
Introduction.....	01

Partie I : Partie bibliographique

Chapitre I : Les composés phénoliques, structures et propriétés

I.1. Généralités.....	03
I.2. Classification et structure chimique.....	03
I.2.1. Acides phénoliques.....	04
I.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques.....	04
I.2.1.2. Acides hydroxybenzoïque.....	05
I.2.2. Acides coumariques.....	05
I.2.3. Les Stilibènes	06
I.2.4. Lignines et lignanes.....	06
I.2.5. Flavonoïdes.....	07
I.2.5.1. Flavones et flavonols.....	07
I.2.5.2. Flavanones et flavanonols	08
I.2.5.3. Flavanols.....	09
I.2.5.4. Anthocyanes.....	09
I.2.5.5. Isoflavonoïdes.....	09
I.2.5.6. Chalcones et Aurones.....	10
I.2.6. Tanins.....	10
I.2.6.1. Tanins hydrolysables.....	10
I.2.6.2. Tanins condensés.....	10
I.3. Biosynthèses des produits phénoliques.....	11
I.3.1. La voie de Shikimate.....	11
I.3.2. La voie des phénylpropanoïdes.....	12
I.3.3. La voie de l'acide malonique.....	13
I.4. Propriétés chimiques des composés phénoliques.....	13
I.4.1. Nucléophilie.....	13
I.4.2. Chélation des ions métalliques.....	13
I.4.3. Propriétés réductrices.....	14
I.4.4. Complexation des protéines.....	14
I.4.5. Polarisabilité.....	15
I.5. Les composés phénoliques et la physiologie des plantes.....	15
I.5.1. Réponse au stress biotique et abiotique.....	15
I.5.2. Rôle de défense.....	15
I.5.3. Rôle de communication.....	16
I.5.4. Les composés phénoliques comme pigments.....	16
I.5.5. Biotransformation des xénobiotiques.....	16
I.6. Méthode d'étude des composés phénoliques.....	17
I.6.1. Méthodes d'extraction.....	17
I.6.2. Méthodes de dosage et d'identification des composés phénoliques.....	18

Chapitre II : Activité biologique des plantes

II.1. Propriétés antioxydantes.....	20
II.1.1. Stress oxydatif.....	20
II.1.2. Les radicaux libres.....	20
II.1.2.1. Espèces réactives à l'oxygène.....	21
II.1.2.2. Espèces réactives à l'azote.....	21
II.1.3. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif.....	23
II.1.4. Systèmes de défense antioxydant.....	23
II.1.4.1. Endogène : antioxydants enzymatiques.....	23
II.1.4.2. Exogène : antioxydants non enzymatiques.....	24
II.1.5. Pouvoir antioxydant des polyphénols.....	25
II.2. Activité antimicrobienne.....	27
II.2.1. Principaux groupes de composés phénoliques antimicrobiens.....	27
II.2.1.1. Les acides phénoliques.....	27
II.2.1.2. Les flavonoïdes.....	28
II.2.1.3. Les tanins.....	28
II.2.1.4. Les quinones.....	29
II.2.1.5. Les coumarines.....	29
II.3. Autres activités biologiques des polyphénols.....	29
II.3.1. Maladies inflammatoires.....	29
II.3.2. Cancer.....	30
II.3.3. Maladies cardiovasculaires.....	30
II.3.4. Maladies neurodégénératives.....	31

Chapitre III : *Gleditsia triacanthos* L

III.1. Ordre des Fabales.....	32
III.2. Les Fabaceae.....	32
III.2.1. Systématique de la famille des Fabaceae.....	32
III.2.2. Description botanique.....	33
III.2.3. Répartition géographique des Fabaceae.....	34
III.2.4. Intérêts écologique et économique des Fabaceae.....	35
III.2.5. Les Métabolites secondaires des fabacées.....	36
III.3. La sous-famille des Cesalpinoïdæ.....	38
III.3.1. Description.....	38
III.3.2. Usage.....	38
III.4. Le genre <i>Gleditsia</i>	39
III.4.1. Description.....	39
III.4.2. Intérêt médicinal du genre <i>Gleditsia</i>	39
III.5. L'espèce <i>Gleditsia triacanthos</i>	40
III.5.1. Taxonomie.....	40
III.5.2. Description botanique.....	41
III.5.3. Répartition géographique.....	43
III.5.3.1. <i>Gleditsia triacanthos</i> en Algérie.....	43
III.5.4. Quelques activités biologiques reconnues.....	43
III.6. Composition biochimique du fruit de l'espèce <i>Gleditsia triacanthos</i>	44

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Objectifs du travail.....	46
I.2. Matériel.....	47

I.2.1. Matériel végétale.....	47
I.2.1.1. Présentation et situation de la zone de récolte.....	47
I.2.1.2. Collecte et identification de la plante.....	48
I.2.2. Produits chimiques et réactifs.....	49
I.2.3. Matériel de microbiologie.....	49
I.2.3.1. Milieux de culture et antibiotiques.....	49
I.2.3.2. Les souches bactériennes.....	49
I.3. Extraction : Obtention des extraits végétaux.....	49
I.3.1. Préparation des extraits hydro-méthanoliques.....	50
I.3.2. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante.....	50
I.3.3. Calcul des rendements en extraits secs.....	51
I.4. Screening phytochimique.....	52
I.4.1. Flavonoïdes.....	52
I.4.2. Tanins.....	52
I.4.3. Stérols et triterpènes.....	52
I.4.4. Alcaloïdes.....	53
I.4.5. Saponosides.....	53
I.4.6. Glycosides cardiotoniques.....	53
I.4.7. Anthraquinones.....	54
I.5. Étude quantitative.....	54
I.5.1. Dosage des polyphénols totaux.....	54
I.5.2. Dosage des Flavonoïdes.....	55
I.5.3. Dosage des tanins condensés.....	56
I.6. Détermination de l'activité antioxydante.....	57
I.6.1. Capacité antioxydante totale.....	57
I.6.2. Piégeage du radical DPPH.....	57
I.6.2.1. Evaluation du potentiel antiradicalaire : calcul de l'IC ₅₀	59
I.7. Activité antibactérienne.....	59
I.7.1. Description des souches bactériennes.....	59
I.7.2. Préparation des disques.....	61
I.7.3. Préparation des différentes concentrations des extraits.....	61
I.7.4. Préparation des cultures bactériennes et ensemencement.....	61
I.7.5. Test de sensibilité par méthode de diffusion sur gélose.....	61
I.7.6. Détermination de la CMI par méthode de dilution sur milieu gélosé.....	62
I.7.7. Lecture des résultats.....	62
I.8. Analyses statistiques.....	63
I.9. Analyse par chromatographie liquide à haute performance.....	63
I.9.1. Principe.....	63
I.9.2. Protocole expérimental.....	64

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction.....	66
II.2. Screening phytochimique.....	69
II.3. Etude quantitative.....	73
II.3.1. Les polyphénols totaux.....	76
II.3.2. Les flavonoïdes.....	79
II.3.3. Les tanins condensés.....	81
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	83
II.4.1. Capacité antioxydante totale.....	84
II.4.2. Test du piégeage du radical libre de DPPH.....	89
II.4.2.1. Evaluation des IC ₅₀	91
II.5. Corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	96
II.6. Activité antibactérienne.....	103
II.6.1. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	103

II.6.2. Test de sensibilité par méthode de diffusion sur gélose.....	104
II.6.3. Profil de sensibilité des souches bactériennes.....	107
II.6.4. Détermination de la CMI par méthode de dilution sur milieu gélosé.....	110
II.7. Analyse chromatographique HPLC.....	113
II.7.1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait brut.....	113
II.7.2. Identification des composés phénoliques dans la fraction éther de pétrole.....	114
II.7.3. Identification des composés phénoliques dans la fraction chloroformique.....	115
II.7.4. Identification des composés phénoliques dans la fraction acétate d'éthyle.....	116
II.7.5. Identification des composés phénoliques dans la fraction butanolique.....	117
II.7.6. Identification des composés phénoliques dans la fraction aqueuse.....	117
Discussion générale.....	122
Conclusion et perspectives.....	127
Références bibliographiques	129
Annexes	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
N°		
01	Les principaux antioxydants endogènes et exogènes.....	25
02	Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétiques ou morphologiques.....	33
03	Classification phylogénétique de l'espèce <i>Gleditsia triacanthos</i> L.....	40
04	Composition biochimique du fruit de <i>Gleditsia triacanthos</i>	45
05	Caractéristiques géographiques et bioclimatiques du lieu de récolte de la plante étudiée.....	47
06	Caractéristiques et pouvoir pathogènes des souches bactériennes testées.....	60
07	Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.....	62
08	Caractéristiques et rendements des extraits de <i>Gleditsia triacanthos</i> . L.....	66
09	Résultats du screening phytochimique des gousses (graines et pulpe) de <i>Gleditsia Triacanthos</i> . L.....	69
10	Propriétés des composés chimiques présents dans la plante.....	70
11	Résultats du dosage des composés phénoliques.....	75
12	Résultats des activités antioxydantes.....	84
13	Sensibilité (zone d'inhibition en mm) des souches bactériennes testées vis-à-vis des antibiotiques.....	104
14	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des graines.....	106
15	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits de la pulpe.....	106
16	Profil de sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des extraits testés.....	108
17	Concentration minimale inhibitrice des fractions actives.....	111
18	Temps de rétention des standards utilisés dans l'analyse par HPLC.....	149

LISTE DES FIGURES

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
N°		
01	Les principales classes des composés phénoliques.....	04
02	Structures chimiques des principaux acides phénoliques.....	05
03	Structure chimique des acides coumariques.....	06
04	Structures chimiques des stilibènes.....	06
05	Structure des alcools formant la lignane et la lignine.....	07
06	Structure de base des flavonoïdes.....	07
07	Structure des différentes familles des flavonoides.....	08
08	Structure des chalcones et aurones.....	10
09	Structure chimique typique des tanins.....	11
10	Voies de biosynthèse des polyphénols.....	12
11	Processus de formation des espèces réactives.....	22
12	Mécanisme d'action antiradicalaire des polyphénols.....	26
13	Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes.....	27
14	Carte de répartition de la famille des Fabaceae à travers le monde.....	35
15	Structures de quelques alcaloïdes isolés des fabacées.....	37
16	Caractères descriptifs de <i>Gleditsia triacanthos</i>	42
17	Présentation de la wilaya de Sidi Bel Abbés (site de récolte).....	48
18	Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide des extraits bruts des graines et de la pulpe.....	51
19	Réaction du piégeage du radical libre DPPH 2,2-diphényl-1-ptycril-hydrazyl par un antioxydant.....	58
20	Réalisation des étapes d'un test antibactérien.....	62
21	Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance.....	64
22	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	74
23	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	74
24	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés.....	75
25	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.....	85
26	Capacité antioxydante totale des extraits des graines.....	86
27	Capacité antioxydante totale des extraits de la pulpe.....	86
28	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits des graines de <i>Gleditsia triacanthos L.</i>	90

29	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de la pulpe de <i>Gleditsia Triacanthos L.</i>	90
30	Valeurs des IC ₅₀ des extraits de la pulpe de <i>Gleditsia triacanthos. L.</i>	91
31	Valeurs des IC ₅₀ des extraits des graines de <i>Gleditsia Triacanthos. L.</i>	91
32	Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des extraits des graines.....	99
33	Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques des extraits des graines.....	100
34	Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des extraits de la pulpe.....	101
35	Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques des extraits de la pulpe.....	102
36	Profil chromatographique des composés phénoliques de l'extrait brut de la pulpe....	114
37	Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction éther de pétrole de la pulpe.....	115
38	Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction chloroformique de la pulpe.....	115
39	Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction acétate d'éthyle de la pulpe.....	116
40	Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction butanolique de la pulpe.....	117
41	Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction aqueuse de la pulpe.....	118
42	Eléments impliqués dans l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	119

LISTE DES ABBREVIATIONS

% :	Pourcentage.
° :	Degré.
°C :	Degré Clesius.
µg:	Microgramme.
ADN :	Acide désoxyribonucléique.
AlCl₃:	Chlorure d'aluminium.
APG :	Angiosperm Phylogeny Group.
ATCC :	American type culture collection (Collection américaine des cultures type).
CAT :	Capacité antioxydante totale.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice.
DMSO :	Dimethylsulfoxyde.
DO :	Densité optique.
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
EAA/g MS :	Equivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche.
EAG/g MS :	Equivalent acide gallique par gramme de matière sèche.
EAT/g MS :	Equivalent acide tannique par gramme de matière sèche.
EC/g MS :	Equivalent catéchine par gramme de matière sèche.
EMBG :	Extrait méthanolique brut des graines.
EMBP :	Extrait méthanolique brut de la pulpe.
EQ/g MS :	Equivalent quercétine par gramme de matière sèche.
ER/g MS :	Equivalent rutine par gramme de matière sèche.
ERO :	Espèce réactive à l'oxygène.
FAEG :	Fraction acétate d'éthyle des graines.
FAEP :	Fraction acétate d'éthyle de la pulpe.
FAQG :	Fraction aqueuse des graines.
FAQP :	Fraction aqueuse de la pulpe.
FBUG :	Fraction butanolique des graines.
FBUP :	Fraction butanolique de la pulpe.
FCLG :	Fraction chloroformique des graines.
FCLP :	Fraction chloroformique de la pulpe.
FeCl₃ :	Chlorure ferrique.
FEPG :	Fraction éther de pétrole des graines.
FEPP :	Fraction éther de pétrole de la pulpe.

<i>g</i> :	Gramme.
<i>GSH</i> :	Glutathion.
<i>HPLC</i>	High-performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance).
<i>IC₅₀</i> :	Concentration inhibitrice 50 %.
<i>mg ET/ g</i> :	Equivalent Trolox par gramme.
<i>mg</i> :	Milligramme.
<i>min</i> :	Minute
<i>ml</i> :	Millilitre.
<i>mm</i> :	Millimètre
<i>Mo</i> :	Molybdène
<i>MS</i> :	Matière sèche
<i>nm</i> :	Nanomètre
<i>R²</i> :	Coefficient de corrélation
<i>UFC/ml</i> :	Unité formant colonie par millilitre
<i>UV</i> :	Ultra-Violet
<i>v/v</i> :	Volume pour volume

Introduction Générale

Dans la communauté scientifique, certains produits végétaux naturels, ont suscité ces dernières décennies un intérêt croissant en raison de leurs précieuses propriétés biologiques. Ce sont des composés chimiques ayant une activité pharmacologique et thérapeutique. Ils sont généralement utilisés dans la découverte et la conception de médicaments.

Les données disponibles indiquent que ces produits naturels ont des effets bénéfiques sur la santé humaine, notamment en ce qui concerne leur activité antioxydante, d'autant plus que l'utilisation des antioxydants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels.

Les antioxydants naturels sont donc une alternative intéressante en raison de leurs variétés de structures et d'interactions chimiques, ainsi que des nombreuses activités biologiques qu'ils possèdent. En s'appuyant sur cette vision, Il est indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouvelles molécules biologiquement actives à partir de plantes. À cet effet, plusieurs investigations chimiques ont été réalisées afin d'apporter une explication scientifique à l'efficacité des plantes utilisées en médecine traditionnelle. Le résultat fut la découverte de composés chimiques, dits métabolites secondaires qui sont répartis en plusieurs classes, parmi lesquelles la plus étudiée, celle des polyphénols qui sont reconnus comme de très bons antioxydants (Bouayed et *al.*, 2007).

Les polyphénols représentent un groupe d'au moins 10 000 composés différents qui contiennent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (González-Vallinas et *al.*, 2013 ; Li et *al.*, 2014). Comme métabolites secondaires, ils sont abondants dans la majorité des fruits et légumes (González-Vallinas et *al.*, 2013), et sont impliqués dans la défense contre différents types de stress (Asensi et *al.*, 2011), notamment oxydatif.

Le stress oxydatif est caractérisé comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives et l'activité de défense antioxydante. Cet état est associé à beaucoup de maladies chroniques telles que le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires (McCord, 2000 ; Knežević et *al.*, 2011).

Les composés antioxydants naturels font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans le traitement des pathologies liées au stress oxydant, ils sont aussi utilisés

dans l'industrie agroalimentaire, qui incorpore ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (Taviano et *al.*, 2013), surtout comme conservateur de par leur pouvoir antimicrobien.

Les propriétés antibactériennes des plantes représentent une alternative pour pallier les problèmes récurrents d'antibiorésistance, face aux maladies infectieuses émergentes. Une des stratégies modernes, consiste à explorer l'effet antibactérien des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Notre étude s'inscrit dans ce contexte, et consiste en la recherche des activités antioxydantes et antibactériennes des extraits du fruit de *Gleditsia triacanthos*, ou févier d'Amérique. C'est un grand arbre, appartenant la famille des fabaceae ou légumineuses, sous famille des Caesalpinioideae, cultivé dans les parcs et jardins publics principalement à des fins ornementales. Il est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de la colite spasmodique, la cholécystite chronique, les ulcères d'estomac et l'asthme bronchique (Rakhmanberdyeva et *al.*, 2002).

Le présent travail consiste essentiellement en une caractérisation phytochimique afin de connaître les grandes familles chimiques auxquelles on peut rattacher les propriétés pharmacodynamiques attribuées à cette plante, puis en la réalisation de tests biologiques pour établir le bien-fondé de telles utilisations.

Le présent document est structuré en deux parties :

- ❖ La première partie de ce manuscrit porte sur une mise au point bibliographique sur le sujet étudié, mettant en revue les connaissances actuelles concernant la plante étudiée (*Gleditsia triacanthos*), les composés phénoliques, leur classification et leur propriété biologique.
- ❖ La seconde partie décrit le travail expérimental, elle est répartie en deux chapitres :
 - Le premier chapitre expose le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude.
 - Le deuxième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques et biologiques obtenus et à la l'interprétation de ces résultats.

Enfin, une discussion générale et une conclusion viennent résumer l'ensemble de l'étude en soulignant les résultats intéressants et recommander les perspectives à envisager à l'avenir.

Partie bibliographique

Chapitre I :
Les composés phénoliques,
structures et propriétés

I.1. Généralités

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. Ils accumulent des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix et *al.*, 2005).

Ces métabolites secondaires sont répartis différemment dans le règne végétal avec des niveaux d'accumulation qualitative et quantitative variables. Parmi ces composés secondaires, on peut citer ; les alcaloïdes, les terpénoïdes, les composés phénoliques...etc.

Les composés phénoliques ou polyphénols, représentent un groupe important de molécules chimiques, caractéristiques des végétaux, que nous étudierons dans ce chapitre.

I.2. Classification et structure chimique

Les composés phénoliques peuvent-être répartis selon, la complexité de leur squelette de base, le degré de modification de ce squelette et les liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules, en une dizaine de classes (Figure 01) différentes (Macheix et *al.*, 2005 ; Pietta, 2000).

Ils ont pour structure de base, plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils vont de la simple structure avec un anneau aromatique à des substances polymériques hautement complexes tels que les tanins et les lignines. Les phénols sont des constituants importants de certaines plantes médicinales et sont utilisés dans l'industrie alimentaire.

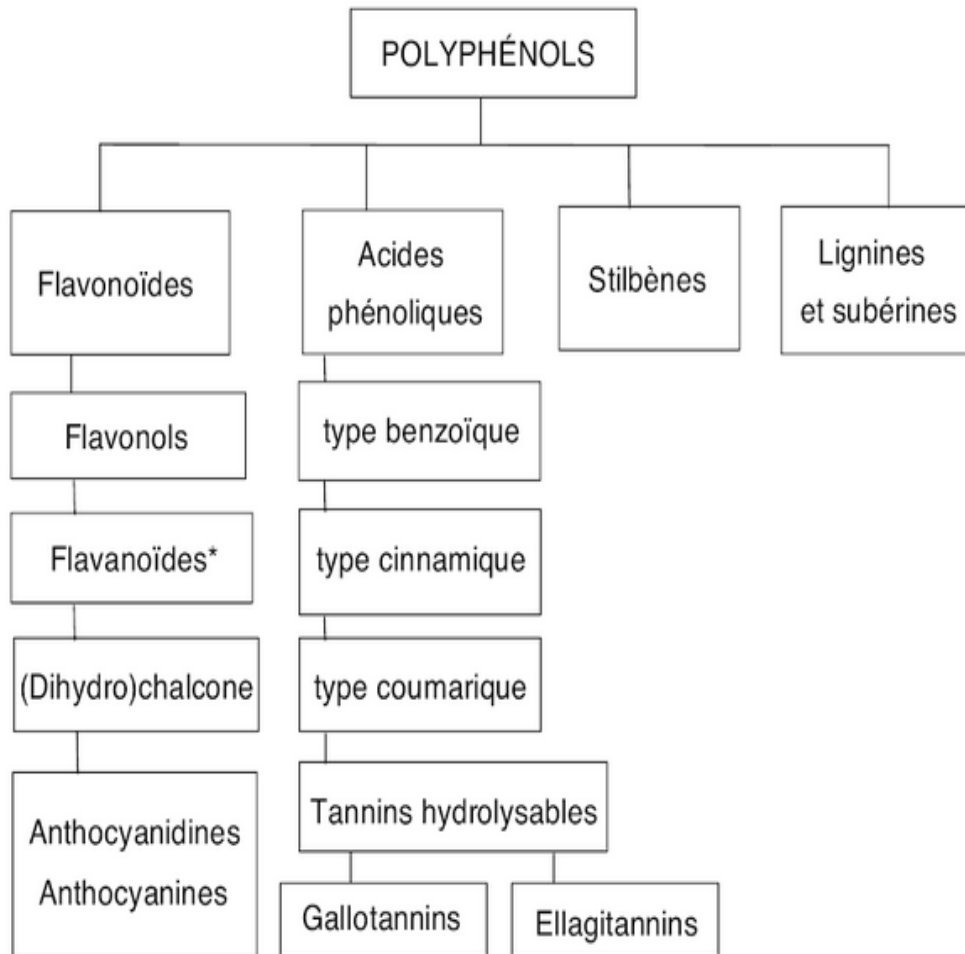


Figure 01 : Principales classes des composés phénoliques, * polymère de flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).

1.2.1. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (Benhammou, 2011).

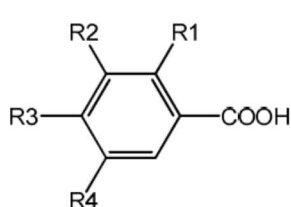
1.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique (Figure 02). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules.

Les acides cinnamiques sont retrouvés dans les plantes sous forme d'esters d'acides quiniques, acide shikimique et acide tartrique. Par exemple, l'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique et l'acide quinique (Macheix et *al.*, 2005).

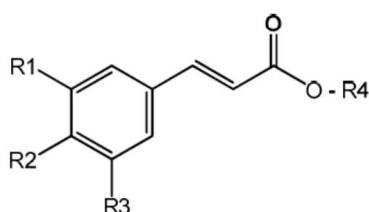
I.2.1.2. Acides hydroxybenzoïques

Les acides phénoliques en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (Bruneton, 1999). Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (Figure 02).



- R1 = R2 = R3 = R4 = H : acide benzoïque (non phénolique)
- R1 = R2 = R4 = H, R3 = OH : acide *p*-hydroxybenzoïque
- R1 = R4 = H, R2 = R3 = OH : acide protocatéchique
- R1 = R4 = H, R2 = OCH₃, R3 = OH : acide vanillique
- R1 = H, R2 = R3 = R4 = OH : acide gallique
- R1 = H, R2 = R4 = OCH₃, R3 = OH : acide syringique

Acides hydroxybenzoïques



- R1 = R2 = R3 = R4 = H : acide cinnamique (non phénolique)
- R1 = R3 = R4 = H, R2 = OH : acide *p*-coumarique
- R1 = R2 = OH, R3 = R4 = H : acide caféique
- R1 = OCH₃, R2 = OH, R3 = R4 = H : acide férulique
- R1 = R3 = OCH₃, R2 = OH, R4 = H : acide sinapique
- R1 = R2 = OH, R3 = H, R4 = H : acide quinique : acide chlorogénique

Acides hydroxycinnamiques

Figure 02 : Structures chimiques des principaux acides phénoliques (Chanforan, 2010).

I.2.2. Acides coumariques

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Figure 03). Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

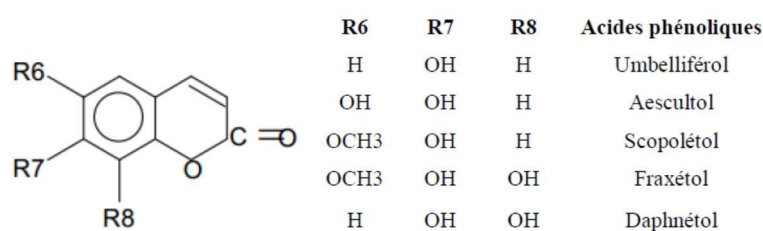
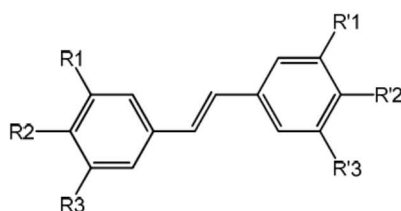


Figure 03 : Structure chimique des acides coumariques (Macheix *et al.*, 2005).

1.2.3. Les Stilbènes

Les stilbènes répondent à une représentation structurale de type C₆-C₂-C₆ (Figure 04). Ils dérivent des acides hydroxycinnamiques et regroupent des dérivés hydroxy- et méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques et polymériques. Ils se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Parmi ces composés, on trouve le resvératrol, un anticancéreux présent dans certaines plantes (Bruneton, 2009 ; Chanforan, 2010).



R1 = R3 = R'2 = OH, R2 = R'1 = R'3 = H : resvératrol
 R1 = R3 = OCH₃, R2 = R'1 = R'3 = H, R'2 = OH : ptérostilbène
 R1 = glucose, R2 = R'3 = OH, R'2 = R'1 = OH, R'2 = OCH₃ : rhapontine
 R1 = glucose, R2 = R'1 = R'3 = H, R3 = R'2 = OH : picéide

Figure 04 : Structures chimiques des stilbènes (Chanforan, 2010).

1.2.4. Lignines et lignanes

Les lignanes sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Ils sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique, par des réactions de couplage radicalaire (Bruneton, 2009).

La lignine est le résultat de polymérisation d'unités en C₆-C₃ des lignanes, plus ou moins réticulé et d'une grande complexité structurale. C'est le deuxième biopolymère abondant sur la terre après la cellulose. Elle joue un rôle structural en conférant au bois sa rigidité (Buchanan *et al.*, 2000 ; Bruneton, 2009).

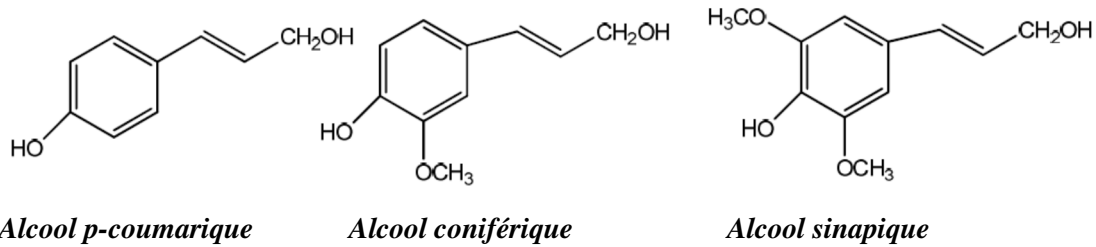


Figure 05 : Structure des alcools formant la lignane et la lignine (Ghnimi, 2015).

1.2.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols, molécules connues pour leurs multiples activités biologiques. Les flavonoïdes sont omniprésents dans les plantes ; presque tous les tissus végétaux sont capables d'en synthétiser. Il existe également une grande variété naturelle. En effet, au début des années 90, le nombre de structures de flavonoïdes rapporté était d'environ 4000 (Harborne, 1993).

La structure de base de ces composés regroupe un grand nombre de molécules. Elle est constituée d'un squelette carboné en C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane (Figure 06). Ces 15 atomes de carbone répartis sur deux noyaux benzéniques (A et B) sont reliés par une chaîne linéaire de 3 atomes de carbone, formant en général un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Harborne, 1993).

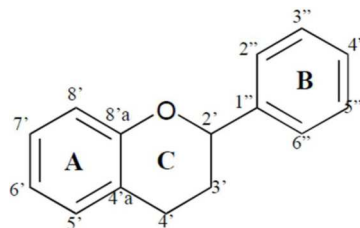


Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).

Les flavonoïdes peuvent-être subdivisés en différents sous-groupes (Figure 07) en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel est fixé l'anneau B et du degré d'insaturation et d'oxydation de l'anneau C.

1.2.5.1. Flavones et flavonols

Les flavones ont une double liaison entre les C₂ et C₃ et une cétone en position C₄ de l'anneau C (Figure 07). Ils ont un groupe hydroxyle en position 5 du cycle A, tandis que l'hydroxylation

dans d'autres positions, pour la plupart se situe en position 7 du cycle A ou en 3 et 4' de l'anneau B. Les flavones ont un rôle moins important et sont beaucoup moins fréquentes que les flavonols dans les fruits et légumes. La glycosylation se produit principalement sur les positions 5 et 7.

Les flavonols se différencient des flavones par l'existence d'un OH en position 3 qui peut être glycosylé. Ce sont les flavonoïdes les plus répandus ; les trois principales structures sont le kaempferol, la quercétine et la myricétine. La quercétine est sans doute le composé phénolique le plus répandu dans la nature (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Han et *al.*, 2007). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides.

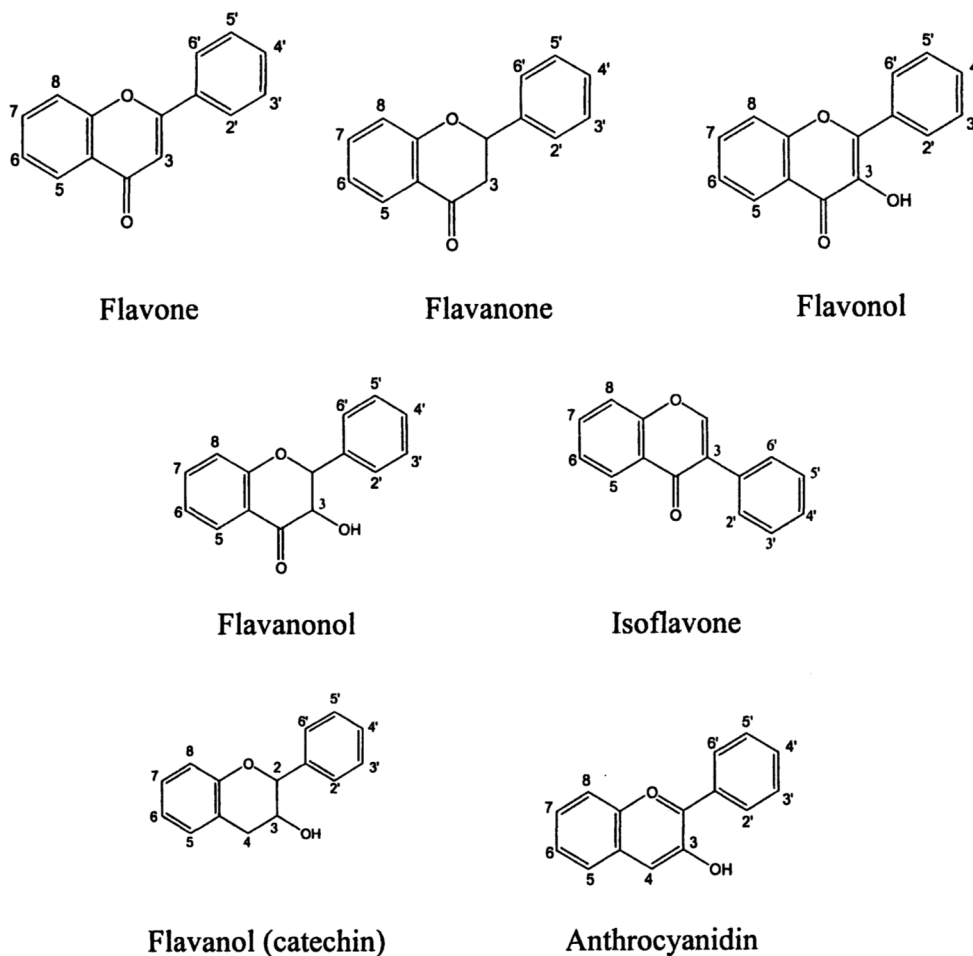


Figure 07: Structure des différentes familles des flavonoïdes.

I.2.5.2. Flavanones et flavanonols

Les flavanones, également appelés dihydroflavones, sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C₂ et C₃ et par la présence d'un centre de chiralité en C₂ (Figure 07). Les principaux aglycones sont l'ériodictyol, la naringénine et l'hespéritine. Ils peuvent être multi-

hydroxylés, et plusieurs groupes hydroxyle peuvent être glycosylés ou méthylés (Tsao, 2010). Les flavanonols, également appelés dihydroflavonols, sont les dérivés 3-hydroxy des flavanones.

I.2.5.3. Flavanols

Les flavanols sont également appelés flavan-3-ols, car le groupe hydroxyle est presque toujours lié à la position 3 du cycle C (Figure 07) ; on les appelle aussi catéchines. La (+) - catéchine et la (-) - épicatechine sont les deux isomères les plus souvent présents dans les plantes comestibles.

Les flavanols, en particulier, la catéchine et l'épicatechine, ont la capacité à former des polymères, appelés proanthocyanidines ou tanins condensés. Le nom "proanthocyanidines" est dû au fait qu'un clivage catalysé par un acide produit des anthocyanidines (Manach et *al.*, 2004 ; Tsao, 2010).

I.2.5.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C (Figure 07). Ce sont des composés responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violette et bleue observées dans la nature. Les anthocyanes interviennent directement dans les interactions plantes-animaux et surtout dans l'attraction des pollinisateurs par la couleur des fleurs (Buchanan et *al.*, 2000).

Plus de 500 composés anthocyanidines sont connus selon le degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle B. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (Tsao, 2010).

I.2.5.5. Isoflavones

Les isoflavones telle que la génistéine n'ont pas la structure classique en C₆-C₃-C₆ des autres flavonoïdes, possèdent des structures peu classiques, dans lesquelles, l'anneau B est attaché à la position 3 de l'anneau C et sont moins répandus (Ribéreau-Gayon, 1968). Ce sont des composés presque spécifiques de la famille des Fabacées. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone) (Chaouch, 2014). Ils ont des similitudes structurelles avec les œstrogènes, tel que l'œstradiol, et pour cette raison, ils sont également appelés phytoestrogènes.

I.2.5.6. Chalcones et Aurones

Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes (figure 08) par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α , β -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes (Hammoud, 2009).

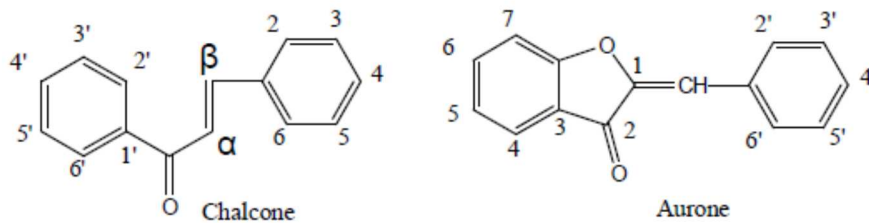


Figure 08 : Structure des chalcones et aurones.

Les aurones dérivent directement des chalcones. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes.

I.2.6. Tanins

Les tanins constituent un groupe avec une diversité large en structure, qui partage leur capacité de lier et précipiter les protéines. Selon la structure (Figure 09), on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi proanthocyanidines (Han et al., 2007).

I.2.6.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters de glucides et d'un nombre variable d'acides phénols. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitanins (Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999).

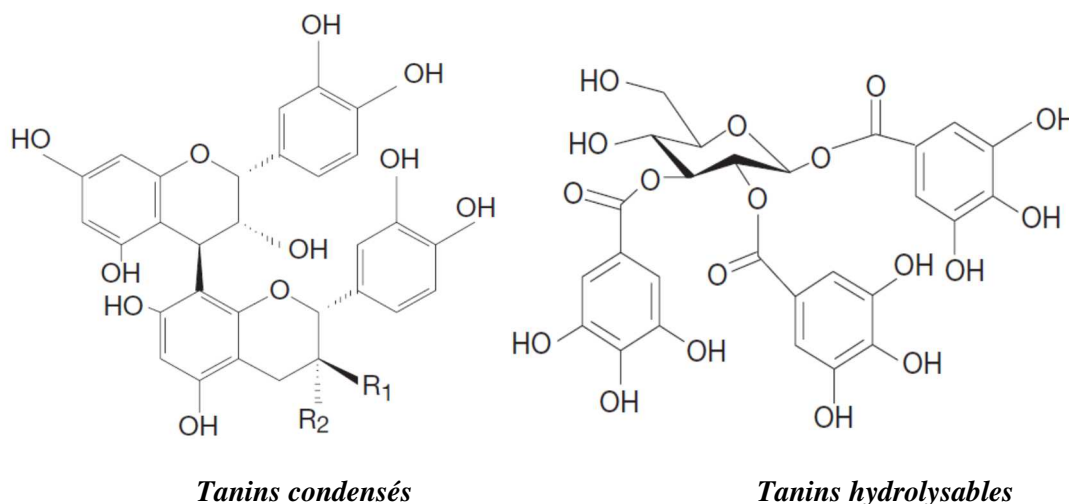
Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Vermerris & Nicholson, 2006).

I.2.6.2. Tanins condensés

Les proanthocyanidines, également connues sous le nom de tanins condensés, sont des dimères, des oligomères et des polymères de catéchine qui sont liés entre eux par des liaisons

entre C₄ et C₈ (ou C₆). Grâce à la formation de complexes avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables du caractère astringent des fruits et des boissons. Ils diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucres dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Manach et *al.*, 2004).

Les polymères de ces tanins se forment sous l'action d'acides ou d'enzymes, ils sont constitués généralement de 2 à 50 unités monomériques (Vermerris & Nicholson, 2006).



Figures 09 : Structures chimiques typiques des tanins (Achat, 2013).

I.3. Biosynthèses des produits phénoliques

La biosynthèse des polyphénols se fait par des voies principales qui sont :

I.3.1. La voie de Shikimate

La majorité des polyphénols dérive directement de la voie Shikimate (Collin & Crouzet, 2011). Dans les conditions normales de croissance, 20% du carbone fixé par les plantes passe par la voie du shikimate. Cette dernière lie le métabolisme des carbohydrates à la voie de biosynthèse des composés aromatiques en conduisant à la synthèse de la structure de base, le noyau aromatique.

Dans une succession de sept étapes métaboliques (Figure 10), le phosphoénolpyruvate (un intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose-4-phosphate (un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate, le précurseur des acides aminés aromatiques. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C₆-C₁) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone, qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins

condensés (Dewick, 1995). En plus de la phénylalanine, tous les intermédiaires de la voie peuvent-être considérés comme des points de branchements vers d'autres voies métaboliques.

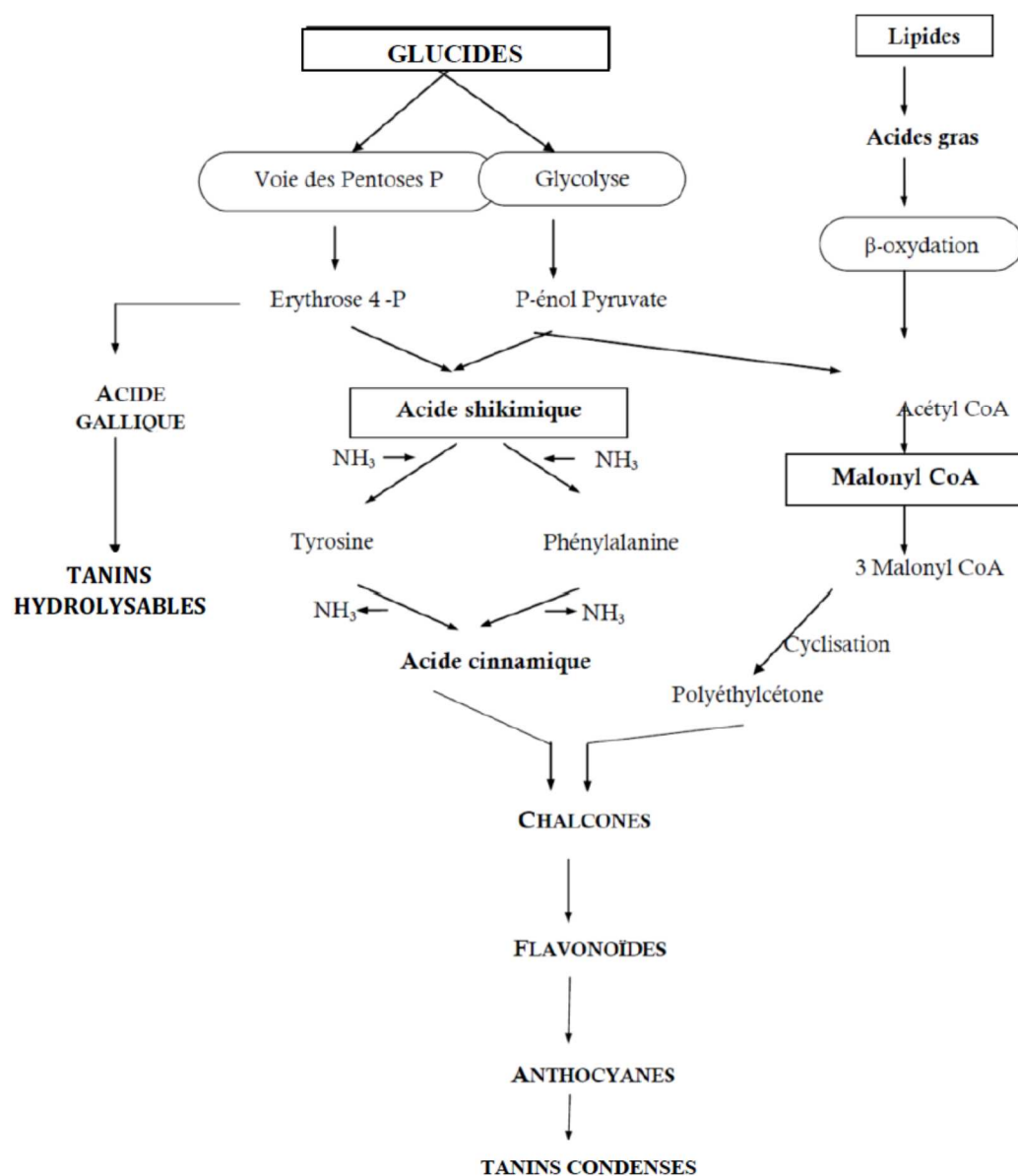


Figure 10 : Voies de biosynthèse des polyphénols (Chaouch, 2014)

I.3.2. La voie des phénylpropanoïdes

Bien que la formation de composés particuliers (alcaloïdes, coumarines...etc.) puisse passer par des voies différentes, la désamination de la phénylalanine est une première étape primordiale de la biosynthèse de l'immense majorité des composés phénoliques naturels.

La désamination de la phénylalanine conduit à la formation de l'acide cinnamique, molécule non encore phénolique (le premier phénylpropane formé) mais qui est directement à l'origine

de la séquence biosynthétique, généralement dénommée voie des phénylpropanoïdes, permettant le lien entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. Cette voie conduit directement à la formation des acides hydroxycinnamique, p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Bruneton, 2009 ; Merlin, 2015).

I.3.3. La voie de l'acide malonique

Cette voie conduit à la formation de peu d'acides phénoliques. Elle consiste en la polymérisation de l'acétyl-CoA, produit issu des processus cataboliques de la glycolyse et de la β -oxydation, en malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités «Acétate» qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA (Figure 10). Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Chaouch, 2014 ; Merlin, 2015).

I.4. Propriétés chimiques des composés phénoliques

La connaissance des propriétés chimiques des composés phénoliques doit pouvoir aider à interpréter leurs propriétés biologiques, d'autre part les propriétés chimiques sont constamment mises en œuvre pour l'étude des produits naturels, dans la révélation des chromatogrammes comme dans le dosage de ces substances (Ribéreau-Gayon, 1968), et l'interprétation de leur impact sur la santé humaine. Leurs principales caractéristiques sont citées ci-dessous.

I.4.1. Nucléophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH. Cette nucléophilie permet des réactions de substitutions électrophiles aromatiques (Nkhili, 2009).

Cette propriété est une perspective prometteuse dans le domaine d'étude des effets des polyphénols sur la santé par la participation des polyphénols dans la régulation de l'expression des gènes, éventuellement par des interactions directes avec des récepteurs et des facteurs nucléaires (Dangles, 2006).

I.4.2. Chélation des ions métalliques

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (Nkhili, 2009). Le processus de chélation des ions

métalliques peut-être crucial dans la prévention de la génération des radicaux libres, qui endommagent les biomolécules cibles. Les polyphénols ayant un 1,2-dihydroxy, un α -hydroxycéto ou β -hydroxycéto, substituent des chélates avec des ions métalliques tels que Fe^{3+} et Al^{3+} (Dangles, 2006).

I.4.3. Propriétés réductrices

Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son potentiel d'ionisation est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant.

Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes, sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes ($\text{ROO}\cdot$), alkoxydes ($\text{RO}\cdot$) et hydroxyle par transfert d'hydrogène (Nkhili, 2009).

Les antioxydants sont interdépendants. En donnant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent se rééquilibrer, autrement dit être réduits.

I.4.4. Complexation des protéines

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines, via des interactions de Van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons (groupements OH phénoliques) hydrogènes. Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes et sont vraisemblablement à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes (Achat, 2013).

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes avec un cycle C insaturé, noyaux aromatiques polarisables non polaires, peuvent développer de fortes interactions de dispersion. En solution aqueuse, ces interactions sont renforcées par la désolvatation partielle des surfaces lors de la liaison hydrophobe.

De plus, le groupe OH phénolique peut agir comme donneur d'hydrogène (via son proton acide) et un accepteur d'hydrogène (via la paire non conjuguée du noyau phénolique). Compte tenu de la propension intrinsèque du noyau phénolique pour développer des interactions moléculaires, il n'est pas surprenant que des exemples de complexation flavonoïde-protéines soient nombreuses et concernent une grande variété de protéines (Dangles, 2006).

I.4.5. Polarisabilité

La combinaison des interactions de dispersion et de l'effet hydrophobe constitue la principale force motrice pour la complexation moléculaire des phénols dans l'eau. La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Van der Waals) avec autres composés polarisables. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable tel qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe (Nkhili, 2009 ; Boubekri, 2014).

I.5. Les composés phénoliques et la physiologie des plantes

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans son utilisation par l'homme (Macheix et *al.*, 2005). Ils peuvent en effet intervenir dans plusieurs mécanismes.

I.5.1. Réponse au stress biotique et abiotique

Les composés phénoliques sont souvent produits et accumulés dans les tissus végétaux exposés au stress et aux attaques pathogènes. La concentration d'un composé phénolique particulier dans un tissu de plante dépend de la saison et peut également varier à différents stades de la croissance et du développement.

Plusieurs facteurs internes et externes, y compris le traumatisme, la blessure, la sécheresse et l'attaque des pathogènes, affectent la synthèse et l'accumulation des composés phénoliques. La photo-inhibition, ainsi que les stress nutritionnels, tels que les carences en azote, phosphate, potassium, soufre, magnésium, bore et fer, déclenchent également la synthèse de composés phénylpropanoïdes chez certaines espèces végétales. En outre, la biosynthèse des composés phénoliques dans les chloroplastes et leur accumulation dans les vacuoles sont améliorées par exposition à la lumière (Bhattacharya et *al.*, 2010).

I.5.2. Rôle de défense

Les plantes sont exposées à de nombreux ravageurs et pathogènes dans leur environnement naturel. Une réponse appropriée à l'attaque par de tels organismes peut conduire à des mécanismes de tolérance ou de résistance qui permettent à la plante de survivre. La plupart des plantes produisent une large gamme de métabolites secondaires qui sont toxiques pour les pathogènes et les herbivores, soit dans le cadre d'un programme normal de croissance et de

développement, soit en réponse au stress biotique (Daayf & Lattanzio, 2009). Aussi certains composés phénoliques sont des antimicrobiens bien connus (Shalaby & Horwitz, 2014). Les phénols agissent comme composés antimicrobiens en raison de leur capacité de perturber de manière non spécifique l'intégrité structurelle de la membrane des bactéries et d'inhiber spécifiquement les enzymes bactériennes impliquées dans le transport (Bhattacharya et *al.*, 2010).

1.5.3. Rôle de communication

Beaucoup de métabolites secondaires se comportent comme des signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement.

En effet, plusieurs études suggèrent que les composés phénoliques influencent le pool et le flux des nutriments inorganiques et organiques du sol. Les polyphénols pénètrent dans le sol principalement sous forme de lixiviats provenant de la partie supérieure et de la partie inférieure de la plante et/ou de la litière végétale au-dessus et au-dessous du sol. Ce mécanisme permet de déterminer la composition de nutriments biodisponibles en affectant directement la composition et l'activité des communautés intervenant dans la décomposition de la matière dans le sol (Lattanzio et *al.*, 2006).

1.5.4. Les composés phénoliques comme pigments

Un des rôles important des flavonoïdes est d'émettre des signaux visuels sous forme de pigments pour les animaux afin d'attirer les pollinisateurs vers les fleurs, et les animaux aux fruits, aidant ainsi à la dispersion des graines. Les anthocyanines sont principalement responsables des couleurs pourpres et rougeâtres dans les plantes. Plusieurs facteurs différents peuvent affecter la couleur finale du fruit ou de la fleur.

Les chalcones et les auronnes sont deux classes de flavonoïdes qui contribuent à la couleur jaune de la fleur dans un certain nombre de plantes. Enfin, la plupart des pigments phénoliques naturels sont des quinones : les benzoquinones, les naphthoquinones et les anthraquinones (Lattanzio et *al.*, 2006).

1.5.5. Biotransformation des xénobiotiques

La détoxification des xénobiotiques implique généralement la modification de ces composés par transfert de groupes polaires ou réactifs. Le composé modifié est ensuite conjugué avec une espèce chargée, tel que le sulfate de glutathion (GSH), et métabolisé par les glutathion S-

transférases (GST), les γ -glutamyl transpeptidases et les dipeptidases en molécules facilement éliminables comme l'acétylcystéine conjuguée ou les acides mercapturiques (Bhattacharya et *al.*, 2010).

Les composés phénoliques sont dotés de pouvoir antimicrobien. Il est donc naturel que les bactéries neutralisent ou même annulent ces composés toxiques par biotransformation. Les bactéries sont dotées de la capacité de dégrader et d'utiliser les composés phénoliques toxiques en tant que source de carbone. Les mécanismes de détoxification des composés phénoliques sont donc étroitement associés à ceux impliqués dans l'établissement des interactions plantes-bactéries (Bhattacharya et *al.*, 2010).

I.6. Méthode d'étude des composés phénoliques

Deux facteurs majeurs jouent un rôle essentiel dans la recherche des produits naturels. Ce sont la séparation et la purification des constituants bioactifs dans les échantillons de plantes brutes ou leurs fractions obtenues à partir de différentes sources naturelles, et leur identification structurale précise (Patel et *al.*, 2010).

I.6.1. Méthodes d'extraction

L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété des composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (Antolovich et *al.*, 2000).

Ainsi, afin de protéger les composés phénoliques contre les processus de détérioration pendant l'extraction, l'ajout d'antioxydants et le travail dans des conditions d'atmosphère inerte sont proposés comme solution. La fidélité entre le profil phénolique du produit de départ et celui de l'extrait obtenu est un paramètre important qui doit être pris en considération. Par conséquent, les conditions utilisées devraient être douces afin d'éviter l'oxydation, la dégradation thermique et d'autres changements chimiques et biochimiques dans les échantillons naturels. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des polyphénols à partir des plantes :

Méthodes classiques

La macération, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Cette procédure, malgré les temps long d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques qui sont sensibles aux changements de température (Spigno & De Faveri, 2007).

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Elle est relativement peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients.

Méthodes alternatives

Actuellement il y a une demande croissante concernant la mise au point de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution.

Des procédés d'extraction alternative existent, comme l'extraction assistée par ultrason, l'extraction assistée par micro-onde, l'extraction accélérée par solvant et l'extraction par fluide supercritique, sont considérées comme des eco-extractions (D'Alessandro, 2013).

I.6.2. Méthodes de dosage et d'identification des composés phénoliques

Les extraits végétaux bruts contiennent généralement un mélange complexe de différents constituants bioactifs. Parmi eux, les métabolites secondaires sont largement utilisés pour la préparation de médicaments à base de plantes. La détection rapide et précise des composés phytochimiques bioactifs est cruciale dans l'étude phytochimique des échantillons des plantes brutes.

De nombreuses méthodes spectrophotométriques ont été développées pour la quantification des composés phénoliques. La méthode de Folin-Denis est la méthode la plus largement utilisée pour la quantification des composés phénoliques totaux dans les plantes, mais la méthode de Folin-Ciocalteu est aussi largement utilisée (Naczki & Shahidi, 2006). La méthode de la vanilline est d'usage pour la quantification des proanthocyanidines totaux dans les plantes.

Les réactifs des méthodes de Folin et de la vanilline ne sont pas spécifiques et peuvent interférer avec des substances absorbant dans l'UV telles que des protéines, des acides nucléiques et des acides aminés. Les méthodes spectroscopiques traditionnelles peuvent conduire à une surestimation des composés phénoliques présents dans les extraits en raison du chevauchement des réponses spectrales (Naczka & Shahidi, 2006).

Les techniques chromatographiques contribuent de manière significative dans le domaine des produits naturels, notamment en ce qui concerne l'identification, la séparation et la caractérisation des composés bioactifs d'origine végétale.

Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance, les séparations chromatographiques sur papier, couches minces ou sur colonnes avaient été largement développées pour l'analyse des composés phénoliques, ainsi que la séparation par électrophorèse sur papier. Ces techniques gardent encore un certain intérêt pour réaliser une première approche qualitative concernant un matériel végétal inconnu (Macheix et *al.*, 2005).

L'application de la chromatographie liquide est l'estimation qualitative ou quantitative d'une composition particulière d'échantillons obtenus à partir de sources naturelles. C'est une technique analytique robuste principalement utilisée pour l'analyse qualitative de classes non volatiles de composés tels que les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes (Harborne, 1998). Elle est très efficace et offre une séparation analytique (Chen et *al.*, 2012 ; Long et *al.*, 2014).

Un criblage efficace des extraits des plantes peut être effectué avec des dosages biologiques et des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en combinaison avec diverses méthodes de détection. La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-SM) est une variante de cette technique, offrant une identification efficace et typique des composés phénoliques. La plupart des méthodes LC-MS pour la séparation des composés phénoliques dans les échantillons de plantes sont basées sur la séparation en phase inverse (RP-LC ou RP-HPLC), en utilisant principalement la colonne C18 et les phases mobiles aqueuses (Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2010).

Chapitre II :
Activité biologique des plantes

Le règne végétal offre une large gamme de composés présentant des activités biologiques diverses. Les polyphénols sont considérés comme d'excellents antioxydants naturels. Ils sont largement distribués et peuvent être considérés comme les métabolites secondaires végétaux bioactifs les plus abondants avec des structures et des activités très diversifiées.

II.1. Propriétés antioxydantes

Les plantes contiennent des concentrations élevées de nombreux antioxydants redox-actifs, tels que les polyphénols, les caroténoïdes, les tocophérols, le glutathion, l'acide ascorbique et les enzymes ayant une activité antioxydante, qui combattent les dommages oxydatifs dangereux des composants des cellules végétales (Pisoschi et *al.*, 2009).

II.1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et des métabolites réactifs, appelés oxydants ou ERO (espèces réactives de l'oxygène), et leur élimination par des mécanismes protecteurs appelés antioxydants. Ce déséquilibre endommage les biomolécules importantes des cellules, avec un impact potentiel sur l'organisme entier (Ďuračková, 2010).

Le stress oxydatif est un phénomène associé à l'action des radicaux libres et aux métabolites réactifs dans l'organisme.

II.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être définis comme des molécules ou des fragments de molécules contenant des électrons libres. La présence d'électrons inutilisés confère un degré de réactivité considérable sur un radical libre (Valko et *al.*, 2006). La production de radicaux libres peut-être endogène. En effet la formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et nécessaire à la vie, mais les excès dépendent des facteurs extérieurs tels que le stress, la fatigue et les exercices physiques intenses (Bakasso, 2009).

Ils sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux, tels que, le tabac, la pollution, le soleil, les rayons ultra-violets, les radiations ionisantes, un effort physique intense, le stress, une mauvaise alimentation, la consommation d'alcool, les fibres d'amiante, les pesticides, etc. (Afonso et *al.*, 2007).

Les plantes peuvent aussi engendrer délibérément des ERO comme étant des molécules signal afin de contrôler de nombreux phénomènes : comme la défense contre des pathogènes (stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique (Apel & Hirt, 2004).

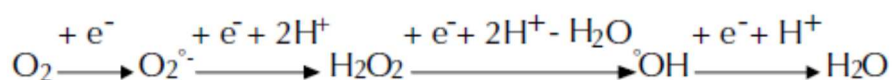
Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ERA). Les composés chimiques dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante de ces espèces générées dans les systèmes vivants.

II.1.2.1. Espèces réactives à l'oxygène

Les organismes aérobies puisent leur énergie en oxydant de la matière organique via la chaîne respiratoire. L'oxygène est indispensable comme substrat majeur, mais peut-être également une source d'agression pour ces organismes.

Les ERO sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le peroxyde ROO^{\bullet} et alkyle RO^{\bullet} ; soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2) (Saffidine, 2015).

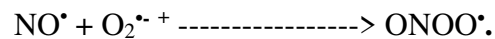
L'anion superoxyde (O_2^-) est la forme primaire des ERO structuré par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). Il peut ensuite être converti en ERO secondaires tels-que le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier n'étant toutefois pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non paires.



II.1.2.2. Espèces réactives à l'azote

Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et le péroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) sont deux espèces réactives bien connues issues de l'azote. Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les nitrique oxyde synthases (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Il est caractérisé par une réactivité limitée et une demi-vie de quelques secondes. Il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires (Blanc et *al.*, 2005).

Le monoxyde d'azote se combine aisément avec l' O_2^- pour former le peroxynitrite.



Ces derniers ont une demi-vie plus prolongée, il peut donc causer des dommages cellulaires des lipides, composant les membranes mitochondriales, altérer les canaux sodiques et favoriser la perméabilité vasculaire et la formation d'œdème.

Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives (Bouchouka, 2016).

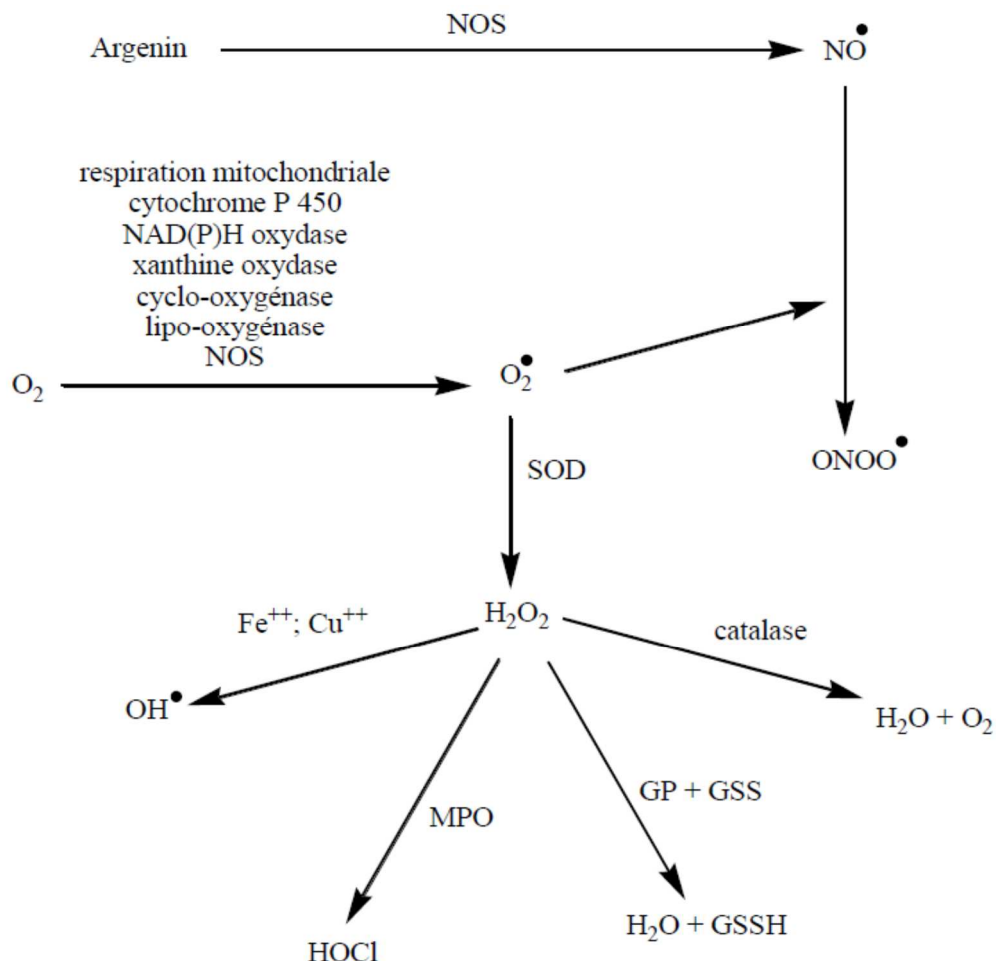


Figure 11 : Processus de formation des espèces réactives (Nkhili, 2009).

NOS = NO synthase ; SOD = superoxyde dismutase ; MPO = méthylperoxydase ; GP = glutathionperoxydase ; GSS = glutathion réduit ; GSSH = glutathion oxydé ; ONOO peroxynitrite ; H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène ; O₂ = anion superoxyde ; OH : radical hydroxyl ; HOCl = acide hypochloride.

II.1.3. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

Des concentrations élevées en ERO peuvent être un important médiateur de dommages des structures cellulaires, des acides nucléiques, des lipides et des protéines (Valko et *al.*, 2006).

Les ERO, de par leur nature instable, sont particulièrement réactionnelles et seront capables de provoquer des dégâts cellulaires importants. En effet, elles peuvent :

- Inactiver des protéines et des enzymes,
- Oxyder les sucres (glucose),
- Provoquer des cassures et des mutations au sein de l'ADN,
- Induire des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras polyinsaturés des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire (Heim et *al.*, 2002).

Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies associées directement aux radicaux libres (Aruoma, 1998). Ces derniers, contribuent au vieillissement cellulaire, à la mutagenèse, à la carcinogenèse, aux maladies coronariennes, aux pathologies cardio-vasculaires, au diabète, à la dystrophie musculaire et à la neurodégénérescence (Zou et *al.*, 2008).

II.1.4. Systèmes de défense antioxydants

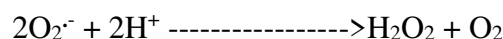
Selon Dontha et *al.* (2016), un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'une autre molécule. Il brise la chaîne de réactions des radicaux libres en sacrifiant leurs propres électrons pour nourrir les radicaux libres, sans devenir eux-mêmes des radicaux libres. Afin de combattre et de neutraliser les effets délétères des ERO, diverses stratégies antioxydantes existent, soit en augmentant les défenses enzymatiques antioxydantes endogènes, soit en renforçant les défenses non enzymatiques par des moyens diététiques ou pharmacologiques.

II.1.4.1. Endogène : antioxydants enzymatiques

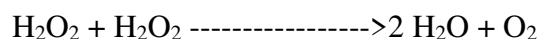
La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces pour l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente (Chaouch, 2014).

Les principales enzymes antioxydantes sont : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la glutathion S-transférase. Ce sont des enzymes dont les séquences sont très conservées au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée.

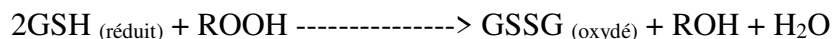
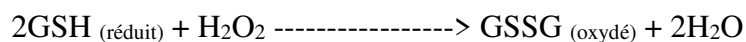
- Les superoxyde dismutases : catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, laquelle sera décomposée par la catalase (Arisi et *al.*, 1998 ; Bouchouka, 2016).



- La catalase : catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci (Nicholls, 2012 ; Péry & Garric, 2017).



- Les glutathion peroxydases : réduisent aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme substrat le GSH, qui ressort oxydé de ces réactions et pourra être réactivé par la glutathion réductase (Valko et *al.*, 2006 ; Péry & Garric, 2017).



Il existe également d'autres défenses antioxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métallothionéines. Ces dernières sont des enzymes qui en se complexant aux métaux limitent leur disponibilité dans le processus de génération des radicaux libres. Enfin, les enzymes de réparation des molécules endommagées par les ERO peuvent également être considérées comme des défenses antioxydantes (méthionine sulfoxyde réductases, endonucléases, ADN glycosylases) (Béguel., 2012).

II.1.4.2. Exogène : antioxydants non enzymatiques

Il Consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense endogène. Ce sont des molécules exogènes, c'est à dire qu'on ne les trouve pas spontanément dans l'organisme.

Les antioxydants tels que les vitamines (A, E et C), les β -carotène, lycopenne, ubiquinol, bilirubine, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, certains polyphénols (les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones), et certaines

huiles essentielles, constituent la seconde source de défense de l'organisme contre les radicaux libres (Heim et *al.*, 2002 ; Bakasso, 2009).

Les mécanismes d'action des antioxydants naturels sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition (Favier, 2006).

Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au sein des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques (Nkhili, 2009).

Tableau 01 : Les principaux antioxydants endogènes et exogènes (Ďuračková, 2009).

Antioxydants endogènes et exogènes	
Poids moléculaire élevé	Faible poids moléculaire
Superoxydes dismutases	Acide urique
Glutathion peroxydase	Acide ascorbique
Catalase	Acide lipoïque
Albumine	Glutathion
Transferrine	Tocophérol (vitamine E)
Métallothionéines	Ubiquinole
	Flavonoïdes

II.1.5. Pouvoir antioxydant des polyphénols

Ces dernières années, un intérêt croissant a été observé pour les antioxydants naturels. La littérature reconnaît que le remplacement des antioxydants synthétiques par des antioxydants naturels peut avoir plusieurs avantages et une grande partie de la recherche sur les antioxydants naturels a porté sur les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes comme sources potentielles d'antioxydants naturels (Dontha et *al.*, 2016).

Ces substances sont très utilisées en médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes. Vu leurs propriétés redox élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (Rice-Evans et *al.*, 1996 ; Valko et *al.*, 2006).

Inhibition enzymatique :

Les polyphénols sont capables d'inhiber l'activité de certaines enzymes, en formant des complexes avec les protéines grâce surtout à leurs groupes fonctionnels. Les phénomènes

d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes (Arts et *al.*, 2001).

Chélation des ions métalliques :

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants (Tsao, 2010).

Piégeage des radicaux libres :

Les antioxydants de type phénolique, réagissent selon le mécanisme impliquant le transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées.

Transfert de proton (HAT)



Transfert d'électron (SET)

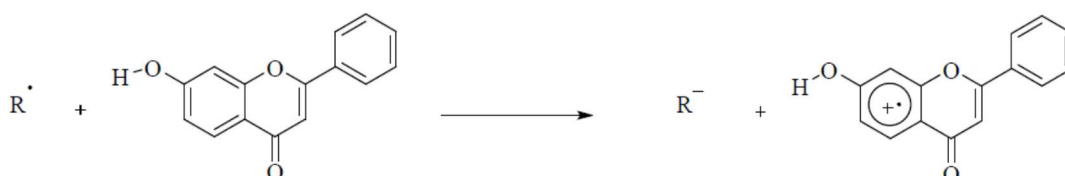


Figure 12 : Mécanisme d'action antiradicalaire des polyphénols (Rezaire, 2014).

Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, en fin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu.

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols, notamment les flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres. Il existe trois sites de coordination potentiels (Figure 13) dans la structure de plusieurs flavonoïdes :

- Entre le groupe 5-hydroxy et le groupe 4-carbonyle,
- Entre le groupe 3-hydroxy et le groupe 4-carbonyle,

- Entre le groupe 3', 4'-hydroxy dans l'anneau B.

Les complexes métal-flavonoïdes ont des propriétés de piégeage des radicaux libres beaucoup plus fortes que les flavonoïdes libres. De plus, ils jouent un rôle important dans la protection contre le stress oxydatif (Symonowicz & Kolanek, 2012).

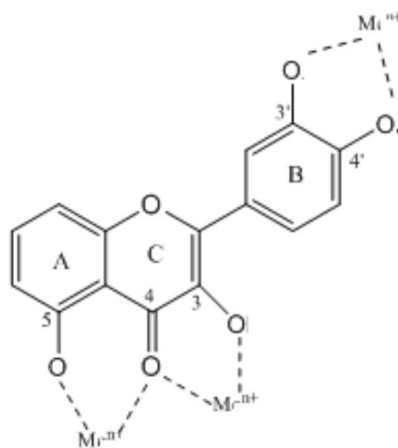


Figure 13 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Van Acker et *al.*, 1996).

II.2. Activité antimicrobienne

L'utilisation de plantes supérieures et de leurs extraits pour traiter les infections est une pratique ancienne en médecine traditionnelle. De nombreuses plantes ont été utilisées en raison de leurs caractéristiques antimicrobiennes, qui sont principalement dues aux composés du métabolisme secondaire de la plante. Des remèdes traditionnels à base de plantes ont été longtemps employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (Parekh & Chanda, 2007).

Par conséquent, ces plantes devraient être étudiées pour mieux comprendre leurs propriétés, leur innocuité et leur efficacité, pour lutter contre le phénomène de résistances aux antibiotiques et leur utilisation intempestive.

II.2.1. Principaux groupes de composés phénoliques antimicrobiens

II.2.1.1. Les acides phénoliques

Les phénols simples et les acides phénoliques possèdent des activités antivirale, antibactérienne et antifongique (Brantner et *al.*, 1996). En général, l'effet antimicrobien des

dérivés d'acides phénoliques augmente avec la longueur croissante de la chaîne alkyle et le nombre de groupements hydroxyle (Cowan, 1999).

Le catéchol et le pyrogallol sont tous les deux des phénols hydroxylés, toxiques pour les microorganismes. Le catéchol, a deux groupes OH, et le pyrogallol en a trois. Le site et le nombre de groupes hydroxyles sur le groupe phénol sont censés être liés à leur toxicité relative vis-à-vis des micro-organismes, une hydroxylation accrue entraîne une toxicité accrue (Cowan, 1999). En outre, certains auteurs ont constaté que plus fortement les phénols sont oxydé, plus ils seraient inhibiteurs

II.2.1.2. Les flavonoïdes

Comme ils sont connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne, il ne devrait pas être surprenant de constater *in vitro*, qu'ils soient des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de microorganismes (Cowan, 1999).

Leur activité antibactérienne est probablement due à leur capacité à complexer les protéines extracellulaires et solubles et avec les parois cellulaires bactériennes.

II.2.1.3. Les tanins

Plusieurs études ont décrit les propriétés antibactériennes des tanins. Chung & Wei (2001), ont trouvé que l'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines, ainsi que différentes levures incluant *Saccharomyces cerevisiae*.

Les différents mécanismes proposés jusqu'ici pour expliquer l'activité antimicrobienne comprennent l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne ou l'action directe sur le métabolisme microbien par inhibition de la phosphorylation oxydative. Selon Scalbert (1991), un autre mécanisme impliquant la privation en fer est proposé. De nombreux microorganismes peuvent surmonter les défenses de la plante à base de tanins. Ils peuvent détoxifier les tanins par la synthèse de polymères en les complexant, ou par la synthèse des sidérophores.

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus ou la membrane de la cellule hôte et par conséquent l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale. Cependant, dans certains cas la fixation cause seulement des changements mineurs à la surface virale, la pénétration reste, mais l'enlèvement de l'enveloppe virale est inhibé. Plusieurs types de virus sont inactivés par les tanins, le virus

herpès simplex (HSV-1, HSV-2) est inhibé par les tanins hydrolysables et les tanins condensés galloylés de plusieurs extraits des plantes (De Bruyne et *al.*, 1999).

II.2.1.4. Les quinones

Les quinones sont ubiquitaires et possèdent généralement des propriétés antimicrobiennes. Leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires.

Kazmi et *al.* (1997), décrivent une anthraquinone de *Cassia italica*, un arbre pakistanais, bactériostatique pour *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* et *Pseudomonas aeruginosa*, et bactéricide pour *Pseudomonas pseudomallei*.

Aljabre et *al.* (2005), ont décrit le thymoquinone isolé de l'extrait de *Nigella sativa* comme responsable des propriétés antidermatophytiques de cette plante vis-à-vis de *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccocum* et *Microsporum canis*. L'hypéricine, une autre anthraquinone, isolée de *Hypericum perforatum*, possède également des propriétés antifongiques (Cowan, 1999).

II.2.1.5. Les coumarines

Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui posséderait également des propriétés antivirales (Cowan, 1999).

Nitiema et *al.* (2012), montrent que les coumarines ont une importante activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes*.

II.3. Autres activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour leur activité biologique en relation directe avec la santé de l'être humain. Ils sont utilisés dans la chimiothérapie et dans le traitement de plusieurs types de cancer (Manach et *al.*, 2004). Quelques effets biologiques des polyphénols reconnus par la communauté scientifique sont les suivants :

II.3.1. Maladies inflammatoires

De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation.

Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en polyphénols était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes, et que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme nitrique oxyde synthase, responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est le déclencheur chimique de l'inflammation (Lenoir, 2011 ; Scalbert et *al.*, 2005).

II.3.2. Cancer

Parmi les propriétés biologiques intéressantes des polyphénols, la prévention du cancer (Stagos et *al.*, 2012). Il y a beaucoup de preuves épidémiologiques qu'un régime riche en fruits et légumes pourrait réduire le risque de certains cancers. L'effet a été attribué, en partie, aux polyphénols naturels. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, ont démontré que les polyphénols naturels pouvaient être utilisés pour la prévention et le traitement du cancer. (Stagos et *al.*, 2012 ; Zhou et *al.*, 2016).

Ils ont la capacité d'interrompre ou d'inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules du réseau de signalisation intracellulaire impliquées dans l'initiation et/ou la promotion d'un cancer pour arrêter ou inverser la phase de progression du cancer. Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire (Link et *al.*, 2010).

II.3.3. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans le monde. Il est largement admis que le stress oxydatif joue un rôle clé dans leur développement et leur progression ; par conséquent, les dommages oxydatifs pourraient être abrogés par des antioxydants. Les polyphénols sont des composés phytochimiques présentant des propriétés antioxydantes étudiées de façon extensive *in vivo* (Gormaz et *al.*, 2016).

Les données épidémiologiques suggèrent une association entre la consommation de légumes riches en polyphénols et la réduction de la prévalence des maladies cardiovasculaires. Ce fait pourrait être lié aux effets anti-inflammatoires, antithrombotiques et vasodilatateurs des polyphénols (Manach et *al.*, 2005 ; Gormaz et *al.*, 2016).

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, la berbérine et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténue l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie (Mulvihill & Huff, 2010).

II.3.4. Maladies neurodégénératives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant, appuyé par un grand nombre d'études expérimentales et épidémiologiques sur les effets bénéfiques de certains produits alimentaires d'usage courant dans la prévention de diverses affections pathologiques liées à l'âge allant du cancer aux maladies neurodégénératives.

Les épices et les herbes contiennent souvent des substances phénoliques actives dotées de puissantes propriétés antioxydantes et chimio préventives. Selon Scapagnini et *al.* (2010), le rôle potentiel du curcuma comme agent préventif contre le vieillissement cérébral et les troubles neurodégénératifs a récemment été renforcé par des études épidémiologiques, montrant qu'en Inde, où cette épice est largement utilisée dans l'alimentation quotidienne, l'incidence de la maladie d'Alzheimer est plus faible qu'aux Etats-Unis.

Les flavonoïdes aussi peuvent agir pour protéger le cerveau de plusieurs façons, notamment en protégeant les neurones vulnérables, en améliorant la fonction neuronale existante ou en stimulant la régénération neuronale. Par exemple, il a été également démontré que les polyphénols protègent les neurones contre le stress oxydatif (Vauzour et *al.*, 2010).

Chapitre III :
Gleditsia triacanthos L

Nous présentons dans ce chapitre une description botanique, et phytochimique de l'arbre étudié, ainsi que les données justifiant le choix porté à l'étude de cette plante.

III.1. L'ordre des Fabales

Les Fabales constituent un ordre de plantes dicotylédones. Ce sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou des lianes. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont & Guignard, 2012).

L'ordre des Fabales renferme 4 familles. Les caractéristiques morphologiques de ses espèces en font de cet ordre un groupe homogène. Selon l'Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009), il est constitué de quatre principales familles :

- Les Fabaceae,
- Les Polygalaceae,
- Les Surianaceae,
- Les Quillajaceae.

Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Gleditsia triacanthos*.

III.2. Les Fabaceae

III.2.1. Systématique de la famille des Fabaceae

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques et par les données phylogénétiques. En classification classique de Cronquist, les Fabales renferment les sous-familles suivantes : Caesalpiniacées, Mimosacées et Fabaceae ou Papilionacées, qui sont considérées comme des familles. Alors que dans la classification d'Engler, le terme «Leguminosae » est utilisé pour désigner la famille (Tableau 02). Dans la classification phylogénétique APG III (2009), cet ordre a été modifié depuis, et quatre familles lui sont maintenant rattachées :

- Les bauhinioïdes,
- Les caesalpinoïdeae,
- Les mimosoïdeae,
- Les papilionoïdeae ou Faboïdeae.

Actuellement le terme Fabaceae, désigné par l'APG, est couramment employé dans la nouvelle classification systématique.

Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales (Doyle & Luckow, 2003).

Tableau 02 : Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétiques ou morphologiques (Boutaghane, 2013).

	<i>Engler (1887-1915)</i>	<i>Cronquist (1988)</i>	<i>APG III (2009)</i>
Règne	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermathophyta
Sous embranchement	Angiospermae	-	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Eudicotyledonae
Sous classe	Archichlamideae	Rosidae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Eurosidae I (= Fabidées)
Sous ordre	Legumino세ineae	-	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae (= Papilionaceae) Mimosaceae Caesalpinaceae	Fabaceae (= Leguminosae)
Sous famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae	-	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae

III.2.2. Description botanique

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs. C'est une famille extrêmement vaste. La famille botanique des Fabaceae (de famba, la fève), représente la troisième famille angiospermes par le nombre, après les composées (Astéracées) et les orchidées (Schneider & Huyghe, 2015). Elle doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination sous laquelle elle est le plus connue : les légumineuses.

Les légumineuses sont caractérisées par

- Des fleurs papilionacées (en forme de papillon) pour la plupart des espèces cultivées,
- Une gousse contenant des graines (la gousse étant le fruit issu de l'ovaire de la fleur),
- La capacité d'utiliser l'azote atmosphérique (N₂) pour produire ses propres composants protéiques, observée pour la majorité des membres de cette famille.

Elle comporte plus de 19400 espèces et 730 genres, distribués à travers le monde dans de nombreux écosystèmes écologiques. Leur métabolisme dépendant de l'azote est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat (Wojciechowski *et al.*, 2004 ; Lewis *et al.*, 2005).

En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Les espèces de la famille des Fabaceae possèdent des feuilles généralement alternes, trifoliolées et stipulées. Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées avec des fleurs hermaphrodites et zygomorphes habituellement pentacycliques et pentamères, sauf au niveau du gynécée qui est uniloculaire. L'androcée compte dix étamines, et toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate. Le fruit s'ouvre à maturité (Quezel & Santa, 1962 ; Ozenda, 1983 ; Bruneton, 2009 ; Dupont & Guignard, 2012 ; Botineau, 2010).

Les fruits des Fabaceae présentent une large variabilité quant à la forme du fruit qu'elles produisent, communément appelé "gousses", il est charnu, plus ou moins allongé, le fruit dérive d'un seul carpelle. Les Fabaceae ont souvent une seule loge, uniloculaire (Schneider & Huyghe, 2015).

III.2.3. Répartition géographique des Fabaceae

La famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats. Ses espèces vont des herbes naines de l'arctique et des montagnes aux immenses arbres de la forêt tropicale, la famille est à distribution cosmopolite terrestre (excepté en antarctique) et bien représentée à travers le monde (Figure 14) entre les régions tempérées et les régions tropicales (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Parmi les trois sous-familles, les Mimosoideae et les Caesalpinoideae sont pour la plupart des plantes tropicales, tandis que les Papilionaceae sont présentes dans les régions tropicales et tempérées (Trease & Evans, 2002).

La préférence des Fabaceae aux habitats arides à semi-arides est liée à la demande du métabolisme de l'azote, qui est considéré comme une forme d'adaptation aux variations climatiques (Sprent & McKey, 1995).



Figure 14 : Carte de répartition de la famille des Fabaceae (zone ombrée) à travers le monde (Heywood, 1996).

III.2.4. Intérêts écologiques et économiques des Fabaceae

Les cultures des légumineuses représentent un intérêt alimentaire majeur. C'est la deuxième famille d'importance alimentaire après les Poaceae, en fournissant en grande partie des glucides (source d'énergie métabolique) et des protéines (sources d'éléments constitutifs et régulateurs), mais également une panoplie d'éléments variés selon les espèces (lipides, fibres, éléments minéraux, vitamines) pour l'alimentation des hommes (haricot, pois, fève, soja) et des animaux, tels que le trèfle, la luzerne et le sainfoin (Schneider & Huyghe, 2015).

C'est un des plus importants groupes de plantes pour l'homme sur le plan économique, servant de cultures, de fourrages, d'engrais vert et produisant un grand nombre de composés chimiques utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures, des parfums, des pâtes pour la production de papier, des gommes, des résines ainsi que des sources de tanins. En outre, il existe de nombreuses plantes médicinales bien connues dans cette famille (Harborne et *al.*, 1971 ; Boumaza, 2006).

Dans l'industrie, les fabaceae sont utilisées pour produire des huiles alimentaires, leurs fibres et leurs bois comme combustible. Certaines cultures sont utiles pour les élevages industriels.

Beaucoup d'espèces de Fabaceae sont cultivées dans le monde entier comme espèces ornementales (dans les jardins, comme des arbres d'ombre).

L'intérêt agronomique des fabaceae, dites plantes améliorantes, consiste à leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique par des nodules, grâce à quoi, les Fabaceae peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée.

En plus de leur rôle dans le cycle de l'azote, leur production interagit avec d'autres cycles biogéochimiques comme ceux relatifs au phosphore ou aux xénobiotiques. La présence de légumineuses dans les systèmes de production agricoles concourt à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des agroécosystèmes, ce qui est favorable à la biodiversité des paysages et territoires agricoles (Schneider & Huyghe, 2015).

III.2.5. Les métabolites secondaires des Fabaceae

En raison des nombreuses utilisations pratiques, la famille a été largement étudiée pour ses métabolites secondaires. Plusieurs milliers de produits naturels, dont de nombreux uniquement présents dans ces plantes, ont été isolés et caractérisés. Il existe une grande variété de structures chimiques complexes issues de la famille.

Les constituants des légumineuses sont particulièrement des glycosides cyanogénétiques, des saponines, des tanins, du mucilage et des anthocyanes. Les alcaloïdes, sont communs chez les légumineuses (Trease & Evans, 2002).

Bate-Smith (1962), a souligné l'importance des constituants phénoliques dans cette famille. Il a noté que les Fabaceae contiennent des représentants de toutes les classes des composés phénoliques secondaires.

La plupart des composés phénoliques se trouvent dans les feuilles et les fleurs sous forme conjuguée, souvent sous la forme d'un mélange d'O-glycosides et certaines enquêtes se limitent à enregistrer le cas des aglycones plutôt que les glycosides correspondants. Les composés phénoliques y compris les flavonoïdes sont généralement trouvés à l'état libre (Southon et *al.*, 1994).

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement distribués dans les différents tissus des légumineuses et certains sont uniquement présents dans ces plantes. La famille est particulièrement riche en flavonoïdes, produisant environ 28% de tous les flavonoïdes connus et 95% de tous les isoflavonoïdes aglycones (Hegnauer & Grayer-Barkmeijer, 1993).

Les pigments d'anthocyanes sont largement distribués dans les tissus floraux. De même, de nombreux flavones et flavonols glycosylés ont été obtenus à la fois dans les tissus des fleurs et des feuilles.

Les chalcones et les flavanones, deux autres classes de flavonoïdes, ont une distribution plus restreinte dans la famille.

Les isoflavanoïdes sont presque uniques aux légumineuses et la plupart de ces composés sont restreints dans la famille à la sous-famille des papilionoideae. Au sein des légumineuses, parmi 850 composés, 362 isoflavanones, sont connus. Ils se concentrent plutôt dans les écorces, racines et les graines que dans les feuilles et les fleurs (Harborne, 1993).

Les proanthocyanidines, ou tanins condensés se trouvent principalement dans les plantes à arbres de la famille, où elles peuvent être renvoyées dans les feuilles et les écorces. Ces oligomères sont généralement absents des légumineuses herbacées (Southon et *al.*, 1994).

Les alcaloïdes

On sait qu'une variété de plantes légumineuses (lupin, lupin) est toxique pour l'homme ou pour les animaux d'élevage. Les recherches sur ces toxines responsables ont souvent indiqué la présence de métabolites secondaires azotés. Ce sont des glycosides cyanogéniques, des composés nitrés, des acides aminés non protéinogènes ou des alcaloïdes (Harborne, 1993). Une variété d'alcaloïdes végétaux a été enregistrée dans les légumineuses. Les quinolizidines, retrouvés principalement dans les graines du lupin, sont les plus répandus et les plus caractéristiques.

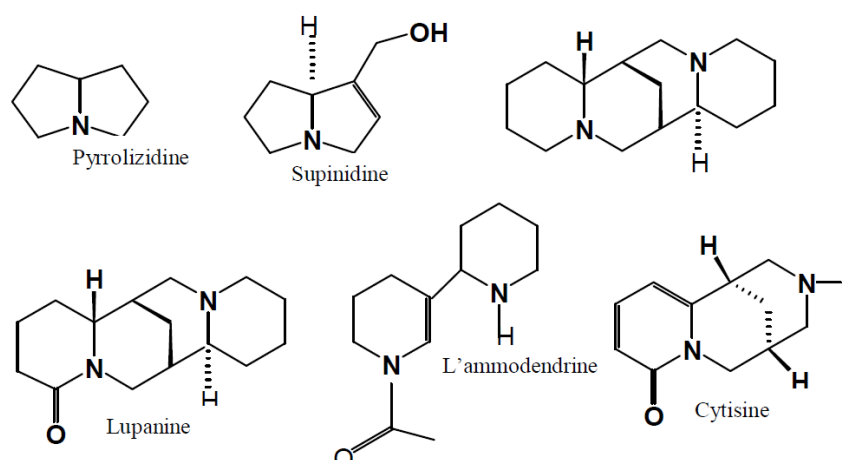


Figure 15 : Structures de quelques alcaloïdes isolés des Fabaceae (Boumaza, 2006).

Des alcaloïdes de quinolizidine ont été trouvés dans cinq tribus de la sous-famille des papilionoidae. Les autres classes d'alcaloïdes de la famille comprennent les pyrrolizidines, les indoles et les isoquinolines (Harborne et *al.*, 1971 ; Kinghorn et *al.*, 1988).

La castanospermine, de *castanospermum* australe, est bien connue en raison de son activité antivirale chez l'homme et de son utilisation possible dans le traitement de la maladie du SIDA (Fellows, 1986).

Les terpénoïdes

Une large gamme de terpénoïdes a été signalée chez les légumineuses. Les constituants les plus caractéristiques sont les acides diterpéniques. Pas moins de 23 gibbérellines (phytohormones) connues ont été rencontrées chez les légumineuses et la plupart d'entre elles sont caractéristiques des légumineuses. Les saponines triterpénoïdes sont largement présentes dans les légumineuses fourragères (Harborne et *al.*, 1971).

Les quinones

Les anthraquinones et les anthrones apparentés, ayant des propriétés purgatives sont principalement concentrés dans les légumineuses avec gousses, dans les feuilles et aux racines des *Cassia* (Thomson, 1971).

III.3. La sous-famille des *Cesalpinoïdae*

III.3.1. Description

Les plantes de cette sous-famille sont majoritairement des arbres ou arbustes tropicaux ou subtropicaux. Si elle est séparée des Fabaceae, cette famille comprend environ 171 genres et environ 2250 espèces, trouvées dans le monde entier (Lewis et *al.*, 2005).

Leurs feuilles sont alternes pennées ou bipennées à stipules. Leurs fleurs sont parfaites ou unisexuées, zygomorphes ou plus ou moins actinomorphes, généralement périgynes, possèdent cinq pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement, ovaire supérieur, leur fruit est appelé légume (Trease & Evans, 2002 ; Mohlenbrock, 2008).

III.3.2. Usage

Nombreuses espèces de *Caesalpinia* sont des sources de teintures et bois. Les arbres comme le redbud (*Cercis occidentalis*), sont utilisés comme arbres ornementaux communs en zone tempérée.

Les médicaments dérivés de cette sous-famille sont les feuilles et les gousses de séné, les gousses de cassia et les tamarins. D'autres produits sont le bois de séquoias de *Haematoxylon* et le bois de sapin de *Caesalpinia*; l'écorce d'*Erythrophleum guineense* et les caroubes de *Ceratonia siliqua*. Les graines de *Caesalpinia bonducella* sont traditionnellement utilisées en médecine indienne pour diverses conditions (Trease & Evans, 2002). Les gousses du Tamarin (*Tamarindus indica*) sont consommées comme fruits frais et à des fins médicinales en Inde.

III.4. Le genre *Gleditsia*

III.4.1. Description

Ce genre est nommé d'abord caesalpinoïdes par Linnaeus. Ce dernier, qui est également connu comme le père de la taxonomie, a donné le nom de ce genre en 1748 en l'honneur de son collègue, Johann Gottlieb Gleditsch, botaniste allemand qui a dirigé les jardins botaniques de Berlin. Il y a une quinzaine d'espèces dans le genre *Gleditsia*, y compris le commun févier d'Amérique (Mohlenbrock, 2008), poussant dans les régions tempérées et tropicales.

Les espèces de *Gleditsia* se trouvent en peuplements naturels dans le nord et le sud d'Amérique, le nord de l'Inde, le long de la mer Caspienne en Azerbaïdjan et en Iran et plusieurs espèces en Asie de l'Est et du Sud-Est (Schnabel et *al.*, 2003).

Les feuilles des espèces de *Gleditsia* sont alternes, une à trois fois pennées, avec de nombreuses folioles. Les fleurs sont en épis, jaune verdâtre, quelques-unes avec des pointes entièrement staminées, gousses ligneuses à plusieurs graines, avec ou sans pulpe entre les graines. Leurs tiges se présentent souvent avec des épines.

Tous les féviers préfèrent une terre franche et légère, une exposition abritée des vents, car leur bois est excessivement cassant. Les plantes de ce genre ne portent pas de nodules racinaires (Putod, 1982).

III.4.2. Intérêt médicinaal du genre *Gleditsia*

Les espèces de *Gleditsia* ont été largement utilisées dans la médecine populaire, elles sont utilisées pour traiter l'anthrax, la gale, les maladies de la peau et pour traiter l'apoplexie, les maux de tête, la toux productive et l'asthme, elles sont aussi diurétiques et expectorantes (Miyase et *al.*, 2010).

Les plantes du genre *Gleditsia*, sont également utilisées comme remèdes traditionnels dans de nombreuses régions, notamment en Chine, pour traiter la rougeole, l'indigestion, la coqueluche, l'arthrolithiase, la constipation, la diarrhée, l'hématochézie, la dysenterie, etc. La compréhension de leur phytochimie et de leur pharmacologie permettra de fournir des opportunités et des recommandations pour les recherches futures (Zhang et *al.*, 2016).

La présence de triterpène saponine C, des triacanthosides, et de lupin dans les fruits de différentes espèces de *Gleditsia*, aurait une activité anti-VIH significative.

III.5. L'espèce *Gleditsia triacanthos*

Le févier d'Amérique (*Gleditsia triacanthos*), un représentant de la famille des légumineuses, ou de celle des césalpiniacées, se nomme aussi en français févier d'Amérique, carouge à miel ou épine du Christ, et en anglais : Honey locust, Horney–shuck, Sweet Locust, Three-thorned-acacia, Thorn tree, Thorny Locust ou Sweet-bean (National Research Council, 1983).

Le nom scientifique 'tricanthos' signifie 3-épines ; du grec 'treis' (trois) et 'akantha' (épine). Cet arbre est communément planté à l'extérieur de son aire naturelle en raison de sa tolérance aux sols alcalins.

III.5.1. Taxonomie

La classification fonctionnelle adoptée pour définir l'espèce *Gleditsia triacanthos* est mentionnée ci-dessous :

Tableau 03 : Classification phylogénétique de l'espèce *Gleditsia triacanthos* L (USDA, 2009).

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	Spermatophyta
Sous-embranchement :	Angiospermes
Clade(s) :	Eudicotylédones, Noyau des Eudicotylédones, Rosidées, Fabidées
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae
Genre :	<i>Gleditsia</i>
Espèce :	<i>Gleditsia triacanthos</i>

III.5.2. Description botanique

Les caractères distinctifs du févier d'Amérique sont ses feuilles composées, pennées et bipennées, ses épines ramifiées et sous ramifiées et ses grosses gousses tortillées. Selon Farrar (1996), les caractéristiques botaniques de *Gleditsia triacanthos* sont illustrées dans la figure 16 et sont comme suit :

Feuille : Caduques, alternes, composées-pennés ou composées-bipennées. Folioles de 25 à 40 cm de longueur, apex arrondi, souvent marqué d'une petite pointe : parfois finement denticulées.

Bourgeon : Bourgeon terminal absent ; rameau à extrémité mortifiée. Bourgeons latéraux petits, disposés en rangées verticales, presque cachés. Cicatrice foliaire en forme de U.

Rameaux : Rameaux long en zigzag, brunâtres : Pousses naines portant les feuilles et les fleurs. Épines lisses, aiguës, rougeâtres, au moins trifurquées, présentes sur le tronc et les tiges.

Fleurs : Blanc verdâtre, régulières, petites, environ 5 mm de diamètre. Fleurs males et fleurs femelles sur un même arbre, souvent sur des branches différentes. Présence éventuelle de fleurs parfaites. Floraison et feuillaison simultanées au printemps. Entomophiles.

Fruits : Gousses de 15 à 40 cm de longueur, aplaties, tortillées, brunâtres ; valves coriaces ; tombant en hiver sans s'ouvrir.

Graines : Réniforme ; tégument imperméable et dur. Viabiles de nombreuses années dans un milieu sec et frais. Tégument pouvant devenir perméable à l'eau par exposition à un milieu humide et frais et par immersion dans l'eau bouillante ou dans un acide fort.

Écorce : Lisse, brunâtre, à lenticelles horizontales, devenant profondément cannelées avec l'âge et couverte de crêtes écailleuses.

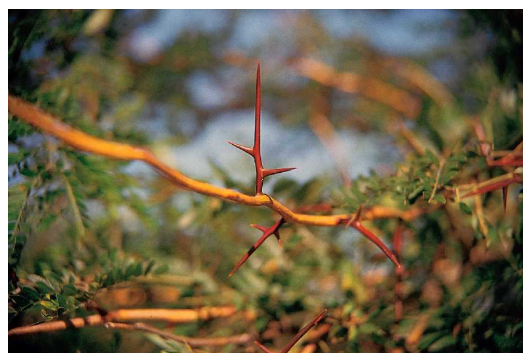
Taille et port : Arbre de dimensions moyennes, atteignant 30 m de hauteur, 90 cm de diamètre et 120 ans. Tronc généralement court, souvent armé de longues épines ramifiées et portant des rejets. Cime large, claire, à sommet aplati. Racines profondes et très étalées ; l'une des rares essences arborescentes pourvues d'un chevelu.

Bois : Lourd, dur, fort, résistant à la carie, brun rougeâtre, à zones poreuses ; rayons bien visibles.

Habitat : Arbre poussant ici et là dans les basses terres riches et humides, mélangé à d'autres feuillus, essence de lumière.



Feuilles composées-pennées



Rameaux épineux



Fleurs en grappes



Gousses tortillées



Graines



Épines trifurquées



Écorce

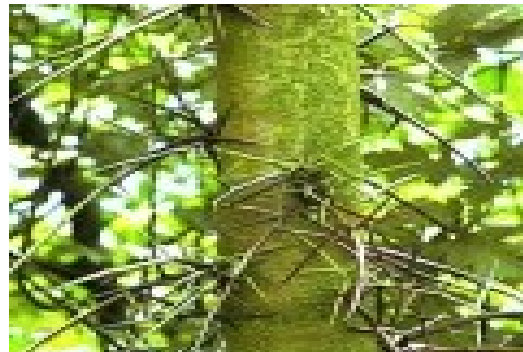


Figure 16 : Caractères descriptifs de *Gleditsia triacanthos* (USDA, 2009).

Les graines et les gousses constituent une source de nourriture pour les mammifères et les oiseaux. Les greffons et les boutures de branches portant uniquement des fleurs mâles donneront des arbres à fleurs mâles, qui ne produiront donc pas de fruits. La plupart des cultivars plantés dans les aménagements paysagers sont des arbres mâles inermes ; un cultivar à feuillage jaunes est communément planté (Farrar, 1996).

III.5.3. Répartition géographique

Le févier d'Amérique est originaire du centre des États-Unis, en gros du bassin du Mississippi, depuis les grands lacs jusqu'au golfe du Mexique. En outre l'arbre a été naturalisé dans la moitié Est des États-Unis à climat plus rigoureux (USDA, 2009).

Le févier a été introduit en Europe en 1700 (National Research Council, 1983) probablement en même temps et mêlé à l'autre épineux, le robinier, qui a littéralement envahi le continent. On en trouve souvent en France et ses pays voisins : Espagne et Italie (Putod, 1982).

III.5.3.1. *Gleditsia triacanthos* en Algérie

Le févier avait été importé en Algérie, toujours sous le vocable « d'acacia ». On a fait venir le févier directement des États-Unis en 1949, utilisant les variétés inermes, sa multiplication s'est révélée facile (Putod, 1982).

Selon l'étude réalisée par Benhamiche (2012), sur l'autoécologie du févier d'Amérique et valorisation de ses coproduits en Algérie, l'espèce arrive à s'adapter et à se reproduire sous le climat de notre région. Les mesures biométriques, sont presque identiques à celles du pays d'origine.

Le Service des Forêts DRS (Défense et Restauration des sols) chargé de l'aménagement des périmètres importants avec reconstitution de la couverture sylvo-pastorale, a songé à utiliser cet auxiliaire précieux. On pouvait comparer ces récoltes à celles du Caroubier de la plaine de la Mitidja. Il a été donc décidé, de miser largement sur cet arbre pour aider à la modernisation de l'élevage et à l'utilisation des coproduits de sa récolte (Putod, 1982).

III.5.4. Quelques activités biologiques reconnues

Les Amérindiens utilisaient les gousses du févier d'Amérique comme source de nourriture supplémentaire et des médicaments ont été fabriqués à partir de diverses parties de la plante (USDA, 2009).

Les gousses ont été transformées en thé pour le traitement de l'indigestion, de la rougeole, du catarrhe, etc. Le jus des gousses est antiseptique. Les gousses ont été considérées comme un bon antidote pour les plaintes des enfants.

L'importance médicinale de *Gleditsia triacanthos* est due à sa composition phytochimique, principalement aux alcaloïdes, flavonoïdes, stérols, terpénoïdes et aux composés phénoliques qui possèdent des activités anti-VIH, antifongiques et antihyperlipidémiques (Khan, 2017).

Les gousses de *Gleditsia triacanthos* L. sont utilisées en médecine traditionnelle pour soulager la douleur en tant qu'anodynes et narcotiques. L'effet analgésique des extraits de ces gousses a été prouvé par Saleh et *al.* (2016).

Les feuilles présentent également des effets biologiques importants. Mohamed et *al.* (2013) ont souligné leur effet analgésique, anti-inflammatoire, hépato protecteur et antimicrobien. En outre, des extraits hydro-éthanoliques des feuilles se sont montrés cytotoxiques contre plusieurs lignées cellulaires tumorales. Ces extraits sont dotés d'une importante activité antioxydante.

Les extraits et les composés isolés à partir des extraits des fleurs ont montré une activité anti-inflammatoire similaire aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), à l'aspirine, à l'ibuprofène et le naproxène (Zhang et *al.*, 2015).

III.6. Composition biochimique du fruit de *Gleditsia triacanthos*

Les éleveurs des Etats-Unis plantaient une quinzaine de féviers greffés sur leurs prairies pour faire bénéficier les bêtes de l'abri et d'un supplément d'aliments sucrés à l'entrée de l'hiver. En effet les gousses sont une source importante de métabolites énergétiques.

Kamalak et *al.* (2012), soulignent la richesse et l'importante valeur nutritive du contenu des gousses de *Gleditsia triacanthos* qui sont composés de 67,2 à 119,9 g.kg⁻¹/MS de protéines totales et 122,3 à 152,2 g.kg⁻¹/MS de sucres solubles. Les Fibres neutres et acides varient de 299,6 à 414,3 et 195,3 à 262,9 g.kg⁻¹/MS, respectivement.

La plante, connue sous le nom de carouge de miel en raison de sa pulpe au goût sucré, qui, cependant, n'est pas aussi doux que le miel, était utilisée par les Amérindiens pour faire de la bière. Intéressé par le potentiel du févier d'Amérique pour la production d'alcool, Scanlon (1980), présente les données analytiques suivantes :

Tableau 04 : Composition biochimique du fruit de *Gleditsia triacanthos*.

<i>Composés</i>	<i>Gousses</i>	<i>Pulpe</i>	<i>Graines</i>
Cendres	3.75	3.82	10.23
Matière grasse	0.81	0.52	3.06
Protéines	10.15	8.21	28.74
Fibres	14.19	13.81	11.02
Azote libre	71.10	73.64	46.95
Sucres réducteurs (glucose)	2.86	3.32	-
Sucres non réducteurs (sucrose)	29.12	32.22	-
Sucres totaux	31.98	35.54	-

Les graines sont aussi source d'hydrates de carbone, de fibres, d'amidon, de vitamines (A, B et K), de protéines, de palmitate, d'acide oléique, stéarique et linoléique. L'huile des graines est riche en phosphatidylcholine, en phosphatidylinositol et en acide phosphatidique. Les jeunes graines ont un goût de pois verts (Bojilov et *al.*, 2014 ; Khan, 2016).

Rakhmanberdyeva et *al.* (2002), confirment par des méthodes chromatographiques que les graines du févier d'Amérique sont riches en lipides neutres (90.5%), glycolipides (6.4%), et phospholipides (3.1%) et des acides gras (majoritairement l'acide linoléique, palmitiques et oléique).

Les graines de *Gleditsia triacanthos* sont une source de galactomannanes à ratio mannose/ galactose variable (Sciarinia et *al.*, 2009 ; Cerqueira et *al.*, 2010).

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

I.1. Objectif du travail

Actuellement les agents dérivés des plantes sont de précieux principes actifs intégrant la composition de plusieurs médicaments, ce qui justifie une nette recrudescence au recours à la médication à base de plantes. Effectivement, 80% de la population du globe ont essentiellement recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire leurs besoins en soins de santé primaires, la majeure partie des traitements traditionnels consiste à utiliser des extraits de plantes ou leurs principes actifs (Farnsworth et *al.*, 1986).

Notre étude s'inscrit dans le contexte de la valorisation des extraits du fruit de *Gleditsia triacanthos* L, en mettant l'accent sur ses caractéristiques phénoliques bioactives en vue d'une éventuelle transposition dans le domaine thérapeutique.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de «biochimie appliquée» au département de Biologie, Université Djillali LIABÈS de Sidi Bel Abbès. Nous nous sommes intéressés à caractériser les composés phénoliques des extraits préparés à partir du fruit de *Gleditsia triacanthos* et à déterminer leurs activités biologiques.

Pour cela, les étapes suivantes ont été réalisées :

- La préparation des extraits bruts polyphénoliques par macération hydro-méthanolique puis leur fractionnement selon un protocole général permettant la séparation des composés phénoliques selon leur structure et leur solubilité dans différents solvants à polarité croissante.
- La caractérisation qualitative des différents extraits et fractions par un screening phytochimique (criblage phytochimique) en se basant sur des réactions colorimétriques et de précipitations différentielles afin de déterminer la présence ou l'absence de quelques groupes de composés bioactifs.
- La détermination quantitative des différents extraits en dosant les teneurs des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés par des méthodes spectrophotométriques.
- La détermination de l'implication des teneurs de ces trois types de composés phénoliques dans l'activité antioxydante par établissement des corrélations linéaires.
- L'évaluation des activités biologiques des extraits ; à savoir
 - ❖ Le pouvoir antioxydant : en quantifiant la capacité antioxydante totale (CAT), et en déterminant la capacité de piégeage du radical libre DPPH.

- ❖ Le pouvoir antibactérien : vis-à-vis des souches pathogènes de référence.
- Enfin, la caractérisation chromatographique par HPLC (High performance liquid chromatography) des extraits actifs, afin de déterminer le profil qualitatif des composés phénoliques qui confèrent aux extraits leur caractère bioactif.

I.2. Matériel

I.2.1. Matériel végétal

I.2.1.1. Présentation et situation de la zone de récolte

La récolte des fruits du févier d'Amérique a été réalisée au niveau de la wilaya de Sidi Bel Abbés (Ouest algérien). Cette région (Figure 17) est caractérisée par un climat méditerranéen appartenant à l'étage bioclimatique semi-aride à tendance continentale : hiver humide et froid, été sec et chaud, saisons intermédiaires courtes (Bennabi et *al.*, 2012).

La situation géographique ainsi que l'étage bioclimatique de la station de récolte sont représentés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Caractéristiques géographiques et bioclimatiques du lieu de récolte de la plante étudiée (Benhamiche et *al.*, 2016).

<i>Plante</i>	<i>Station</i>	<i>Altitude</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>	<i>Étage bioclimatique</i>
<i>Gleditsia triacanthos</i> L	Université Djillali LIABÈS (ITMA) Sidi Bel Abbés	486 m	35°11' N	00°38' W	Semi-aride

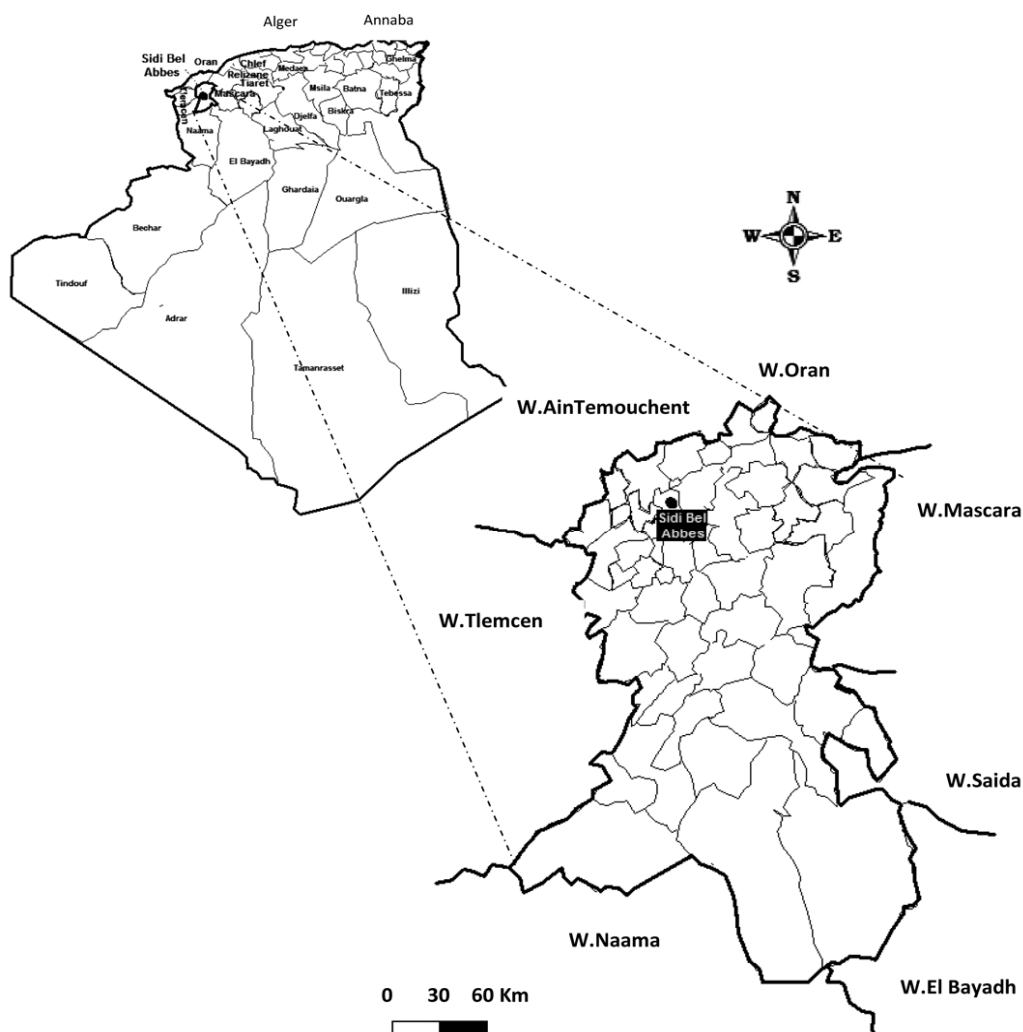


Figure 17 : Présentation de la wilaya de Sidi Bel Abbés (site de récolte), (Bennabi et *al.*, 2012).

1.2.1.2. Collecte et identification de la plante

Le fruit (gousses) de *Gleditsia triacanthos* est récolté durant le mois de novembre 2015 dans la région de Sidi Bel Abbés (Algérie). L'identification botanique de l'espèce a été confirmée par Dr. Asma El Zerey-Belaskri (Université de Sidi Bel Abbés). Un voucher spécimen (code, BVCV, Fab125) est monté et conservé par l'identificateur.

Les gousses sont séchées naturellement sur du papier durant 20 jours à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les graines sont retirées des gousses afin de les séparer de la pulpe. Chaque partie est concassée séparément par un hachage manuel puis pulvérisée au broyeur à couteaux (MF 10 BASIC IKAWERKE). Les poudres végétales ainsi obtenues, sont conservées dans des sacs en papier opaque pour les différentes manipulations.

1.2.2. Produits chimiques et réactifs

Les solvants utilisés sont tous de grade analytique, ne nécessitant aucune étape de purification. Le méthanol, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, l'acide sulfurique (H₂SO₄), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide acétique, le réactif de Folin-Denis et le réactif de DPPH sont obtenus auprès de Prolab, Sigma-Aldrich (Chemical Company, St. Louis, MO, USA) et Merck (Allemagne). Le réactif de Folin-Ciocalteu est fourni auprès de CHIM-OZA.

1.2.3. Matériel de microbiologie

1.2.3.1. Milieux de culture et antibiotiques

La gélose nutritive, Le bouillon nutritif, la gélose Muller Hinton et le bouillon Muller Hinton ont été utilisés pour la mise en culture des bactéries et la détermination de l'activité antibactérienne de nos extraits. Ils sont préparés à partir de milieux déshydratés et stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Leur composition est mentionnée dans l'annexe 01.

Des antibiotiques sur disque à des concentrations fixes ont été utilisés pour déterminer la sensibilité standard des souches bactériennes testées.

Les antibiotiques utilisés sont : Tetracycline (TE 30 µg), Erythromycine (E 15 µg), Gentamicine (GM 10 µg), Spiramycine (SP 10 µg), Nitroxoline (NI 20 µg) et Acide Oxolinique (OA 20 µg).

1.2.3.2. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), fournies par le laboratoire national du contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP) d'Alger. Ces souches choisies pour leur pathogénicité, sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h, à l'obscurité et à 37°C. Elles sont conservées à 4°C dans des tubes à essais à gélose nutritive inclinée.

1.3. Extraction : Obtention des extraits végétaux

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle détermine la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (Michel, 2011).

Le protocole extractif est effectué selon la méthode d'El-Sayed et *al.* (2013), avec une adaptation de quelques modifications, comportant les étapes suivantes :

1.3.1. Préparation des extraits hydro-méthanoliques

Cette première étape d'extraction des substances naturels est de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction.

Les extraits hydro-méthanoliques bruts sont obtenus par macération à froid de 100 g de matériel végétal (pulpe et graines séparément) dans 400 ml de mélange méthanol-eau (70%) pendant 48 heures sous agitation, avec renouvellement du solvant après 24 heures. Les macérats hydro-méthanoliques ainsi obtenus sont doublement filtrés sur papier Whatman N°01 et papier filtre, puis évaporés par un Rotavapor de type LABOROTA 4000 (Heidolph) sous pression réduite, à une température de 45°C. Les résidus secs obtenus sont récupérés dans de l'eau distillée. On obtient ainsi les extraits bruts hydro-méthanoliques de la pulpe (EMBP) et des graines (EMBG).

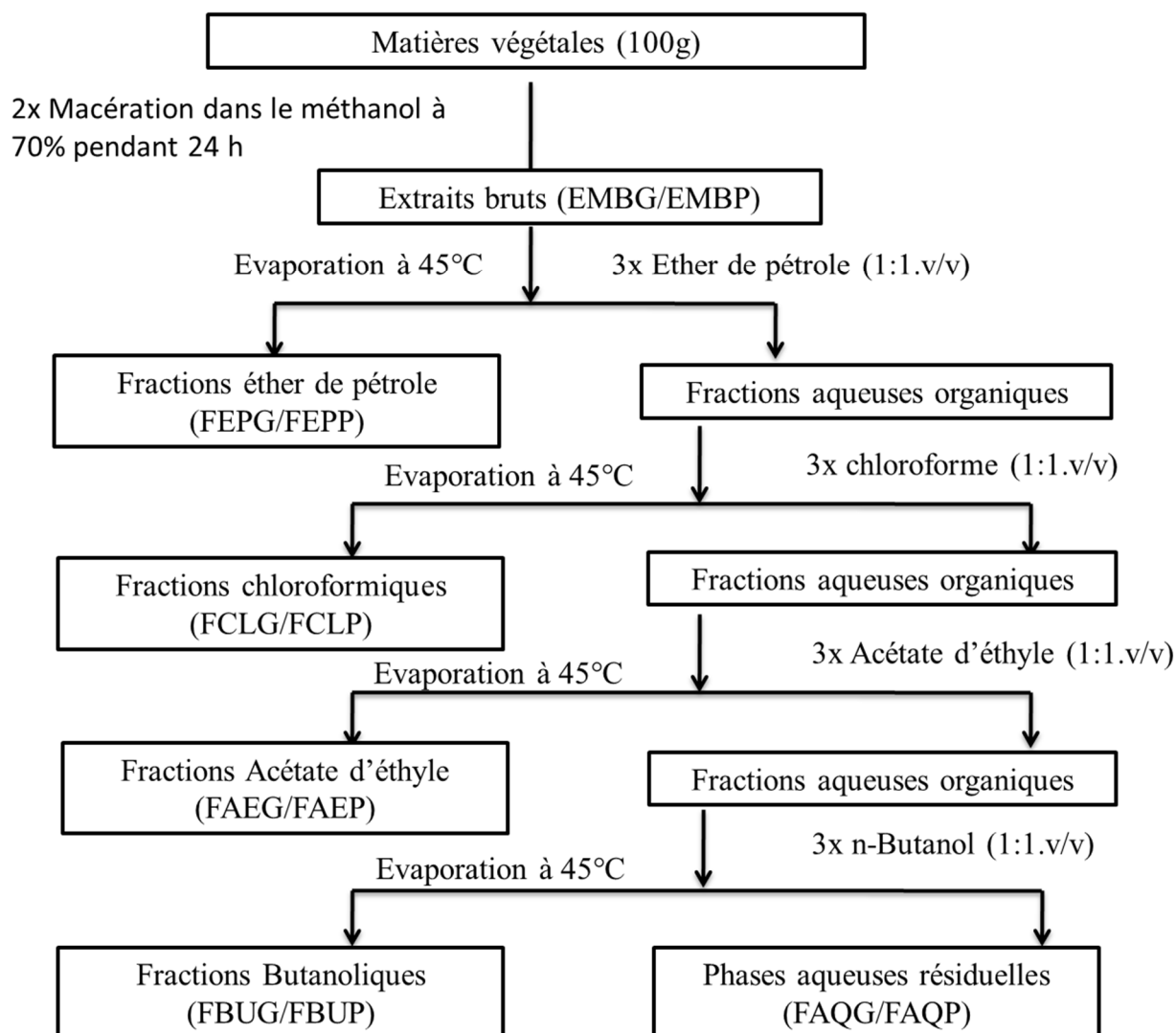
1.3.2. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante

L'extraction exhaustive est généralement réalisée avec différents solvants de polarité croissante afin d'extraire le mieux les composants les plus actifs ayant une activité biologique la plus élevée.

Des extractions successives (liquide-liquide) par des solvants à polarité croissante (Ether de pétrole, Chloroforme, Acétate d'éthyle et Butanol), sont réalisées à partir des extraits bruts. Après épuisement des extraits hydro-méthanoliques, les phases aqueuses résiduelles sont récupérées.

Les différents extraits ainsi obtenus sont évaporées à sec à 45°C sous pression réduite, repris dans du méthanol et conservés à 4°C avant la réalisation des différents tests. Les extraits destinés à l'étude de l'activité antibactérienne sont repris dans le DMSO (diméthylsulfoxyde).

Le résumé du protocole d'extraction est illustré dans la figure 18.



G : pour graines, *P* : pour pulpe.

Figure 18 : Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide des extraits bruts des graines et de la pulpe.

I.3.3. Calcul des rendements en extraits secs

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après évaporation et la masse initiale du matériel végétal utilisé.

Ce rendement est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = m_0 / m_1 \times 100$$

m_0 : Masse en gramme du résidu sec évaporé ;

m_1 : Masse en gramme de la matière végétale sèche initiale.

I.4. Screening phytochimique

Les extraits hydro-méthanoliques et leurs fractions sont soumis à des tests phytochimiques standards afin de mettre en évidence les métabolites secondaires responsables des activités biologiques. Il s'agit d'une étude qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation de quelques grands groupes chimiques ou métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, anthraquinones, saponosides, stérols et terpènes, hétérosides cardiotoniques). Ces métabolites sont des substances bioactives douées de différentes propriétés largement exploitées en phytothérapie. Les tests sont effectués sur les différents extraits végétaux selon des méthodes standards.

I.4.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont mis en évidence par la réaction à la cyanidine. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange. Un volume de 2 ml de chaque extrait est évaporé puis le résidu est repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique deux fois dilué. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose-orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique intensifie cette coloration qui confirme la présence des flavonoïdes (N'Guessan et *al.*, 2009).

I.4.2. Tanins

Les tannoïdes (tanins hydrolysables) et les tanins vrais (tanins non hydrolysables ou condensés) sont des polymères de polyphénols (Békro et *al.*, 2007). Ils sont mis en évidence par le test au chlorure ferrique. L'ajout de FeCl_3 à 1% à 5ml des différents extraits permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques et au brun verdâtre en présence des tanins catéchiques (Trease & Evans, 1989).

I.4.3. Stérols et triterpènes

Les stérols et terpènes sont mis en évidence par le test de Liebermann-Burchard. À 5 ml d'extrait, on ajoute 5 ml d'anhydride acétique qu'on mélange doucement. On ajoute ensuite 1 ml d' H_2SO_4 concentrée sur le côté du tube. L'apparition d'un anneau brun-rouge à la zone de contact des deux liquides et une couleur verdâtre dans la couche de séparation, indiquent la présence de stérols et de triterpènes (Yusuf et *al.*, 2013).

I.4.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont identifiés par le test de Dragendorff. Ce test peut donner des réactions de faux positifs dans certains extraits exempts d'alcaloïdes. Des tests de confirmation doivent donc toujours être effectués (Sofowora et *al.*, 2010). En effet, nos résultats sont confirmés par le test de Bouchardat et le test de Mayer et Wagner. Ces trois tests ont pour principe, la capacité des alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode.

On met 3 ml d'extrait méthanolique dans trois tubes à essai, auxquels on ajoute 1 ml d'HCl concentré, puis 2 gouttes de réactif de Dragendorff pour le premier tube, 2 gouttes de réactif de Bouchardat pour le deuxième et 2 gouttes de réactif de Mayer et Wagner dans le troisième. La composition de ces réactifs est décrite en annexe 02.

La présence des alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité orangé avec le réactif de Dragendorff (Atchibri et *al.*, 2016) et brun rougeâtre avec le test de Bouchardat.

I.4.5. Saponosides

La détection des saponosides par le test de mousse est réalisée selon Trease & Evans (1987), en ajoutant un peu d'eau à 2 ml des différents extraits, la solution est ensuite fortement agitée. Le mélange est laissé au repos pendant 20 minutes. La présence des saponosides est évaluée comme suit :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

I.4.6. Glycosides cardiotoniques

Le test de Keller-Killiani est utilisé pour la détection des glycosides cardiotoniques. En présence d'acide acétique et d'acide sulfurique (renfermant des traces de sels ferriques), les glycosides cardiotoniques sont responsables de la formation d'un anneau brun à l'interface (Trease & Evans, 1989).

I.4.7. Anthraquinones

Les anthraquinones sont identifiées par le test de Bornträger selon Trease & Evans (2002). À 5 ml de chacun de nos extraits on ajoute 5 ml de chloroforme qu'on agite pendant 5 minutes. Le mélange est filtré puis agité avec un volume égal de solution d'ammoniac à 10%. L'apparition de couleur violette dans la phase aqueuse indique un test positif (Yusuf et *al.*, 2013).

I.5. Étude quantitative

Des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés, sont réalisés pour chaque extrait des graines et de pulpe des gousses de *Gleditsia triacanthos* par des méthodes colorimétriques en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1800).

I.5.1. Dosage des polyphénols totaux

En raison de l'hétérogénéité des composés phénoliques naturels et leur possible interférence avec d'autres substances facilement oxydées dans les matières végétales, plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination des composés phénoliques totaux mais aucune n'est parfaite.

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des graines et de pulpe de *Gleditsia triacanthos* est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu. Cette méthode est la plus employée pour doser les polyphénols totaux (Kahkonen et *al.*, 1999).

Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation, en milieu basique des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu, complexe de l'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Il voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction –OH des phénols (Catalano et *al.*, 1999). Ceci entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968).

Protocole

Le protocole utilisé pour ce dosage est décrit par Dewanto et *al.* (2002). Un volume de 125µl des différents extraits à des concentrations initiales définies, est mélangé avec 500µl d'eau

distillée et 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Le mélange est vigoureusement agité et laissé pendant 6 mn au repos. Ensuite un volume de 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7% est ajouté au mélange précédent et le volume final est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont conservés à l'obscurité, à température ambiante pendant 90 mn. L'absorbance est mesurée à 760 nm.

Le contenu phénolique total des extraits est calculé à partir de courbe étalon de l'acide gallique, réalisée dans les mêmes conditions d'analyses. Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

I.5.2. Dosage des Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont quantifiés dans les extraits de graines et de pulpe de *Gleditsia triacanthos* selon la méthode du trichlorure d'aluminium décrite par Dewanto et *al.* (2002).

Principe :

Le principe de cette méthode colorimétrique est que le chlorure d'aluminium forme des complexes acides stables avec le groupe cétone du C_4 et le groupe hydroxyle de C_3 ou C_5 des flavones et des flavonols. De plus, il forme des complexes acides labiles avec les groupes *Ortho*-dihydroxyles dans les cycles A ou B des flavonoïdes (Chang et *al.*, 2002).

Cette méthode est basée sur la nitration du cycle aromatique portant un groupe catéchol (en présence de NaNO_2 en milieu alcalin). Après l'addition d' AlCl_3 , un complexe de couleur jaune se forme qui, par la suite, vire immédiatement au rouge après l'ajout de NaOH . L'absorbance est mesurée à 510 nm (Pękal & Pyrzynska, 2014).

Protocole

Un volume de 250 µl d'extrait à concentration définie est mélangé avec 75 µl d'une solution de NaNO_2 à 5 %. Le mélange est incubé pendant 6 minutes à température ambiante, auquel on ajoute ensuite 150 µl d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10%. Un deuxième temps de repos (5 minutes) est nécessaire avant d'ajouter 500 µl de NaOH (1M). Le volume final est porté à 2500 µl et est soigneusement mélangé. L'absorbance est immédiatement lue à 510 nm.

Une gamme étalon à la catéchine (à des concentrations de 0 à 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g MS).

1.5.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin-Denis, décrite par Bajaj & Devsharma (1977). Les tanins condensés pourraient être mieux quantifiés par la méthode de Folin-Denis comparativement aux tanins hydrolysables. C'est une information importante, car les structures et les fonctions des tanins hydrolysables et condensés sont différentes (Gross et *al.*, 1999).

Principe :

Elle consiste en la réduction de l'acide phosphotungstique-phosphomolybdique en milieu alcalin, en un complexe de couleur bleue en présence des tanins. Le complexe formé absorbe à 725-760 nm (Salunkhe et *al.*, 1989).

Protocole

Les solutions de travail sont préalablement préparées :

- Folin-Denis : solution commerciale (Sigma-Aldrich) préparée et prête à l'emploi (voir la composition en annexe 02).
- Solution de carbonate de sodium saturée : pour chaque 100 ml d'eau distillée, on dissout 35 g de carbonate de sodium à 70 à 80°C. La solution est laissée au repos pendant 24h. Les cristaux de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ formés, sont filtrés et le volume final ajusté.
- Solution standard : une solution mère est préparée en diluant 10 mg d'acide tannique dans 100 ml d'eau distillée.

Une gamme étalon de l'acide tannique est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme équivalent acide tannique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAT/ g MS).

I.6. Détermination de l'activité antioxydante

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. Ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude, nous avons utilisé deux tests chimiques à savoir ; la détermination de la capacité antioxydante totale (CAT) et le piégeage du radical libre DPPH.

I.6.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de la plante étudiée est évaluée par la méthode de phosphomolybdène selon la procédure décrite par Prieto et *al.*, (1999). Ce test est basé sur la réduction du molybdène Mo^{6+} en molybdène Mo^{5+} par l'extrait de la plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/ Mo^{5+} de couleur verte.

Protocole

Un volume de 0.3 ml de l'extrait est mélangé avec 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont incubés au bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml de méthanol, incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon à différentes concentrations. La teneur en capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS).

I.6.2. Piégeage du radical DPPH

Le test DPPH a été largement utilisé pour évaluer l'efficacité de piégeage des radicaux libres de diverses substances antioxydantes (Knežević et *al.*, 2011). Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le radical libre 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl, soit par un mécanisme de libération d'un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle, soit par libération d'un électron. Le radical a un maximum d'absorption mesurable par spectrophotométrie à 515 nm et sa neutralisation par un antioxydant peut-être facilement suivie par spectrophotométrie UV/vis (Afonso et *al.*, 2016).

L'avantage de cette méthode est que le radical libre de DPPH peut rester lentement en contact avec la totalité de l'échantillon pendant suffisamment de temps, lui permettant ainsi de réagir même avec des antioxydants faibles (Prakash, 2001).

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence (Popovici et *al.*, 2009).

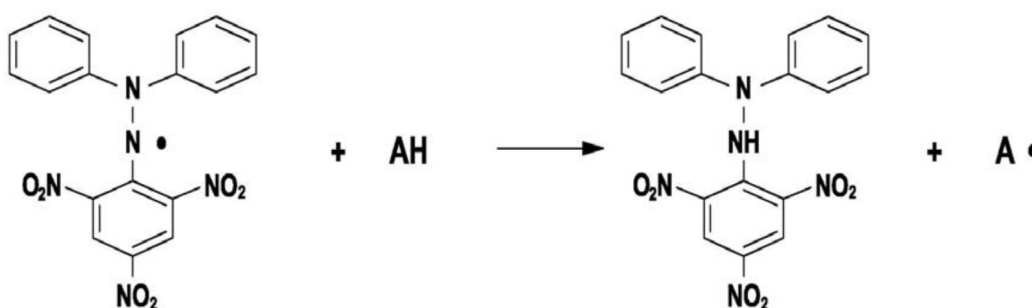


Figure 19 : Réaction du piégeage du radical libre DPPH 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl par un antioxydant (Pisoschi et *al.*, 2009).

Protocole :

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été déterminée selon la méthode de Sánchez-Moreno (2002). Pratiquement, une solution de DPPH à 0.2 mM est fraîchement préparée dans le méthanol. Un volume de 50 μ L des solutions des extraits et de l'antioxydant de référence à différentes concentrations, est ajouté à 1.95 ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 515 nm contre un blanc de méthanol. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. La solution de l'antioxydant de référence (acide ascorbique) représente le témoin positif.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire, exprimé en pourcentages d'inhibition est estimé selon l'équation suivante :

$$\% PI = (Abs_{Contrôle} - Abs_{Extrait}) / Abs_{Contrôle} \times 100\%$$

% PI : Pourcentage d'inhibition.

Abs Contrôle : Absorbance du contrôle négatif.

Abs Extrait : Absorbance de l'extrait.

I.6.2.1. Évaluation du potentiel antiradicalaire : calcul des IC₅₀

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀. Ce paramètre employé pour estimer le pouvoir antioxydant est défini comme étant la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Les IC₅₀ sont déterminés graphiquement par les régressions linéaires ou logarithmiques des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait).

Le pouvoir antiradicalaire est inversement proportionnel à l'IC₅₀ (Prakash et *al.*, 2007).

I.7. Activité antibactérienne

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (Guinoiseau, 2010). Cette situation a poussé les scientifiques à la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverses sources, comme les plantes médicinales, qui sont des bonnes sources de nouveaux agents antimicrobiens (Chaouch, 2014).

À cet effet, nous avons réalisé un test *in vitro*, de sensibilité des bactéries aux différents extraits et fractions par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

I.7.1. Description des souches bactériennes

L'activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis d'un panel de bactéries (Gram+ et Gram-) à caractère pathogène. Notre choix d'étude s'est porté sur plusieurs cibles bactériennes, car chacune d'elle possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier. Ces souches

pathogènes utilisées sont parmi celles qui causent les maladies les plus courantes, ce sont des contaminants fréquents, provoquant ainsi des infections importantes. Nous avons utilisé dans cette étude des souches de référence ATCC, dont les caractéristiques sont mentionnées dans le tableau 06.

Tableau 06 : Caractéristiques et pouvoirs pathogènes des souches bactériennes testées.

<i>Espèces</i>	<i>Caractères bactériologiques</i>	<i>Habitat / hôte</i>	<i>Caractéristiques / Pouvoir pathogène</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Bacille aérobic Gram négatif.	Eau et sols humides Surface des végétaux. (germe ubiquitaire).	Responsable d'infections nosocomiales. Infections urinaires, oculaires et pulmonaires. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Bacille aérobic Gram négatif.	Tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.	Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites. Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.
<i>Salmonella abony</i> ATCC 6017	Bâtonnet, aérobic, Gram négatif.	isolée des bovins, des reptiles, et des goélands.	Gastro-entérite, bactériémie, fièvre entérique.
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	Bacille à Gram négatif, aérobic strict.	Saprophyte des muqueuses respiratoires d'animaux domestiques et d'animaux sauvages	Colonise l'épithélium cilié de l'appareil respiratoire de l'hôte, provoquant des infections chroniques.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Cocci, Gram positif.	Ubiquitaire, Les fosses nasales, La gorge, Le tube digestif.	Commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste. Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10 240	Cocci, Aérobie Gram positif.	Saprophyte. Sol et air. Contaminant naturel des voies respiratoires humaines et des peaux des mammifères.	Engendre des maladies nosocomiales chez les patients immunodéprimés (Abscess intracrâniens, pneumonie, endocardite, arthrite ou méningite...)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Bacille aérobic, Gram positif.	Ubiquitaire. Sol et matière organique.	Contamine les denrées alimentaires et peut provoquer des intoxications alimentaires.

I.7.2. Préparation des disques

Les disques préparés à partir du papier wattman N°3 de 6 mm de diamètre sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante, en gardant le tube hermétiquement fermé.

I.7.3. Préparation des différentes concentrations des extraits

Des dilutions successives dans le DMSO, de progression arithmétique à raison de 2 ont permis de préparer une gamme de dilution (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) à partir des extraits et fractions (200 mg/ml) de la pulpe et des graines.

I.7.4. Préparation des cultures bactériennes et ensemencement

Les différentes souches bactériennes sont revivifiées par repiquage par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Des colonies pures sont prélevées à partir de ces cultures jeunes, pour préparer l'inoculum bactérien.

Chaque colonie est mise en suspension dans 2.5 ml de bouillon Mueller-Hinton. La turbidité de la suspension est mesurée à l'aide d'un densitomètre et est ajustée à 0.5 du standard de McFarland (DO= 0.08 à 0.1 mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 625$ nm), ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml.

L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose préalablement versée (15 ml) et refroidie à 45-50°C dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60° pour obtenir une distribution égale de l'inoculum.

I.7.5. Test de sensibilité par méthode de diffusion sur gélose

À l'aide d'une pince stérile, les disques sont imprégnés individuellement d'extrait (10 μ l de concentration 200 mg/ml) puis placés sur la surface du milieu gélosé déjà inoculés avec les bactéries testées (Figure 20). Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées 1h à température ambiante pour une pré-diffusion, puis incubées à 37°C pendant 24 h.

Des disques témoins imprégnés de DMSO (contrôle négatif) et d'antibiotiques (contrôle positif) sont inclus dans les essais afin de vérifier leurs effets sur les souches bactériennes étudiées.

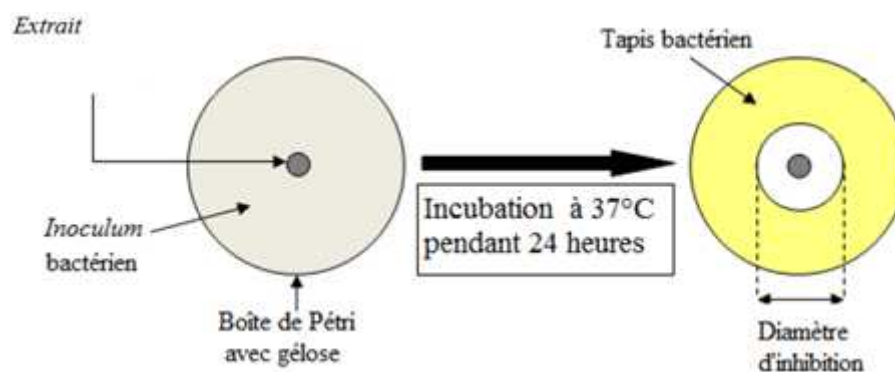


Figure 20 : Réalisation des étapes d'un test antibactérien.

1.7.6. Détermination de la CMI par méthode de dilution sur milieu gélosé

La CMI (concentration minimale inhibitrice) d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée correspond à la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe après 24h.

Sa détermination se fait à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu solide par diffusion. Les extraits ayant montré une activité antibactérienne positive, sont sélectionnés pour déterminer leurs CMI par la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton selon la méthode décrite par Mostafa et *al.* (2018).

1.7.7. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition après 18 heures d'incubation, qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Tableau 07).

Tableau 07 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Pouce et *al.*, 2003).

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistant (-)	Diamètre < 8 mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 15 et 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20 mm

La zone d'inhibition a été évaluée en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu du disque (y compris le diamètre des disques à l'aide d'une règle). Trois tests ont été effectués pour chaque souche.

I.8. Analyses statistiques

Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. L'analyse ANOVA a été réalisé, un test « t » de Student a été appliqué ; $p \leq 0,05$ est considéré comme significatif.

Les coefficients de corrélation des propriétés antioxydantes a été déterminé en utilisant le programme Excel 2013.

I.9. Analyse par chromatographie liquide à haute performance

I.9.1. Principe

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours de ces quarante dernières années, grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC pour High performance liquid chromatography) et des détecteurs à barrette de diode permettant l'analyse de spectre d'absorption en ultraviolet et le couplage de la HPLC avec les techniques physicochimiques modernes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire...).

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés, en particulier leur degré d'hydroxylation, de glycosylation et de méthylation. À partir de ces principes généraux, une approche la plus utilisée dans ce domaine a été mise au point consistant à la séparation de ces composés sur une phase dite inversée (silice greffé des chaînes aliphatiques apolaires) suivie de leur élution par un mélange de solvants (fréquemment eau/acide acétique/acétonitrile ou eau/méthanol) dont on fait varier la polarité avec le temps d'analyse (Macheix et *al.*, 2005).

La chromatographie est caractérisée par sa haute sensibilité et affinité qui permettent l'identification des composés de faible poids moléculaire. Elle consiste en premier lieu en une étape de séparation, après laquelle, les composés sont sélectionnés par leur temps de rétention.

Ces propriétés de séparation et de sélection de la chromatographie permettent la sortie de composés bien déterminés (selon la variation de la polarité du mélange) dans un ordre bien défini, du composé moins polaire vers le composé le plus polaire.

Les extraits de la pulpe du fruit de *Gleditsia triacanthos* ont été sélectionnés pour faire l'objet d'une analyse chromatographique par HPLC sur la base de leurs fortes teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes ainsi que pour leur activité antioxydante élevée comparativement aux autres extraits des graines.

1.9.2. Protocole expérimental

Le principe de fonctionnement expérimental d'un appareil HPLC est illustré dans la figure 21.

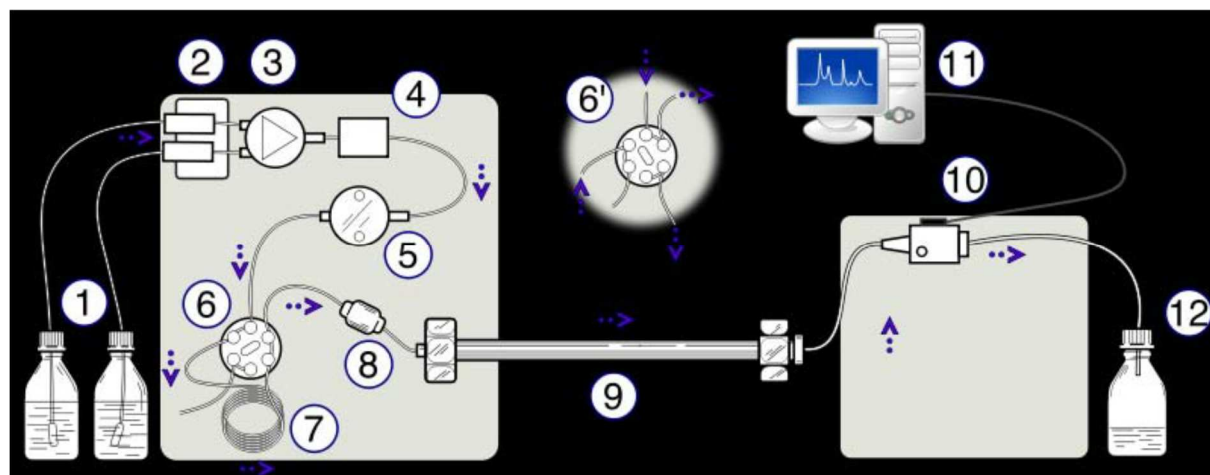


Figure 21 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance.

(Penchev, 2010).

1- Réservoirs des solvants, 2 - Dégazeur, 3 - Valve de gradient d'élution, 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant), 5- Pompe à haute pression, 6 - Vanne d'injection en position "inject", 6 -Vanne d'injection en position "load", 7 - Boucle d'injection de l'échantillon, 8 - Pré colonne, 9 - Colonne analytique, 10 - Détecteur, 11 - Acquisition du signal, 12 - Décharge déchets.

Les composés phénoliques ont été séparés et identifiés sur l'appareil HPLC de type Shimadzu-system (Prominence i. LC-2030C 3D) muni d'un détecteur UV à 280 nm. Le volume injecté est de 5 μ l d'extrait concentré (100 mg/ml) et le débit est fixé à 0.8 ml/min. La séparation a été réalisée à 35°C sur la colonne chromatographique composée d'un gel de silice greffé de groupements octadécyle, de type Ascentis Express C18 column (15 cm X 4.6 mm), avec une porosité de 2.7 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

L'élution est réalisée en mode gradient avec deux solvants. Solvant A : eau acidifiée à l'acide acétique et solvant B : Méthanol acidifié à pH 3 dans l'acide acétique. La durée totale de séparation est de 50 min. Les pics correspondants aux molécules cibles sont interprétés par un logiciel informatique qui permet de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur.

L'identification se fait selon les temps de rétention (annexe 03) et les spectres d'absorption de ces composés.

Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

Les composés biologiquement actifs sont généralement présents à faibles concentrations dans les plantes. Une technique d'extraction est celle qui permet d'obtenir des extraits à rendement important avec des changements minimes des propriétés fonctionnelles (Quispe-Candori et *al.*, 2008). Cette opération a pour but de capter les produits élaborés par le végétal tout en veillant à éviter d'en altérer la qualité.

Les extraits bruts hydro-méthanoliques des deux parties végétales étudiées sont obtenus par macération, et sont ensuite fractionnés par extraction liquide-liquide avec des solvants à polarité croissante. Les rendements d'extraction, les aspects et les couleurs des extraits obtenus, sont mentionnés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Caractéristiques et rendements des extraits de *Gleditsia triacanthos*.

<i>Partie végétale</i>	<i>Extrait</i>	<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rendement (%)</i>
<i>Graines</i>	EMBG	Huileux	Marron clair	8.359 ± 0.659
	FEPG	Pâteux	Vert foncé	1.336 ± 1.309
	FCLG	Huileux	Marron Orange	0.715 ± 0.146
	FAEG	Huileux	Jaune foncé	0.676 ± 0.065
	FBUG	Pâteux	Jaune clair	4.726 ± 2.053
	FAQG	Pâteux	Jaune très clair	5.785 ± 3.937
<i>Pulpe</i>	EMBP	Pâteux	Marron foncé	34.046 ± 2.133
	FEPP	Pâteux	Vert foncé	0.435 ± 0.149
	FCLP	Pâteux	Vert clair	0.519 ± 0.259
	FAEP	Pâteux	Marron orangé	1.313 ± 0.132
	FBUP	Pâteux	Marron Orangé	9.260 ± 2.857
	FAQP	Pâteux	Marron clair	7.088 ± 3.621

Les extraits obtenus présentent majoritairement un aspect pâteux et parfois huileux, de couleur verte, marron ou jaune. Cela est dû à la présence des pigments végétaux ou bien à la nature des polyphénols entraînés par les différents solvants et à leur solubilité dans ces solvants.

Selon les résultats (tableau 08), nous observons une nette différence entre les deux rendements d'extraction de la pulpe et des graines de *Gleditsia triacanthos*. Cette différence de rendement peut-être expliquée par la variabilité de leur composition physicochimique (Shah et *al.*, 2017) et de leurs teneurs en composés phénoliques.

Les meilleurs rendements sont enregistrés pour les extraits bruts hydro-méthanoliques avec $8.359 \pm 0.659\%$ pour les graines et $34.046 \pm 2.133\%$ pour la pulpe. Ce résultat est confirmé par

les travaux d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les feuilles de *Gleditsia triacanthos* indiquant que le méthanol aqueux a donné le meilleur rendement massique (8%) comparativement aux extraits obtenus par fractionnement. C'est un solvant polaire connu pour extraire une large gamme de molécules incluant les sucres, les glycosides et les composés faiblement polaires.

Des composés autres que les composés phénoliques peuvent avoir été extraits et contribuent à un rendement plus élevé. Cela peut-être attribuable à une plus grande solubilité des protéines et des hydrates de carbone dans l'eau et le méthanol. Ce qui explique pourquoi le mélange méthanol/eau (70/30 : v/v) est utilisé pour la préparation des extraits bruts par macération, considéré comme un mélange de polarité élevée, permettant une extraction optimale des composés phénoliques. Ceci est conforté par les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont démontré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation des solvants hydro-alcooliques à différentes proportions par rapport aux solvants organiques purs (Lien et *al.*, 2015 ;Bucić-Kojić et *al.*, 2006; Garcia-Salas et *al.*, 2010; Naczka & Shahidi, 2006). La variation de la concentration du solvant (mélange à différentes proportions avec l'eau distillée) modifie sa capacité d'extraction (Spigno et *al.*, 2007).

Ce comportement peut-être expliqué par le fait que la présence de l'eau (ayant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools) déstabilise les parois cellulaires. Par conséquence, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de solutés, favorisant ainsi l'extraction. (Penchev et *al.*, 2010).

Les rendements des extractions successives par des solvants à polarité croissante dépendent de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire (Michel et *al.*, 2012). L'extraction liquide-liquide par des solvants organiques (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) a permis une première sélection et séparation des métabolites secondaires et aussi un épuisement de la matière organique végétale contenu dans les extraits bruts. En effet chaque solvant organique va permettre d'entraîner selon son pouvoir d'extraction sélectif et de solubilisation un ou plusieurs types de substances. Un solvant polaire isole les composés polaires et le solvant non polaire extrait les composés non polaires, ainsi différents solvants donneront des compositions différentes d'extraits (Nur Syukriah et *al.*, 2014).

Les rendements des extractions successives des graines varient significativement ($p < 0.05$) de 0.676 ± 0.065 % à 4.726 ± 2.053 % dans l'ordre croissant suivant : acétate d'éthyle,

chloroforme, éther de pétrole, et n-butanol. Ces résultats indiquent un rendement relativement intéressant pour l'extraction réalisée par l'éther de pétrole, ce qui peut être expliqué par l'extraction des composés apolaires bioactives. En effet selon Bojilov et *al.* (2014) ; Egamberdieva et *al.* (2016) ; Eisenman et *al.* (2013), les graines de *Gleditsia triacanthos* sont riches en substances lipophiles biologiquement actives tel que les acides gras, phospholipides, stérols, tocophérols et caroténoïdes, qui probablement ont été entraînées par les solvants apolaires comme l'éther de pétrole. Ces solvants ont aussi la capacité de délipider et de dépigmenter la matière végétale (Bruneton, 2009).

Les rendements des extractions par fractionnement de l'extrait brut de la pulpe fluctuent significativement entre 0.435 ± 0.149 et 9.260 ± 2.857 % dans l'ordre croissant suivant : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. On constate que les rendements augmentent avec la polarité du solvant. Ces résultats corroborent avec ceux d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les extraits des feuilles de *Gleditsia triacanthos* avec des rendements de 8 % pour le méthanol aqueux, 3.5% pour la fraction de l'acétate d'éthyle et 1.5% pour la fraction chloroformique.

Les métabolites, qui ne se sont pas solubilisés dans les phases organiques, se retrouvent dans la phase aqueuse. En effet, quantitativement et d'après les résultats du tableau 08, une grande partie des constituants des extraits bruts restent dans la fraction aqueuse fluctuant entre 5.785 ± 3.937 % pour les graines et 7.088 ± 3.621 % pour la pulpe. Ces constituants présentent donc une meilleure solubilité dans l'eau qui est un solvant très polaire avec un fort pouvoir d'extraction.

Nos résultats, montrent que les rendements des extractions par des solvants polaires (le méthanol, le butanol et l'eau), sont plus importants par rapport aux solvants les moins polaires (éther de pétrole, chloroforme et acétate d'éthyle). Ce résultat est conforté par Nakamura et *al.* (2017), mentionnant des taux de rendement élevés dans les fractions polaires des feuilles de *Sasa quelpaertensis* Nakai.

Ceci est également confirmé par El-Hashash et *al.* (2010), sur les extraits des feuilles de *Cassia glauca* (fabaceae), mentionnant des rendements importants pour l'extrait brut hydro-méthanolique (27.9 %) et la fraction butanolique (4 %).

Des pourcentages de rendement plus faibles ont été obtenus pour les solvants moins polaires tels que l'acétate d'éthyle et le chloroforme avec des taux de 3.2 et 0.3 % respectivement.

Toutefois, il est difficile de comparer strictement nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de l'espèce végétale étudiée, la partie utilisée dans l'extraction, les conditions de séchage et d'entreposage, le contenu de chaque espèce en métabolites secondaires, la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement, sa polarité ainsi que la méthode d'extraction elle-même.

II.2. Screening phytochimique

Les résultats des tests préliminaires du screening phytochimique des différents extraits des graines et de la pulpe sont mentionnés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Résultats du screening phytochimique des gousses (graines et pulpe) de *Gleditsia Triacanthos*.

Composés phytochimiques	Partie végétale	Tests Réaction/ Réactif	Extraits					
			EMB	FEP	FCL	FAE	FBU	FAQ
Flavonoïdes	Pulpe	AlCl ₃	++	-	+	+++	+++	++
	Graines	AlCl ₃	++	-	+	+++	+++	+
Tanins	Pulpe	FeCl ₃	++	+	++	+++	+++	++
	Graines	FeCl ₃	+++	+	++	+++	+++	++
Hétérosides cardiotoniques	Pulpe	TKK	+	+	+	+	+	+
	Graines	TKK	+	+	+	+	+	+
Stérols et terpènes	Pulpe	RL	+	-	-	-	++	-
	Graines	RL	+	-	++	-	-	-
Saponosides	Pulpe	TM	+	-	+	+++	++	+++
	Graines	TM	+	-	-	++	+++	-
Anthraquinones	Pulpe	RBG	-	-	-	-	-	-
	Graines	RBG	-	-	-	-	-	-
Alcaloïdes	Pulpe	RD	++	+	+	+	+	+
		RB	++	+	+	+	+	+
		RMW	++	+	+	+	+	+
	Graines	RD	++	+	+	+	+	+
		RB	++	+	+	+	+	+
		RMW	++	+	+	+	+	+

AlCl₃ = test au chlorure d'aluminium ; FeCl₃ : test au chlorure ferrique ; TKK : test de Keller-Killiani ; RL = Réaction de Liebermann ; TM = Test de Mousse ; RBG = Réactif de Borntraeger ; RD = Réactif de Dragendorff ; RB = Réactif de Bouchardat, RMW = réactif de Mayer et Wagner ; (+) = présents ; (++) = abondants ; (+++) = très abondants ; (-) = absents

Ils permettent de générer une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits en révélant l'absence ou la présence d'un type de métabolites par des essais rapides, se basant sur des réactions physicochimiques colorées, de précipitation ou de turbidité. Elles n'ont évidemment qu'une valeur indicative mais elles permettent d'orienter les recherches ultérieures.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la richesse du fruit de *Gleditsia Triacanthos* en diverses classes de métabolites secondaires dans les deux parties ; graines et pulpe. Selon la littérature environs 60 composés bioactifs à effets pharmacologiques reconnus (tableau 10) ont été déjà isolés des fruits de différentes espèces de *Gleditsia*. (Zhang et *al.*, 2016 ; Khan, 2017).

Tableau 10 : Propriétés des composés chimiques présents dans la plante étudiée.

<i>Groupe chimique</i>	<i>Propriétés biologiques et pharmacologiques</i>	<i>Références</i>
Tanins condensés	Activités antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, anti-tumorale, immunostimulante.	De Bruyne et <i>al.</i> (1999)
Flavonoïdes	Activités cytotoxique, antidiabétique, et antioxydante.	Mohammed et <i>al.</i> (2013) Mohammed et <i>al.</i> (2014) Bojilov et <i>al.</i> (2014)
Saponosides	Activités anti-tumorale, anti-inflammatoire, antiallergique, anti-hyperlipidémie, analgésique, antioxydante, anti-HIV, antibactérienne.	Zhang et <i>al.</i> (2016) El-Sayed et <i>al.</i> (2013) Saleh et <i>al.</i> (2016)
Alcaloïdes	Activités hypotensive, cardiotonique et antispasmodique.	Beauchesne & Goutarel (1963)
Hétérosides cardiotoniques	Traitement de l'insuffisance cardiaque : positif inotrope, négatif chronotropique, négatif dromotrope, toxicité cardiaque à forte dose.	Bruneton (2009)
Stérols et terpènes	Activités anti-inflammatoire, anti-HIV, anti-cancer.	Takeoka et <i>al.</i> (2000)

Au regard des résultats du tableau 09, il ressort que les extraits hydro-méthanoliques bruts des graines et de la pulpe sont riches et abondants en substances bioactives comparativement aux différentes fractions. Le méthanol s'avère donc un solvant de choix pour l'extraction des métabolites secondaires du fruit de *Gleditsia Triacanthos*. C'est un solvant peu coûteux et

inoffensif, possédant plusieurs atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogènes.

Trois groupes de composés bioactifs sont présents dans tous les extraits : les tanins, les alcaloïdes et les hétérosides cardiotoniques.

C'est dans les fractions acétate d'éthyle et butanoliques que les tanins condensés ont pu être détecté le plus. L'extraction liquide des tanins totaux à l'aide de solvants très polaires, permet d'isoler les composés phénoliques libres, en particulier galliques et catéchiques, des produits condensés. Les tanins mis en évidence dans les graines et la pulpe sont de type catéchique (donnant une couleur brune verdâtre avec le FeCl_3). Ceci est appuyé par les résultats de Santamour (1977) sur les feuilles de *Gleditsia Triacanthos*. Selon Kamalak et *al.* (2012) ; Bruno-Soares & Abreu (2003), le fruit du févier d'Amérique contient des taux importants de tanins condensés.

Les hétérosides sont des substances qui résultent de la condensation d'un ou plusieurs oses avec une partie non glucidique, aglycone. Ils sont solubles dans l'eau et légèrement solubles dans l'éthanol et le chloroforme, et très solubles dans l'acétate d'éthyle. Les hétérosides cardiotoniques sont modérément présents dans tous les extraits de la pulpe et des graines. Le manque de données sur la mise en évidence de ces composés dans les différentes parties végétales étudiées complique l'interprétation de ce résultat.

Les alcaloïdes sont abondants dans les extraits de la pulpe et des graines. En effet leur présence est constatée dans tous les solvants utilisés avec une prédominance pour le méthanol aqueux. Les travaux de Peacock (1967) attestent que les alcaloïdes, principalement la triacanthine des feuilles du févier d'Amérique, sont très solubles dans le méthanol à 70%. Ils sont solubles dans les alcools, un peu moins dans le chloroforme et insolubles dans l'eau et l'éther.

Plusieurs travaux ont rapporté la richesse du févier d'Amérique en alcaloïdes (Egamberdieva et *al.*, 2016; Khan, 2017) avec une teneur de plus de 1% de la masse sèche des feuilles jeunes, en triacanthine. Les fleurs et les graines en contiennent beaucoup moins. (Bojilov et *al.*, 2014 ; Peacock, 1967).

Les flavonoïdes se montrent aussi abondants dans nos extraits (particulièrement dans les fractions acétate d'éthyle et butanoliques), excepté dans les fractions éther de pétrole où le test est franchement négatif. Les flavonoïdes du fruit du févier d'Amérique sont beaucoup plus

polaires qu'apolaires. Le chloroforme sépare les flavonoïdes en fractions glycosylées et en aglycones. On suggère que les flavonoïdes glycosylés sont plus abondants que les flavonoïdes aglycones car les fractions chloroformiques, dans lesquelles ils sont solubles, indiquent une faible couleur rouge caractéristique des flavonoïdes en réaction avec le AlCl_3 . En effet, les travaux antérieurs de Leibovici et *al.* (1986) ; Panova & Georgieva (1972), ont déjà confirmé la présence des composés flavonoïques principalement les hétérosides de type C-glycosyle, caractéristiques du genre *Gleditsia* et les légumineuses en général. Mohammed et *al.* (2013), ont quant à eux isolé six flavonoïdes glycosylés des feuilles du févier d'Amérique et deux aglycones.

Les stérols et terpènes sont moyennement présents dans les extraits méthanoliques bruts, la fraction chloroformique (FCLG) des graines et dans la fraction butanolique de la pulpe (FBUP) et sont absents dans les autres fractions, ce qui n'est pas en accord avec la littérature qui mentionne une large représentation de cette classe de métabolites dans le fruit et les feuilles de *Gleditsia Triacanthos*. Ceci peut-être expliqué par le choix de la période de récolte des gousses. En effet, selon Badalbaeva et *al.* (1973), les triterpènes des fruits sont mieux détectés sur des gousses vertes que sur le fruit mûr, compte tenu du fait que dans les gousses mûres les processus de biosynthèse sont déjà terminés.

Les études phytochimiques portées sur le févier d'Amérique ont permis de mettre en évidence la présence de :

- Stérols : Corbistérol et α Spinastérol dans les graines, β Sitostérol dans les gousses et Stigmastérol dans les deux parties (Southon et *al.*, 1994 ; Egamberdieva et *al.*, 2016) ;
- Triterpènes : acide oléanolique (dans les feuilles et les gousses), acide echinocystique, triacanthoside A, triacanthoside C et triacanthoside D (dans les gousses), (Badalbaeva et *al.*, 1973 ; Khan, 2017).

Les saponosides sont très présents dans les extraits de la pulpe principalement dans les fractions acétate d'éthyle et aqueuse, et absents de la fraction éther de pétrole. Les graines sont moins riches en saponosides. En effet les fractions éther de pétrole (FEPG), chloroformique (FCLG) et aqueuses (FAQG) en sont dépourvues. Ils sont les principaux composés du fruit du févier d'Amérique (32 composés sur 67 identifiés seraient des saponosides), (Zhang et *al.*, 2016).

Plusieurs études ont précédemment rapporté leur présence dans différents fruits des espèces de *Gleditsia*. Les saponosides extraits à partir du fruit du févier d'Amérique présentent une activité analgésique, justifiant leur utilisation en médecine traditionnelle comme antidouleur (Saleh et *al.*, 2016).

Les anthraquinones, pigments rouge-orangés retrouvés couramment chez les Fabaceae, sont absentes dans tous les extraits des graines et de la pulpe. Selon Gupta et *al.* (2016), les plantes à arbres appartenant à la famille des Fabacées représentent une source riche en anthraquinones. Bhalodia et *al.* (2013), soulignent la présence de ces composés dans les fruits (gousses) de *Cassia fistula* (fabaceae).

Ceci ne confirme pas les résultats constatés sur nos échantillons et pourrait-être liée à l'absence de la biosynthèse des anthraquinones dans l'espèce *Gleditsia Triacanthos*, car la littérature ne le mentionne pas spécifiquement, soit à des facteurs extrinsèques (période de récolte, nature du sol, facteurs climatiques, méthodes et conditions d'extraction). Ces facteurs peuvent parfois conduire même à l'absence de constituants actifs dans la même espèce récoltée de différentes stations (Trease & Evans, 2002).

Enfin on conclut que le fruit du févier d'Amérique est riche en divers métabolites secondaires, ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portés par les chercheurs à travers les études scientifiques pour cette plante.

II.3. Etude quantitative

Les composés phénoliques sont considérés comme des métabolites secondaires bioactifs, dotés de capacité antiradicalaire, plus particulièrement les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins. Ces composés ont fait le sujet de nombreuses études récentes dans le domaine de la thérapeutique antioxydante. Selon Obeid et *al.* (2007), la quantification et l'identification des polyphénols des extraits végétaux sont considérées comme la première étape vers l'évaluation de la capacité antioxydante.

Dans ce contexte, nos extraits ont été caractérisés quantitativement par spectrophotométrie, afin de déterminer leurs teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés. La concentration en polyphénols totaux de chaque extrait, déterminée selon la procédure de Folin-Ciocalteu, est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 22).

Sa formule de régression linéaire est $y = 0.0011x + 0.0151$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.9845$.

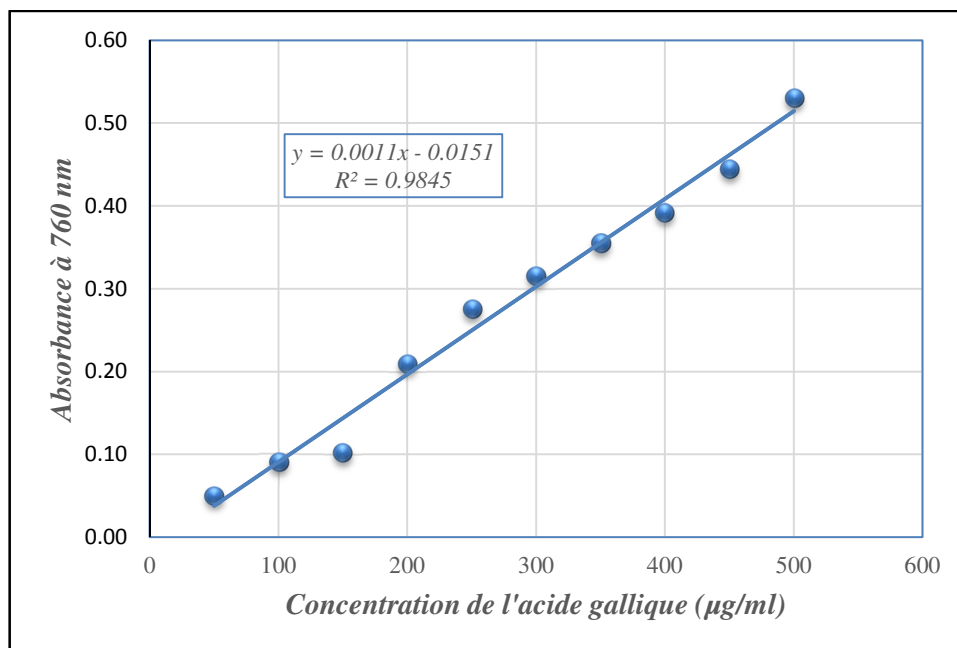


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

La quantification des flavonoïdes selon la méthode au trichlorure d'aluminium a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de la catéchine (figure 23). On établit une courbe de tendance linéaire de formule $y = 0.0024x + 0.2213$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.9806$.

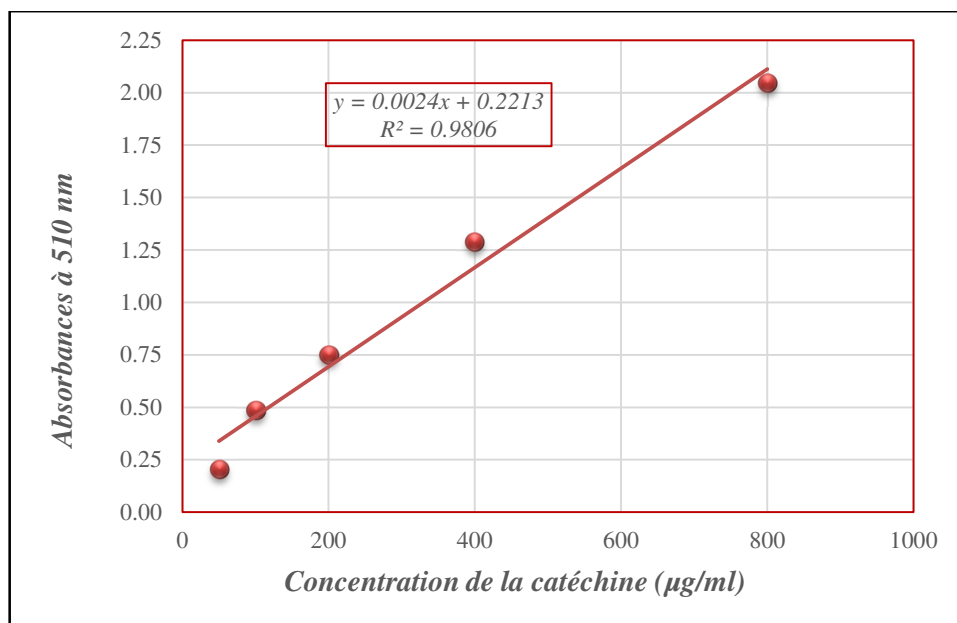


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Tandis que le dosage des tanins est donné par la gamme étalon de la figure 24. La courbe de régression linéaire de formule $y = 0,997x + 0,0003$ (avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,988$) a été établie en utilisant l'acide tannique comme standard pour le dosage des tanins condensés.

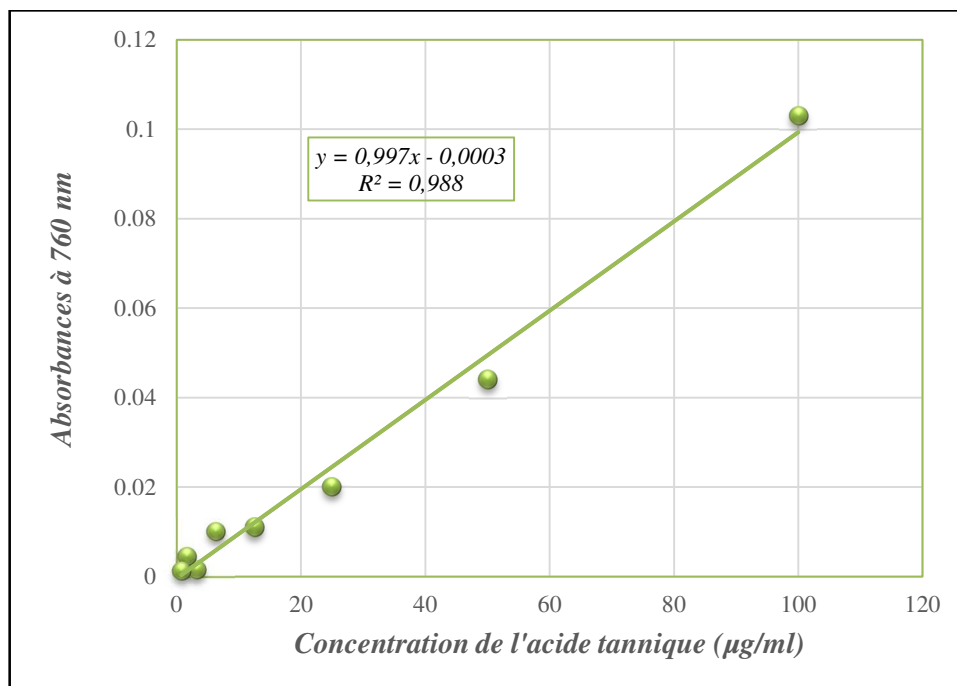


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés ont révélé la présence de ces composés dans les deux parties végétales de la plante étudiée avec des quantités différentes selon le solvant d'extraction. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultats du dosage des composés phénoliques.

Partie végétale	Extrait	Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Tanins condensés (mg EAT/g MS)
Graines	EMBG	23.700 ± 0.919	1.587 ± 0.233	14.456 ± 0.144
	FEPG	19.433 ± 0.873	3.958 ± 0.310	0.249 ± 0.166
	FCLG	36.617 ± 1.686	6.998 ± 0.502	4.232 ± 0.148
	FAEG	50.000 ± 3.893	5.137 ± 0.322	6.140 ± 0.228
	FBUG	29.833 ± 1.650	3.002 ± 0.631	6.658 ± 0.125
	FAQG	17.200 ± 1.102	0.578 ± 0.108	3.128 ± 0.041
Pulpe	EMBP	48.733 ± 0.865	10.726 ± 0.561	6.140 ± 0.148
	FEPP	66.800 ± 5.722	8.387 ± 0.397	3.410 ± 0.288
	FCLP	131.667 ± 2.055	22.023 ± 0.660	0.305 ± 0.058
	FAEP	90.166 ± 2.321	25.160 ± 0.016	3.429 ± 0.082
	FBUP	70.833 ± 1.699	12.615 ± 0.884	28.830 ± 0.269
	FAQP	23.833 ± 3.171	14.995 ± 0.960	0.567 ± 0.108

II.3.1. Les polyphénols totaux

On constate une différence importante entre les teneurs de la pulpe et celles des graines. En effet, les extraits de la pulpe ont des teneurs en composés phénoliques plus importantes que celles des extraits des graines. Elles varient de 17.200 ± 1.102 à 50.000 ± 3.893 mg EAG/g MS pour les extraits des graines et de 23.833 ± 3.171 à 131.667 ± 2.055 mg EAG/g MS pour la pulpe.

Cette différence de teneurs en polyphénols totaux entre les deux parties constitutives de la gousse est également observée dans les travaux de Fadel et *al.* (2011), portant sur les graines et la pulpe de *Ceratonia Siliqua* (fabaceae).

Contrairement à nos résultats, ceux de Benhamiche et *al.* (2016), sur le fruit du févier d'Amérique, indiquent un taux de polyphénols totaux plus important dans les graines (0.44%) par rapport à la pulpe (0.16%). Ces résultats restent largement plus faibles comparativement aux teneurs de nos extraits.

Les extraits bruts hydro-méthanoliques ne sont pas les plus riches en polyphénols totaux comparativement aux autres fractions. Cela peut-être expliqué par la solubilité différentielle des biomolécules extraites à partir de la matière végétale et de la sélectivité des solvants utilisés. La solubilité des polyphénols dépend principalement des groupes hydroxyle, la taille des molécules et la longueur de la chaîne hydrocarbonée (Franco et *al.*, 2008).

En outre, Alabri et *al.* (2014), affirme que la méthode d'extraction liquide-liquide (par fractionnement) peut faire diluer ou au contraire augmenter les teneurs en composés phénoliques de l'extrait brut. Aussi, il est très important de souligner que la méthode de détermination du taux des polyphénols totaux n'est pas basée sur des mesures des quantités absolues, mais sur leurs capacités de réduction chimique par rapport à l'acide gallique (Hossain & Shah, 2015).

Les valeurs du contenu phénolique montrent clairement que la quasi-totalité des composés phénoliques présents dans les extraits bruts est épuisée par les solvants à polarité croissante au cours du fractionnement et est répartie dans les fractions chloroformiques et acétate d'éthyle. Ceci est également confirmé par les teneurs relativement faibles observées dans les fractions aqueuses.

La plus grande quantité en polyphénols totaux est enregistrée dans la fraction acétate d'éthyle pour les graines (FAEG) avec une teneur de 50.00 ± 3.893 mg EAG/g MS et la fraction chloroformique pour la pulpe (FCLP) avec 131.667 ± 2.055 mg EAG/g MS.

L'acétate d'éthyle est souvent utilisé comme solvant d'extraction avec une sélectivité particulière pour les composés phénoliques à faible poids moléculaire (Franco et *al.*, 2008). C'est un solvant accepteur de liaisons hydrogènes et donc extrait les solutés donneurs d'électrons plus facilement que le chloroforme, le solvant donneur d'électrons le plus couramment utilisé selon Siek, (1978).

Ces résultats renforcent ceux mentionnés dans la littérature sur les feuilles de *Gleditsia triacanthos* (El-Sayed et *al.*, 2013) et d'autres fabaceae (El Hajaji et *al.*, 2010 ; Abdel Karim et *al.*, 2016 ; Belmokhtar. 2015 ; Ydjedd et *al.*, 2017), soulignant la richesse des fractions acétate d'éthyle en polyphénols totaux.

Les fractions butanoliques contiennent également des teneurs estimables en polyphénols totaux avec une quantité de 29.833 ± 1.650 mg EAG/g MS dans les graines et 70.833 ± 1.699 mg EAG/g MS dans la pulpe. Les alcools tel que le n-butanol sont d'excellents extracteurs de molécules bioactives mais posent d'autres problèmes telle que la formation d'odeurs et d'émulsions (Siek, 1978).

L'éther de pétrole, à l'autre extrémité de l'échelle de la polarité, extrait très faiblement les solutés polaires. Nos résultats indiquent néanmoins un taux important de polyphénols totaux dans la fraction éther de pétrole de la pulpe et des graines avec une teneur de 66.800 ± 5.722 et 19.433 ± 0.873 mg EAG/g MS respectivement. Généralement, les molécules de faible polarité ont tendance à se dissoudre plus efficacement dans les solvants de faible polarité. Ce résultat concorde avec celui de Nakamura et *al.* (2017), confirmant une forte teneur de polyphénols totaux dans la fraction de l'hexane, probablement due à certaines entités phénoliques réagissant fortement avec le réactif du Folin-Ciocalteu dans une solution plus profondément colorée que d'autres molécules phénoliques.

Toutefois, ce résultat n'est pas en accord avec plusieurs études qui soulignent la pauvreté des fractions à l'éther de pétrole en polyphénols totaux, due à sa sélectivité restreinte aux molécules apolaires. Ce résultat peut-être justifié par la nature et la diversité des polyphénols présents dans le fruit du févier d'Amérique, qui peuvent-être de nature apolaire ou liés à des substances non phénoliques liposolubles tels que les acides gras, les phospholipides, les

caroténoïdes et les acides organiques, interférant positivement lors de la réaction au Folin-Ciocalteu (Nakamura et *al.*, 2017).

Les phases aqueuses résiduelles de la pulpe et des graines renferment les teneurs les moins importantes en composés phénoliques avec 23.833 ± 3.171 et 17.200 ± 1.102 mg EAG/g MS respectivement. En effet les polyphénols ayant été entraînés par solubilisation sélective et différentielle le long des lavages successifs par les différents solvants organiques utilisés, se retrouvent partitionnés dans les différentes fractions. Ceux qui ne sont pas solubles dans les solvants organiques (hydrosolubles), se retrouvent dans les fractions aqueuses.

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques du fruit de l'espèce étudiée ont été réalisés. Les travaux de Cerqueira et *al.* (2010), sur les graines de *Gleditsia triacanthos* extraites à l'éthanol pur par macération, indiquent une teneur de polyphénols totaux moins importante (6.13 ± 0.69 mg EAG/g MS) que celle des extraits de nos graines, encore moins sur le même extrait obtenu par décoction (4.93 ± 0.42) et par extraction au Soxhlet (5.86 ± 0.56 mg EAG/g MS). Cependant, des teneurs aussi appréciables que nos résultats sont révélées dans la phase aqueuse résiduelle (10.79 ± 0.99 mg EAG/g MS) par ces mêmes auteurs.

Les résultats d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les extraits des feuilles de *Gleditsia triacanthos*, indiquent une teneur de 240.32 ± 1.56 mg EAG/g MS dans l'extrait brut hydro-méthanolique, 160 ± 1.65 mg EAG/g MS dans la fraction chloroformique et 275.42 ± 1.53 mg EAG/g MS dans la fraction acétate d'éthyle. Ces teneurs sont très importantes comparativement à nos résultats sur les extraits bruts, et les fractions chloroformiques et acétate d'éthyle de la pulpe et des graines de cette même espèce végétale.

Comparativement aux fruits (gousses) d'une autre fabaceae, les travaux d'El Bouzdoudi et *al.* (2017), estiment les teneurs des polyphénols totaux dans la pulpe du fruit d'une variété marocaine de *Ceratonia siliqua* à 11.19 mg EAG/g MS, 26.30 EAG/g MS dans les téguments des graines et 0.80 mg EAG/g MS dans l'endosperme. Ces teneurs sont différentes de celles de notre étude. Benchikh et *al.* (2014), rapportent que les teneurs en polyphénols sur trois variétés algériennes du fruit du caroubier est de 1.35 ± 0.01 à 2.34 ± 0.01 g EAG/100 g MS.

Les travaux de Sebai et *al.* (2013), sur le fruit de cette même plante (variété tunisienne) mentionnent les teneurs suivantes :

Pulpe : 28.07 ± 0.99 mg EAG/Kg MS (extrait aqueux), 8.36 ± 0.48 mg EAG/Kg MS (extrait méthanolique), et 0.27 ± 0.04 mg EAG/Kg MS (extrait éther de pétrole).

Graines : 18.16 ± 1.01 mg EAG/Kg MS (extrait aqueux), 6.79 ± 0.04 mg EAG/Kg MS (extrait méthanolique) et 0.48 ± 0.09 mg EAG/Kg MS (extrait éther de pétrole). Ces quantités sont de loin plus faibles par rapport à nos résultats sur les mêmes solvants.

Selon El-Hashash et *al.* (2010), les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques des feuilles de sept fabaceae sont de 101.46 ± 1.85 à 206.76 ± 2.00 mg EAG/g MS. Ces teneurs sont très élevées par rapport aux teneurs des extraits du fruit du févier d'Amérique.

La quantité des composés phénoliques dans un extrait végétal est influencée par la nature chimique des composés, ainsi que la méthode d'analyse, la sélection des standards et la présence de substances interférentes (Nacz & Shahidi, 2006). La teneur phénolique d'une plante dépend aussi d'un certain nombre de facteurs tels que, les conditions climatiques, le moment de la récolte, le solvant d'extraction, les conditions de stockage.

III.3.2. Les flavonoïdes

Il a été observé que l'effet des solvants sur les polyphénols totaux n'est pas similaire à celui des flavonoïdes et que les quantités des flavonoïdes dans les différentes fractions de la pulpe et des graines sont inférieures à celles des polyphénols totaux. Les fractions acétate d'éthyle et chloroformiques sont les plus riches en flavonoïdes pour les deux parties. Néanmoins toutes les fractions contiennent des flavonoïdes avec des teneurs variables, mais plus importantes dans la pulpe.

Le rendement des teneurs totales en flavonoïdes dans les différents solvants s'est avéré être dans l'ordre décroissant suivant :

FCLG>FAEG>FEPG>FBUG>EMBG>FAQG, pour les graines. Les quantités varient significativement de 0.578 ± 0.108 à 6.998 ± 0.502 mg EC/g MS.

FAEP> FCLP >FAQP> FBUP>EMBP>FEPP, pour la pulpe, avec des teneurs variant de 8.387 ± 0.397 à 25.160 ± 0.016 mg EC/g MS.

La méthode d'isolement des flavonoïdes dépend du type des flavonoïdes présents dans la matière végétale. Les solvants utilisés pour l'extraction sont choisis en fonction de la polarité des flavonoïdes étudiés. Les solvants les moins polaires (éther de pétrole et chloroforme) sont

efficaces pour extraire les flavonoïdes aglycones, peu et moyennement polaires. Les solvants plus polaires tels que l'eau, l'acétate d'éthyle et les alcools (comme le n-butanol) sont utilisés pour extraire les flavonoïdes glycosylés (polaires). Selon Liu et *al.* (2014), l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des formes aglycones ou mono-O-glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et triglycosides et C-glycosides.

Donc le contenu flavonique de nos extraits est réparti en premier dans le chloroforme, qui a probablement pu extraire une quantité d'aglycones, et en second, l'acétate d'éthyle qui pourrait entraîner une large gamme de structures monoglycosylées ou éventuellement aglycones. Le n-butanol, ayant une polarité plus élevée que les deux solvants précédents semble extraire les formes les plus polaires. Le méthanol aqueux est quant à lui efficace pour l'extraction des flavonoïdes aglycones et les flavonoïdes glycosidiques à la fois (Mabry et *al.*, 1970).

Dans notre cas, l'extraction et le dosage montrent que cette espèce est riche en flavonoïdes, possédant des degrés de solubilité très hétérogènes résultant de leurs différences de structure. En effet, des travaux antérieurs (Leibovici et *al.*, 1986 ; Panova & Georgieva 1972 ; Santamour, 1977 ; El-Sayed et *al.*, 2013 ; Bojilov et *al.*, 2014) ont démontré que ce genre botanique renferme les deux types de flavonoïdes; les flavonoïdes glycosylés (vicénine, lucénine, l'isoorientine, l'orientine, vitéxine et l'isovitéxine), surtout les hétérosides de type C-glycosylés caractéristiques des légumineuses et les flavonoïdes aglycones (lutéoline et apigénine). Ils soulignent également, que les flavonoïdes glycosylés identifiés dans l'espèce *Gleditsia triacanthos* sont plus abondants que les flavonoïdes aglycones.

Les résultats d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les extraits des feuilles du févier d'Amérique, indiquent une teneur en flavonoïdes de 23.53 ± 0.18 mg ER/g MS dans l'extrait brut hydro-méthanolique, 15.34 ± 0.52 mg ER/g MS dans la fraction chloroformique et 39.21 ± 0.22 mg ER/g MS dans la fraction acétate d'éthyle. Ces teneurs sont proches de nos résultats des teneurs de la pulpe, et de loin plus faibles des quantités trouvées dans les graines.

Comparativement aux fabaceae, Benchikh et *al.* (2014), ont signalé que les teneurs en flavonoïdes des gousses du caroubier de trois variétés cultivées en Algérie sont comprises entre 135 ± 0.01 et 181 ± 0.01 mg EQ/100g MS. Les résultats de Sebai et *al.* (2013), sur les fruits

immatures (pulpe et graines) d'une variété tunisienne de caroubier, indiquent les teneurs suivantes :

Pulpe : 6.14 ± 1.03 mg EQ/kg MS (extrait aqueux), 2.49 ± 0.28 mg EQ/kg MS (extrait méthanolique), et 0.12 ± 0.03 mg EQ/kg MS (extrait éther de pétrole).

Graines : 8.63 ± 1.27 mg EQ/kg MS (extrait aqueux), méthanol 3.66 ± 0.35 mg EQ/kg MS (extrait méthanolique), et 0.19 ± 0.05 mg EQ/kg MS (extrait éther de pétrole). On constate que ses teneurs sont faibles par rapport à nos extraits sur les mêmes solvants.

Cependant, El-Hashash et *al.* (2010), trouvent des teneurs de flavonoïdes plus importantes que dans nos extraits (de 22.56 ± 1.15 à 71.36 ± 7.20 mg ER/g) sur des extraits hydro-méthanoliques des feuilles de sept plantes appartenant à la famille des fabaceae.

Une comparaison stricte de nos résultats avec ceux de la bibliographie ne peut-être représentative car plusieurs facteurs peuvent influencer la répartition qualitative et quantitative des flavonoïdes.

II.3.3. Les tanins condensés

Les résultats des analyses quantitatives des tanins condensés indiquent que ces molécules ne sont pas les constituants majoritaires des composés phénoliques des différentes fractions, leurs quantités varient significativement ($p < 0.05$) entre 0.305 ± 0.058 et 28.830 ± 0.269 mg EAT/g MS dans les extraits de la pulpe et entre 0.249 ± 0.166 et 14.456 ± 0.144 mg EAT/g MS dans les extraits des graines.

On constate que les teneurs les plus importantes prédominent dans les extraits bruts hydro-méthanoliques et les fractions butanoliques des graines et de la pulpe.

L'efficacité des solvants pour l'extraction des tanins condensés est donnée par ordre décroissant comme suit :

Pour les graines : EMBG > FBUG > FAEG > FCLG > FAQG > FEPPG.

Pour la pulpe : FBUP > EMBP > FAEP > FEPP > FAQP > FCLP.

Les tanins condensés dans notre étude sont répartis avec des teneurs variables en fonction de la nature des solvants. Cette inégalité peut être attribuée à la différence du degré de polymérisation des tanins extraits par les différents solvants. En effet, les tanins condensés à faible degrés de polymérisation sont solubles dans l'eau et les solvants polaires, alors que les tanins à degrés de polymérisation élevés sont solubles dans les solutions alcalines (Rowell,

2012). Ainsi, Terrill et *al.* (1992), classent les tanins condensés en tanins solubles dans les solvants organiques, tanins solubles dans une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) et les tanins insolubles.

Les faibles teneurs en tanins condensés dans le fruit du févier d'Amérique comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant le mieux adapté à l'extraction de ces composés. Cette explication est soutenue par plusieurs travaux, qui ont démontré que le méthanol extrait faiblement les tanins condensés. Ces derniers sont encore mieux solubilisés par l'acétone aqueux (Downey & Hanlin, 2010 ; Naczki & Shahidi, 2006 ; Chavan & Amarowicz, 2013 ; Belmokhtar, 2015).

Une étude réalisée par Karamać et *al.* (2007), utilisant plusieurs solvants (eau, méthanol, éthanol, eau-éthanol, eau-méthanol, acétone, eau-acétone, diméthyl-formamide-eau) pour l'extraction de divers groupes de composés phénoliques à partir des graines de différentes espèces appartenant à la famille des Fabaceae (haricots rouges, lentilles rouges, lentilles vertes, fèves, féverole et vesce) montre que l'acétone à 80%, assure une extraction plus complète des tanins jusqu'à 45% d'extraits bruts, et une bonne activité antioxydante des extraits obtenus.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de Benhamiche et *al.* (2016), sur les extraits hydro-méthanoliques du fruit de *Gleditsia triacanthos*, citant un taux de tanins condensés plus faible dans la pulpe ($0.13 \pm 0.001\%$) et les graines ($0.03 \pm 0.007\%$).

Cependant, plusieurs autres études ont mentionné des quantités de tanins condensés plus importantes par rapport à nos résultats. Selon Kamalak et *al.* (2012), les tanins condensés sont de 27.8 à 148.2 g.kg⁻¹ MS dans les gousses du févier d'Amérique récoltées de plusieurs sites en Turquie. Eisenman et *al.* (2013), estiment que les fruits en renferment 3.1%. Kaya et *al.* (2016), indiquent des teneurs de tanins condensés très importantes (8.35%) dans la pulpe comparativement à nos résultats, alors que dans les graines le dosage montre de faibles teneurs (0.27 %). Bruno-Soares & Abreu (2003), ont révélé des teneurs plus importantes en tanins condensés dans les gousses récoltées en Portugal (54 g kg⁻¹ MS) que celles trouvées dans notre étude. Les résultats de Canbolat (2012), sur les feuilles de *Gleditsia triacanthos* montrent de fortes teneurs en tanins condensés, de l'ordre de 16.11%.

Les travaux de Sebai et *al.* (2013), sur les gousses du caroubier donnent les teneurs suivantes :

Pulpe : 6.71 ± 0.71 mg EQ/kg MS (extrait aqueux), 1.71 ± 0.21 mg EQ/kg MS (extrait méthanolique), et 0.05 ± 0.01 mg EQ/kg MS (extrait éther de pétrole).

Graines : 6.97 ± 0.91 mg EQ/kg MS (extrait aqueux), 2.34 ± 0.94 mg EQ/kg MS (extrait méthanolique) et 0.08 ± 0.02 mg EQ/kg MS (extrait éther de pétrole). Ces résultats montrent que les tanins condensés se retrouvent principalement dans les extraits aqueux, ce qui ne correspond pas à nos résultats.

Pour notre étude les gousses du caroubier (*Ceratonia siliqua*) ont été choisies principalement comme espèce de référence pour comparer nos résultats, car il y a peu d'informations sur la composition phénolique des gousses du févier d'Amérique, de plus les gousses sont semblables et comparables à celles de *Gleditsia triacanthos* en termes de caractéristiques chimiques.

Toutefois, il est important de signaler que l'utilisation de différentes méthodes de dosage et de différents standards chimiques, les conditions environnementales et expérimentales réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Enfin, on conclut que la sélectivité du solvant utilisé influence la teneur en polyphénols en flavonoïdes et en tanins condensés. On peut considérer les solvants ; chloroforme et acétate d'éthyle comme efficace pour extraire les polyphénols et les flavonoïdes à partir du fruit du févier d'Amérique. Tandis que le butanol s'est montré le plus adapté à solubiliser les tanins condensés.

II.4. Évaluation de l'activité antioxydante

La plante, tout comme tout être vivant, consomme beaucoup d'énergie au cours de son développement, enregistrant une forte consommation d'oxygène et produisant par conséquent des radicaux libres (Alitonou et *al.*, 2004), ce qui induit un mécanisme de défense réactionnelle par la production d'antioxydants naturels, entre autres les composés phénoliques.

À cet effet, le monde végétal a largement été exploré pour ses potentialités antioxydantes par le fait que les composés phénoliques y sont fortement répandus et sont donc à ce titre sources potentielles d'antioxydants. Les extraits végétaux naturels à usage antioxydant auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies (De-Reynal & Multon, 2009).

La capacité antioxydante des molécules peut-être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atomes d'hydrogène, soit par transfert d'électrons (Prior et *al.*, 2005).

Dans ce contexte, nous avons déterminé par deux méthodes *in vitro*, l'activité antioxydante sur les différents extraits. Les résultats de l'activité antioxydante sont mentionnés globalement dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des activités antioxydantes.

<i>Partie végétale</i>	<i>Extrait</i>	<i>Capacité antioxydante totale (mg EAA/g MS)</i>	<i>Test du DPPH IC₅₀ (µg/ml)</i>
Graines	EMBG	1,132 ± 0,091	117.772 ± 12.304
	FEPG	6,232 ± 1,034	264.933 ± 7.514
	FCLG	12,484 ± 0,458	78.027 ± 3.922
	FAEG	9,066 ± 1,770	50.455 ± 1.315
	FBUG	3,042 ± 0,272	86.602 ± 0.387
	FAQG	0,959 ± 0,042	194.489 ± 2.834
Pulpe	EMBP	102,180 ± 3,728	93,964 ± 1,350
	FEPP	132,923 ± 14,474	114,619 ± 0,882
	FCLP	750,584 ± 129,793	95,583 ± 3,529
	FAEP	362,688 ± 30,131	16,288 ± 0,299
	FBUP	40,828 ± 2,766	147,302 ± 3,320
	FAQP	10,723 ± 0,658	152,465 ± 6,262

II.4.1. Capacité antioxydante totale

Le test de Phosphomolybdate mesure le degré de réduction de Mo⁶⁺ en Mo⁵⁺. Ce dosage est une méthode quantitative pour évaluer le taux de réaction de réduction parmi les antioxydants, oxydants et ligands du molybdène. Il implique l'auto-oxydation par la génération thermique pendant la période prolongée d'incubation à température élevée et donne une estimation directe de la capacité réductrice des entités antioxydantes présentes dans les extraits végétaux (Phatak & Hendre, 2014).

Ce dosage de la capacité antioxydante totale se base sur un mécanisme de transfert d'électron singulet et d'atome d'hydrogène (Agbo et *al.*, 2015). Il implique la réduction d'un oxydant qui entraîne un changement de couleur. La méthode spectrophotométrique au phosphomolybdate selon Prieto et *al.* (1999), a été utilisée pour déterminer la capacité de réduction des extraits bruts hydro-méthanoliques et des différentes fractions issues de ces extraits de graines et de pulpe (éther de pétrole, chloroformiques, acétate d'éthyle, butanoliques et aqueuses).

La capacité antioxydante totale des différents extraits est calculée à partir de la courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide ascorbique comme antioxydant de référence. Cette courbe (Figure 25) a pour équation la formule suivante : $y = 0.3131\ln(x) - 1.2566$, avec un $R^2 = 0.9875$. Les valeurs importantes des absorbances obtenues indiquent la forte capacité antioxydante de cette molécule standard (acide ascorbique).

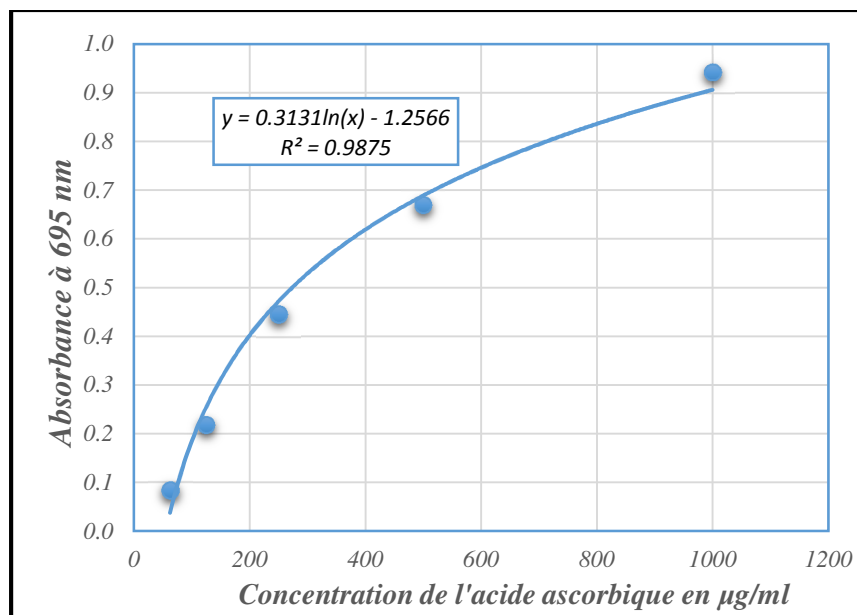


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.

Les résultats de ce test montrent que tous les extraits présentent des capacités antioxydantes avec une différence significative ($p < 0.05$) entre les solvants d'extraction. En outre, les extraits de la pulpe présentent des capacités antioxydantes nettement supérieures à celles des extraits de graines (figures et 26 et 27). Ces capacités antioxydantes varient de $0,959 \pm 0,042$ à $12,484 \pm 0,458$ mg EAA/g MS pour les graines et de $10,723 \pm 0,658$ à $750,584 \pm 129,793$ mg EAA/g MS pour la pulpe.

Ce résultat est en accord avec ceux d'Annegowda et *al.* (2013), et Boukhanouf et *al.* (2016), qui ont indiqué que les pulpes de certaines légumineuses (*Clitoria fairchildiana* et *Vicia faba* L.) présentaient des capacités antioxydantes supérieures à celles des extraits des graines.

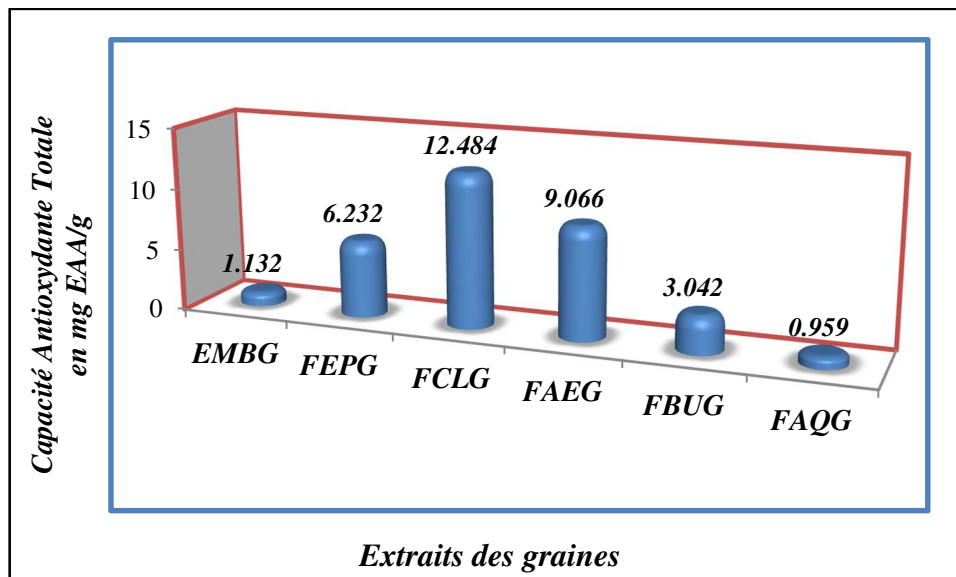


Figure 26 : Capacité antioxydante totale des extraits des graines.

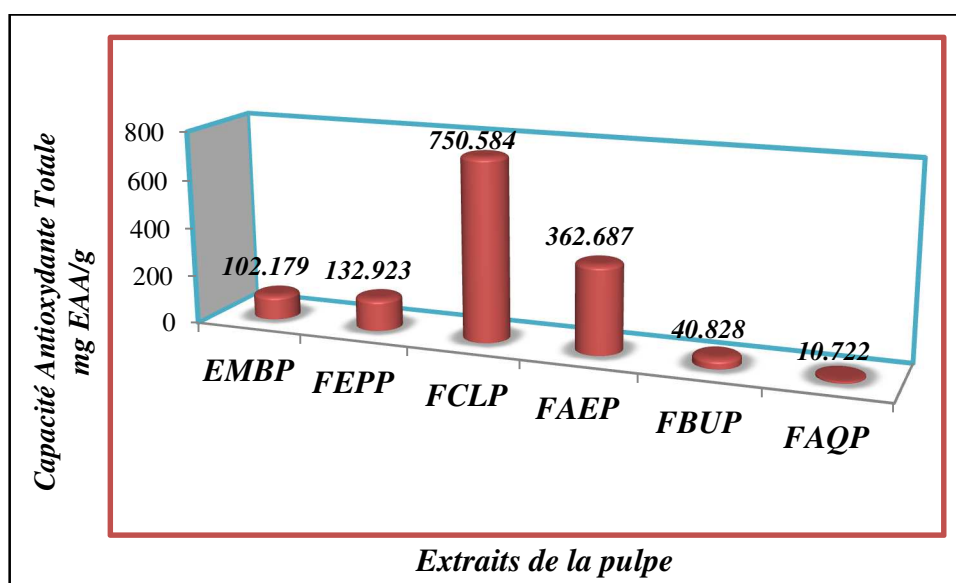


Figure 27 : Capacité antioxydante totale des extraits de la pulpe.

On constate que les extraits bruts hydro-méthanoliques de la pulpe et des graines ne sont pas les plus antioxydants. Ceci concorde avec les résultats d'Elkhamlichi et *al.* (2017), qui soulignent que les extraits bruts méthanoliques des gousses de *Calycotome villosa* (fabaceae) ont montré la plus faible activité antioxydante.

Agbo et *al.* (2015), ont déterminé des capacités antioxydantes moins importantes dans les extraits méthanoliques des feuilles de trois fabaceae (*Baphia nitida* : 0.935 ± 0.25 mg EAA/g ; *Crotolaria retusa* : 0.938 ± 1.00 mg EAA/g ; *Zapoteca portoricensis* : 0.897 ± 1.10 mg EAA/g).

On note aussi que les plus fortes capacités antioxydantes de la pulpe et des graines se trouvent dans les fractions chloroformiques ($12,484 \pm 0,458$ mg EAA/g MS pour les graines et $750,584 \pm 129,793$ mg EAA/g MS pour la pulpe), suivis des fractions acétate d'éthyle ($9,066 \pm 1,770$ mg EAA/g MS pour les graines et $362,688 \pm 0,131$ mg EAA/g MS pour la pulpe). Nos résultats sont en accord avec ceux de Belmokhtar (2015), sur *Retama monosperma*. L. Boiss (fabaceae), démontrant que les fractions chloroformiques des tiges (86.29 ± 0.52 mg EAA/g MS) et des fleurs (107.87 ± 0.72 mg EAA/g MS), présentent les capacités antioxydantes les plus élevées par rapport aux autres fractions.

Ces fortes activités (CAT) peuvent être attribuées aux teneurs des composés phénoliques importantes dans ces fractions. En effet, des études antérieures ont confirmé que la capacité antioxydante est liée à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes, connus pour inhiber les radicaux libres (Aliyu et *al.*, 2011; Agbo et *al.*, 2015). L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres.

Les capacités antioxydantes totales de nos extraits sont différentes selon la nature des solvants extracteurs. On classe ces capacités selon un ordre décroissant comme suit :

FCLG>FAEG>FEPG> FBUG >EMBG>FAQG, pour les graines.

FCLP > FAEP>FEPP >EMBP>FBUP >FAQP, pour la pulpe.

Selon El Sayed et *al.* (2013), les feuilles de *Gleditsia triacanthos* présentent des capacités antioxydantes totales aussi importantes que celles signalées par notre étude sur la pulpe. Ces résultats mentionnent une CAT de 418.53 ± 3.78 mg EAA/g MS sur la fraction acétate d'éthyle qui se trouve donc être la plus importante, suivie par l'extrait brut hydro-méthanolique avec 288.51 ± 2.19 mg EAA/g MS et enfin la fraction chloroformique avec 174.51 ± 2.92 mg EAA/g MS.

Nos résultats diffèrent de ceux d'El-Hashash et *al.* (2010), qui indiquent une capacité antioxydante totale de l'ordre de 818.68 ± 0.30 mg EAA/g MS sur la fraction acétate d'éthyle

du fruit (gousses) de *Cassia glauca* (fabaceae), suivie par les fractions butanolique et chloroformique avec une CAT de 443.35 ± 2.66 et 338.32 ± 7.48 mg EAA/g MS respectivement.

Selon El Hajaji et *al.* (2010), les capacités antioxydantes totales des extraits acétate d'éthyle des feuilles de trois variétés de *Ceratonia siliqua* L sont les plus importantes avec des valeurs de 100.00, 106.81 et 107.30 μ g EAA/g MS. Ces capacités sont de loin plus faibles comparativement à la CAT de la fraction FAEP. Dans le même contexte, Elkhamlichi et *al.* (2017), ont observé que l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Calycotome villosa* (fabaceae), possédait une capacité antioxydante totale significative équivalant à 157,6 mg EAA/ g, suivi de l'extrait méthanolique.

Les phases aqueuses résiduelles sont les moins antioxydantes avec des capacités antioxydantes de $0,959 \pm 0,042$ et $10,723 \pm 0,658$ mg EAA/g MS pour les graines et la pulpe respectivement. Ceci peut-être expliqué par l'épuisement des teneurs des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante, par les différents solvants à polarité croissante utilisés pour le fractionnement. Ces fractions aqueuses se retrouvent donc appauvries en substances bioactives. Ce résultat est en accord avec celui de Kasangana et *al.* (2015), qui indique que l'extrait aqueux de *Myrianthus Arboreus* a montré un potentiel antioxydant (CAT) beaucoup plus faible ($40,3 \pm 3,9$ mg ET/ g) que les autres extraits et fractions.

Contradictoirement à plusieurs autres études signalant la faible activité antioxydante des fractions éther de pétrole, nos résultats indiquent des capacités antioxydantes relativement importantes de ces fractions dans les graines et la pulpe ($6,232 \pm 1,034$ et $132,923 \pm 14,474$ mg EAA/g MS respectivement). En effet, Hamed et *al.* (2017), ont enregistré des valeurs de CAT relativement faibles sur les fractions apolaires chloroformique et éther de pétrole des feuilles de *Moringa oleifera*, avec des valeurs de 76,62 et 50,83 mg EAA / g MS, respectivement.

Cependant, Kasangana et *al.* (2015), démontrent des résultats similaires aux nôtres sur la fraction hexanique (solvant apolaire) de *Myrianthus Arboreus* avec une CAT intermédiaire de 105.7 mg ET/ g.

II.4.2. Test du piégeage du radical libre de DPPH

Le test antioxydant DPPH est basé sur la capacité d'un antioxydant potentiel à piéger le radical du DPPH, un radical libre stable contenant un électron impair, qui est responsable d'une forte bande d'absorption à 515-520 nm. En présence de composés antioxydants, le DPPH peut accepter un électron ou un atome d'hydrogène de la molécule piègeuse antioxydante, pour être converti en une molécule de DPPH plus stable. Comme la forme réduite de DPPH est jaune pâle, plus la capacité de piégeage des radicaux libres d'un composé antioxydant est grande, plus la solution de DPPH est réduite et moins la couleur pourpre est présente dans l'échantillon (Elkhamlichi et *al.*, 2017).

L'activité de piégeage des radicaux DPPH de nos extraits est donnée par les figures 28 et 29. La gamme de concentrations utilisées est de 1.562 à 200 µg/ml. Les valeurs de DO obtenues montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Les résultats sont illustrés sous forme de courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec des R^2 variant de 0.9473 à 0.9986.

On note que l'activité antioxydante exercée sur le radical libre DPPH par les extraits et fractions est dose-dépendante. En effet, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p \leq 0.05$) avec l'augmentation de la concentration des extraits.

Les résultats montrent également que tous les extraits et fractions sont dotés d'une activité antioxydante (anti-DPPH) significative ($p \leq 0.05$), qui varie d'un extrait à un autre et d'une fraction à une autre pour les graines et la pulpe.

Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. Cela pourrait être dû à la présence des groupes méthoxy qui augmentent l'accessibilité du centre du radical de DPPH à l'acide ascorbique. (Mokbel & Hashinaga, 2005 in : Nithiya & Udayakumar, 2016). Ce résultat pourrait aussi être expliqué par le fait que l'effet additif ou synergique des polyphénols rend l'activité antioxydante des extraits faible que celle des composés bioactifs isolés. De plus, la teneur totale en composés phénoliques de l'extrait brut n'incorpore pas tous les antioxydants (Hayouni et *al.*, 2007).

À la concentration de 200 µg/ml, l'activité maximale de piégeage du radical libre DPPH a été observée pour tous les extraits. Les fractions acétate d'éthyle des graines et de la pulpe exhibent les pourcentages d'inhibition les plus élevés avec 85,452% et 92,436% respectivement

contre 92,06% pour l'acide ascorbique à la même concentration. Les phases aqueuses des graines et de la pulpe se sont montrées moins efficaces à neutraliser le radical de DPPH.

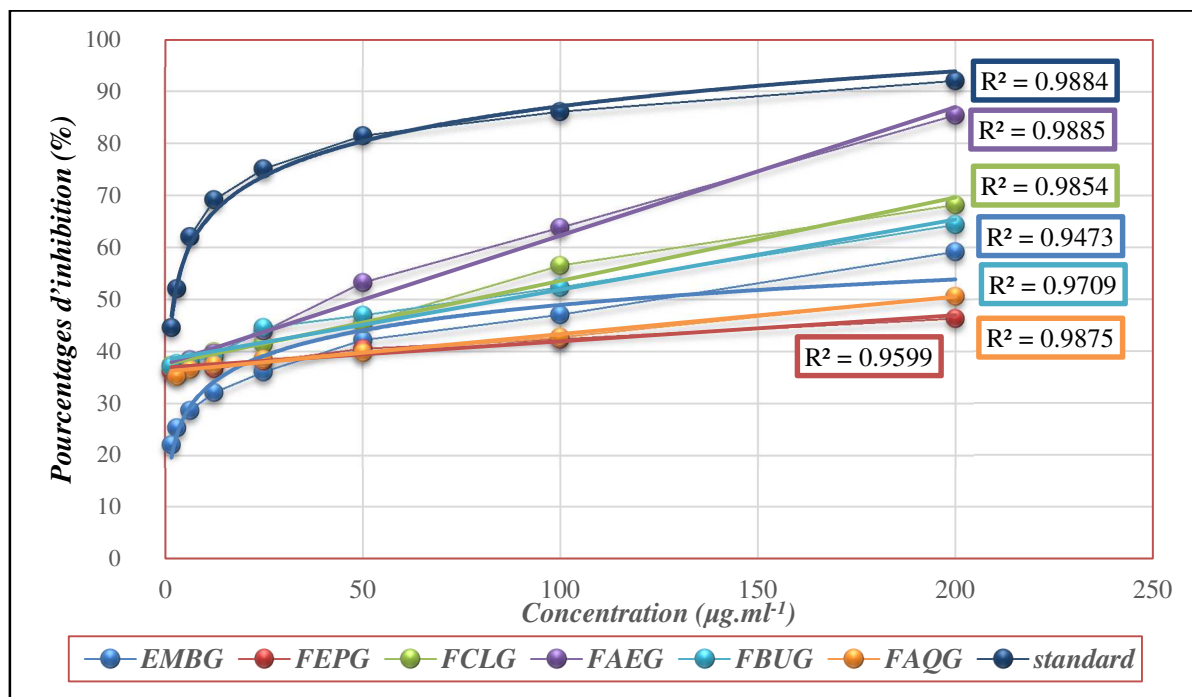


Figure 28 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits des graines de *Gleditsia triacanthos* et du standard.

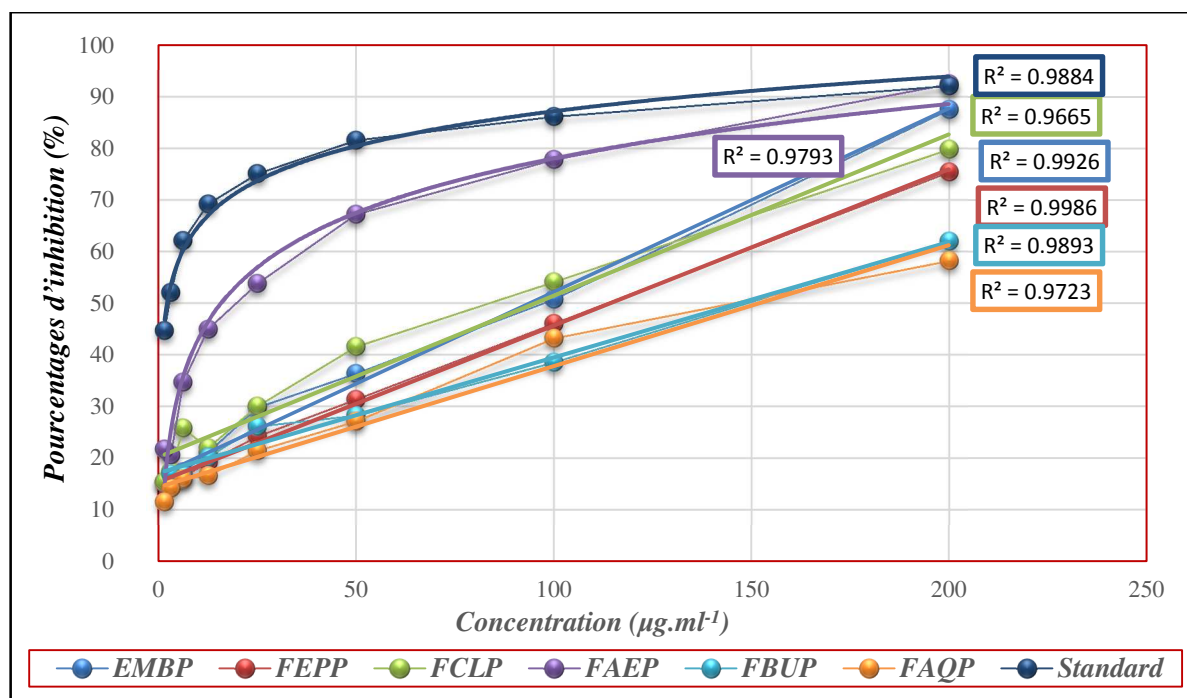


Figure 29 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de la pulpe de *Gleditsia Triacanthos* et du standard.

II.4.2.1. Évaluation des IC₅₀

L'IC₅₀ est considérée comme un paramètre d'efficacité antiradicalaire. Elle exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer la concentration de DPPH de 50 %.

L'IC₅₀ d'un composé est inversement proportionnelle à sa capacité antioxydante (pouvoirs antiradicalaires). Les différentes IC₅₀ sont obtenues à partir des équations des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et sont représentées dans les figures 30 et 31.

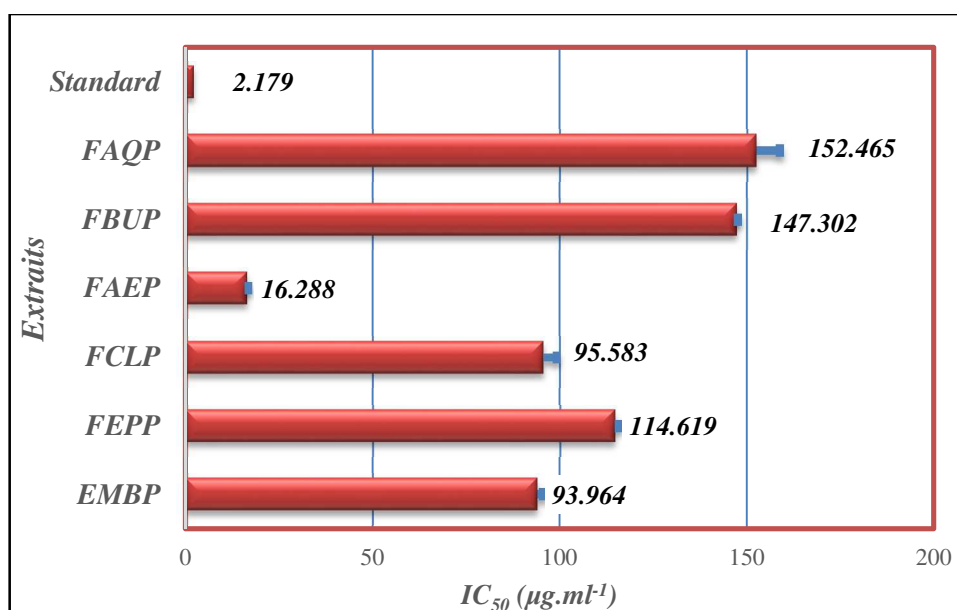


Figure 30 : Valeurs des IC₅₀ des extraits de la pulpe de *Gleditsia triacanthos*.

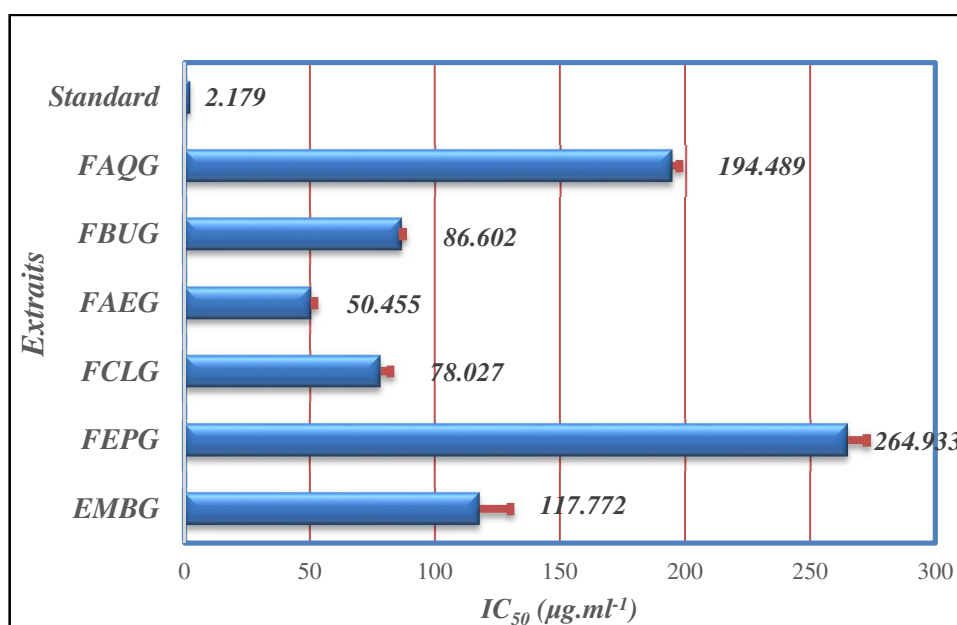


Figure 31 : Valeurs des IC₅₀ des extraits des graines de *Gleditsia Triacanthos*.

On constate que l'activité antiradicalaire des extraits de la pulpe est jugée meilleure que celle des extraits des graines pour la majorité des extraits. Ceci est confirmé par les résultats d'Annegowda et *al.* (2013), observant des pourcentages d'inhibition du radical de DPPH par les extraits des gousses de *Clitoria fairchildiana*, plus importants que ceux des extraits des graines.

Ces activités antioxydantes dépendent fortement de la nature du solvant utilisé, en raison des potentiels antioxydants différents des composés à polarité différente. En effet, les résultats de Hajaji et *al.* (2010), sur les extraits des feuilles de trois variétés de Caroubier, et khatoon et *al.* (2013), sur les feuilles d'*Albizia procera*, ont permis de conclure que l'activité antioxydante par la méthode de DPPH est affectée par le solvant d'extraction.

On classe (par ordre décroissant) les pouvoirs antioxydants obtenus par le test de DPPH de nos extraits et fractions selon les solvants utilisés comme suit :

Graines : FAEG > FCLG > FBUG > EMBG > FAQG > FEPPG ;

Pulpe : FAEP > EMBP > FCLP > FEPP > FBUP > FAQP.

Selon les figures 30 et 31, les IC₅₀ obtenues varient de 16,288 ± 0,299 à 264.933 ± 7.514 µg/ml. Ces résultats se rapprochent de ceux d'El-Hashash et *al.* (2010), sur les extraits méthanoliques des feuilles de plusieurs espèces de Cassia égyptiennes (fabaceae), citant des valeurs allant de 18.53 à 225.88 µg/ml.

Parmi les extraits et fractions des graines et de la pulpe de *Gleditsia Triacanthos*, les fractions acétate d'éthyle des graines et de la pulpe donnent les meilleurs pouvoirs antiradicalaires, avec des IC₅₀ assez basses (50.455±1.315 et 16,288±0,299 µg/ml respectivement). Les fractions chloroformiques (FCLG et FCLP) ainsi que l'extrait brut hydro-méthanolique de la pulpe (EMBP) présentent eux aussi des valeurs d'IC₅₀ intéressantes. Les autres extraits et fractions de cette plante ont montré une activité antioxydante modérée comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard.

La forte capacité d'élimination du radical libre (décoloration de la solution de DPPH) de l'extrait acétate d'éthyle de la pulpe (FAEP) est peut-être due à la capacité des composés polyphénoliques présents dans cet extrait à donner un hydrogène et ou/électrons, lui conférant un excellent pouvoir antioxydant agissant comme inhibiteur des radicaux libres.

Plusieurs études ont souligné les forts pouvoirs anti-radicalaires des fractions acétate d'éthyle. En effet, Hajaji et *al.* (2010), affirment que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de

Ceratonia siliqua L constitue un matériel de départ prometteur pour l'isolement des composés à activités antioxydantes.

Les résultats d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les extraits des feuilles de *Gleditsia triacanthos*, indiquent une activité antiradicalaire importante de la fraction acétate d'éthyle avec une valeur d'IC₅₀ très proche ($15.42 \pm 0.53 \mu\text{g/ml}$) de celle trouvée dans notre étude sur la fraction acétate d'éthyle de la pulpe (FAEP). Selon ces mêmes auteurs, la fraction chloroformique des feuilles s'est montrée quant à elle moins active avec une IC₅₀ de $98.53 \pm 0.82 \mu\text{g/ml}$, contre $78.027 \pm 3.922 \mu\text{g/ml}$ pour notre fraction chloroformique de la pulpe (FCLP). Par contre, l'extrait brut hydro-méthanolique s'est montré beaucoup plus actif (IC₅₀= $47.10 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$) que l'extrait méthanolique brut de la pulpe.

Les travaux de Ouis & Hariri (2017), sur le fruit (gousses) de *Ceratonia siliqua*, indiquent qu'à une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$, le pouvoir antiradicalaire de la fraction acétate d'éthyle montre qu'il est le plus actif avec un pourcentage d'inhibition de $84,3 \pm 0,13\%$ (IC₅₀= $62,5 \mu\text{g/ml}$). Suivi de l'extrait méthanolique brut ($79,11 \pm 0,9 \%$, IC₅₀= $125 \mu\text{g/ml}$), puis de la fraction butanolique ($76,01 \pm 1,31\%$, IC₅₀ = $250 \mu\text{g/ml}$) et enfin la phase aqueuse résiduelle ($64,16 \pm 1,32\%$, IC₅₀= $450 \mu\text{g/ml}$).

El-Hashash et *al.* (2010), notent également que la fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Cassia glauca* (fabaceae) présente la plus faible IC₅₀ (5.43 mg/ml) suivie par la fraction butanolique et chloroformique.

Nos résultats concordent également avec ceux de Belmokhtar (2015), sur *Retama monosperma. L Boiss* (fabaceae), démontrant que les fractions acétate d'éthyle des tiges ($1.51 \pm 0.11 \text{ mg/ml}$) et des graines ($0.15 \pm 0.11 \text{ mg/ml}$) présentent les IC₅₀ les plus faibles et donc les pouvoir antioxydants les plus élevés. Par contre, c'est la fraction chloroformique des fleurs qui donne le meilleur pouvoir antiradicalaire.

Nos résultats sont différents de ceux d'Elkhamlichi et *al.* (2017). Ils soulignent que l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Calycotome villosa* subsp. *Intermedia*, a montré une activité antioxydante élevée, capable de piéger plus de 80% du radical DPPH à une concentration de 4 mg/ml (IC₅₀= $0,2 \text{ mg/ml}$), contre 85,452 % pour notre fraction acétate d'éthyle des graines (FAEG) à seulement 0.2 mg/ml (20 fois plus faible). L'activité de l'extrait méthanolique des

graines de cette même plante est comparativement plus faible ($IC_{50} = 0,34$ mg/ml) que celle de notre extrait hydro-méthanolique des graines, EMBG ($IC_{50} = 117.772 \pm 12.304$ µg/ml).

Cependant, les mêmes auteurs, indiquent que l'extrait d'acétate d'éthyle des gousses de *Calycotome villosa* ($IC_{50} : 3,5$ mg/ml) a montré une faible activité de piégeage du radical de DPPH, comparativement à l'extrait méthanolique ($IC_{50} : 1,53$ mg/ml), qui est capable de piéger $76,15 \pm 0,04$ % du radical DPPH à une concentration de 4 mg/ml. Les extraits de la pulpe pour les mêmes solvants présentent donc un meilleur pourcentage antiradicalaire ($92,436$ % à une concentration de 0,2 mg/ml pour la fraction acétate d'éthyle et $87,478$ % pour l'extrait brut de la pulpe à la même concentration).

Contrairement à ces études, les travaux d'Ydjedd et *al.* (2017), sur le fruit de *Ceratonia siliqua* L, soulignent que c'est l'acétone aqueux (70%) qui donne la meilleure activité de piégeage du radical libre de DPPH et que la fraction acétate d'éthyle présente une IC_{50} largement plus élevée (992.04 ± 14.44 µg/ml), correspondant à une faible activité antioxydante. En outre, et contrairement à nos résultats, ils relèvent une absence du pouvoir antiradicalaire sur la fraction chloroformique. En effet nos fractions chloroformiques des graines et de la pulpe sont dotées d'un pouvoir antioxydant intéressant, avec des IC_{50} de 78.027 ± 3.922 et $95,583 \pm 3,529$ µg/ml respectivement.

Les phases aqueuses résiduelles des graines et de la pulpe (FAQG et FAQP) présentent de faibles pouvoirs antioxydants avec des IC_{50} de 194.489 ± 2.834 et $152,465 \pm 6,262$ µg/ml respectivement. Ce résultat ne concorde pas avec celui de Cerqueira et *al.* (2010), sur les graines de *Gleditsia triacanthos*, qui soulignent que les phases aqueuses, obtenues par extraction liquide-liquide à partir des extraits éthanoliques bruts, se sont révélées plus efficaces à piéger le radical libre de DPPH, avec des IC_{50} moins élevées que les extraits bruts.

La fraction éther de pétrole de la pulpe (FEPP) présente un pouvoir antiradicalaire intermédiaire. Contrairement à ce résultat, des études précédentes ont signalé l'inefficacité antiradicalaire des extraits végétaux issus de ce solvant, compte tenu de sa nature apolaire, peu accommodée à extraire les composés phénoliques (Saffidine et *al.*, 2015). Cependant, Verma & Pandey (2014), mentionnent un résultat similaire au nôtre, mettant en avant une capacité antiradicalaire anti-DPPH importante de la fraction éther de pétrole des gousses de *Acacia catechu* (fabaceae). Cela pourrait indiquer que la fraction éther de pétrole de la pulpe de

Gleditsia triacanthos contient non seulement des molécules de faible polarité, mais aussi que ces molécules fonctionnent comme un agent actif pour le piégeage des radicaux de DPPH.

Également et en accord avec ces résultats, Al-Owaisi et *al.* (2014), notent que de façon surprenante, l'extrait d'hexane (solvant apolaire) qui n'a pas révélé la présence de composés phénoliques présentait également une bonne activité de piégeage des radicaux libres, suggérant que les extraits d'hexane contiennent des constituants non-phénoliques qui sont responsables de son activité antioxydante.

Cette différence entre les études citées, en plus de la méthode d'extraction, peut-être expliquée par la nature, et la teneur en composés phénoliques et ainsi au fait que l'activité antioxydante est différente pour les différents organes des plantes (Kahkonen et *al.*, 1999). En plus, Ydjedd et *al.* (2017), rapportent que la phase de maturation de la plante intervient fortement dans l'activité antioxydante, observant des différences dans les teneurs phénoliques entre jeunes et vieilles matrices végétales (gousses de caroubier) avec une diminution du pouvoir antiradicalaire contre la radical DPPH.

L'importance de l'activité antioxydante des extraits végétaux se concentre sur leur richesse en molécules à haut potentiel antioxydant tel que les acides phénoliques et les flavonoïdes. En effet, d'après les résultats obtenus, la variation du pouvoir antioxydant des différents extraits et fractions des graines et de la pulpe de *Gleditsia triacanthos*, pourrait s'expliquer par leur richesse différentielle en polyphénols et plus particulièrement la nature de ces composés qui contribue à leur capacité de transfert d'électrons / donc d'hydrogène (Brand-Williams et *al.*, 1995).

On suggère donc que les extraits du fruit du févier d'Amérique présentent une activité antioxydante intéressante. Ce potentiel antioxydant des différents extraits, peut-être attribué à la présence de flavonoïdes, tanins, stérols et terpènes, alcaloïdes et les autres composés phénoliques.

Les flavonoïdes particulièrement, possèdent généralement une activité antioxydante plus élevée en raison des doubles liaisons existant dans le cycle C. Généralement, l'activité de piégeage des radicaux des flavonoïdes dépend de leur structure et de l'arrangement des groupes hydroxyles. L'activité de piégeage radicalaire la plus élevée est présentée par des composés qui ont une structure ortho-3,4-dihydroxy au niveau du cycle B (par exemple, la quercétine), des groupes hydroxyle en position méta 5,7, di-hydroxy sur le cycle A (par exemple, le kaempférol),

ainsi que ceux qui ont une double liaison entre les groupes hydroxyle C₂ et C₃ au cycle C (Loganayaki et *al.*, 2013 ; Amic et *al.*, 2003).

Sur la base des données obtenues par cette étude, il convient de considérer que le fruit de *Gleditsia triacanthos* est un bon antioxydant inhibiteur ou piègeur de radicaux libres, qui peut être bénéfique dans la prévention de plusieurs maladies dues aux stress oxydatif.

II.5. Corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante

Selon Bruneton (2009), la famille des composés phénoliques est dotée de nombreuses activités biologiques y compris anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antioxydante...etc. Dans cette optique, nous avons donc établie des relations entre ces composés et les activités antioxydantes étudiées.

Afin d'explorer cette relation, on a déterminé la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés et les différentes activités antioxydantes testées, à savoir ; la capacité antioxydante totale et le pouvoir antiradicalaire (piégeage du radical libre de DPPH) par établissement des courbes de régressions linéaires et en déterminant le coefficient de corrélation (R^2) de celles-ci.

D'après les tracés illustrés en figure 32, une très forte corrélation positive ($R^2 = 0.962$) est observée entre la teneur en flavonoïdes des graines et les résultats de la capacité antioxydante totale. Les polyphénols totaux sont moyennement corrélés à cette activité.

De même, la capacité de piégeage du radical libre de DPPH des extraits des graines (figure 33) est directement corrélée aux teneurs des polyphénols totaux et des flavonoïdes avec des coefficients de corrélation R^2 de 0.663 et 0.634 respectivement. Ces résultats indiquent également que les tanins condensés des graines ne sont que très faiblement impliqués ($R^2 = 0.262$) dans le processus antiradicalaire (test de DPPH) des extraits ainsi que par rapport à leur capacité réductrice, CAT ($R^2 = 0.138$).

La détermination des coefficients de corrélation entre les IC₅₀ et le contenu en composés phénoliques a montré l'existence d'une corrélation négative, cette relation inverse fait que les valeurs des IC₅₀ diminuent avec l'augmentation du contenu de phénoliques.

Les données de la figure 34 indiquent que pour la pulpe, il existe une corrélation fortement positive ($R^2 = 0.844$) entre les teneurs en polyphénols totaux et la capacité antioxydante totale.

Cette activité est également corrélée aux teneurs en flavonoïdes de la pulpe, tandis que les tanins condensés en sont très faiblement corrélés à cette activité ($R^2 = 0.165$).

La corrélation entre les IC_{50} et les teneurs phénoliques (figure 35) révèle que les flavonoïdes de la pulpe sont capables de neutraliser le radical libre de DPPH, mais que cette activité est faible pour les tanins condensés et les polyphénols totaux avec des coefficients de corrélation R^2 de 0.223 et 0.132 respectivement.

Ces résultats de corrélation montrent que l'activité antioxydante des extraits de la pulpe et des graines est attribuable en une grande partie aux polyphénols totaux et aux flavonoïdes. Ces derniers sont reconnus comme de puissants antioxydants surtout grâce à leur structure.

Selon l'étude bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation.

En effet, en essayant d'établir une corrélation entre l'activité antiradicalaire par le test de DPPH et la composition chimique des extraits des feuilles de *Gleditsia triacanthos*, Mohammed et *al.* (2014), ont démontré qu'un flavonoïde pur (lutéoline), isolé et identifié dans les feuilles de *Gleditsia triacanthos* est directement impliqué dans le processus antioxydant par piégeage du radical libre de DPPH.

En accord avec nos résultats, Cerqueira et *al.* (2010), confirment une corrélation positive entre les teneurs en polyphénols totaux et le pouvoir antiradicalaire (IC_{50}) des extraits éthanoliques des graines de *Gleditsia triacanthos*.

Les travaux d'Ydjedd et *al.* (2017), sur les gousses de *Ceratonia siliqua*, notent que le contenu en polyphénols et en flavonoïdes a montré une corrélation positive avec le test de DPPH pour quatre extraits (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et acétone), exhibant une corrélation plus significative principalement avec les flavonoïdes qu'avec les polyphénols totaux, ce qui signifie que les flavonoïdes sont des contributeurs importants à l'activité antioxydante.

Aussi et dans la même concordance de résultats, Belmokhtar (2015), montre par l'établissement des courbes de corrélation que le coefficient de corrélation est très faible entre les tanins condensés quantifiés dans les extraits de *Retama monosperma. L Boiss* (fabaceae) et leur capacité antioxydante, et que les flavonoïdes sont les composés majeurs impliqués dans

cette activité avec un coefficient de corrélation de 0,91 pour la capacité antioxydante totale et 0,79 pour le test de DPPH.

Khorasani Esmaeili et *al.* (2015), soulignent qu'une corrélation significative a été établie entre l'activité antioxydante des extraits de *Trifolium pretense* (fabaceae) et leur teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes pour différents tests antioxydants réalisés *in vitro*. En effet un coefficient de corrélation de 0.849 a été établi pour les flavonoïdes et 0.822 pour les polyphénols totaux pour le test de piégeage de DPPH.

Les résultats d'Annegowda et *al.* (2013), démontrent une forte corrélation entre la teneur en polyphénols totaux ($R^2= 0.911$) et la capacité antioxydante totale (CAT) des extraits des gousses et des graines de *Clitoria fairchildiana* (fabaceae). Mais contrairement à nos résultats les tanins étaient également fortement corrélés à cette activité ($R^2= 0.942$).

El-Hashash et *al.* (2010), indiquent qu'il existe une corrélation linéaire entre la concentration phénolique totale des extraits méthanoliques de sept espèces de *Cassia glauca* (fabaceae) et leur capacité antioxydante totale avec un R^2 de 0,789 et leurs activités de piégeage des radicaux libres avec un 0,937. En outre, ces mêmes auteurs enregistrent également une corrélation positive entre la concentration phénolique totale des fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique de *Cassia glauca* et de leur activité antioxydante.

Les résultats de Bakasso (2009), sur quatre espèces d'Indigofera (fabaceae), prouvent que les extraits présentant les plus fortes teneurs en polyphénols, en tanins, et en flavonoïdes, sont ceux qui ont enregistré les plus fortes capacités antioxydantes d'où les fortes corrélations positives obtenues ($R^2 = 0,9800$ pour le test de DPPH). En outre, Abaza et *al.* (2011), ont révélé que les solvants d'extraction ont une influence significative sur les propriétés antioxydantes des feuilles de l'olivier, et que la capacité antioxydante déterminée par le test de DPPH (IC_{50}) dépend beaucoup plus des flavonoïdes que des polyphénols totaux.

Aussi, il est bien connu que l'activité antioxydante est positivement corrélée avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim, et *al.* 2002), due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres. Cette activité de piégeage du radical libre de DPPH est non seulement liée à la capacité de donner un atome d'hydrogène, mais aussi à la réaction de polymérisation subséquente (Hotta et *al.*, 2002).

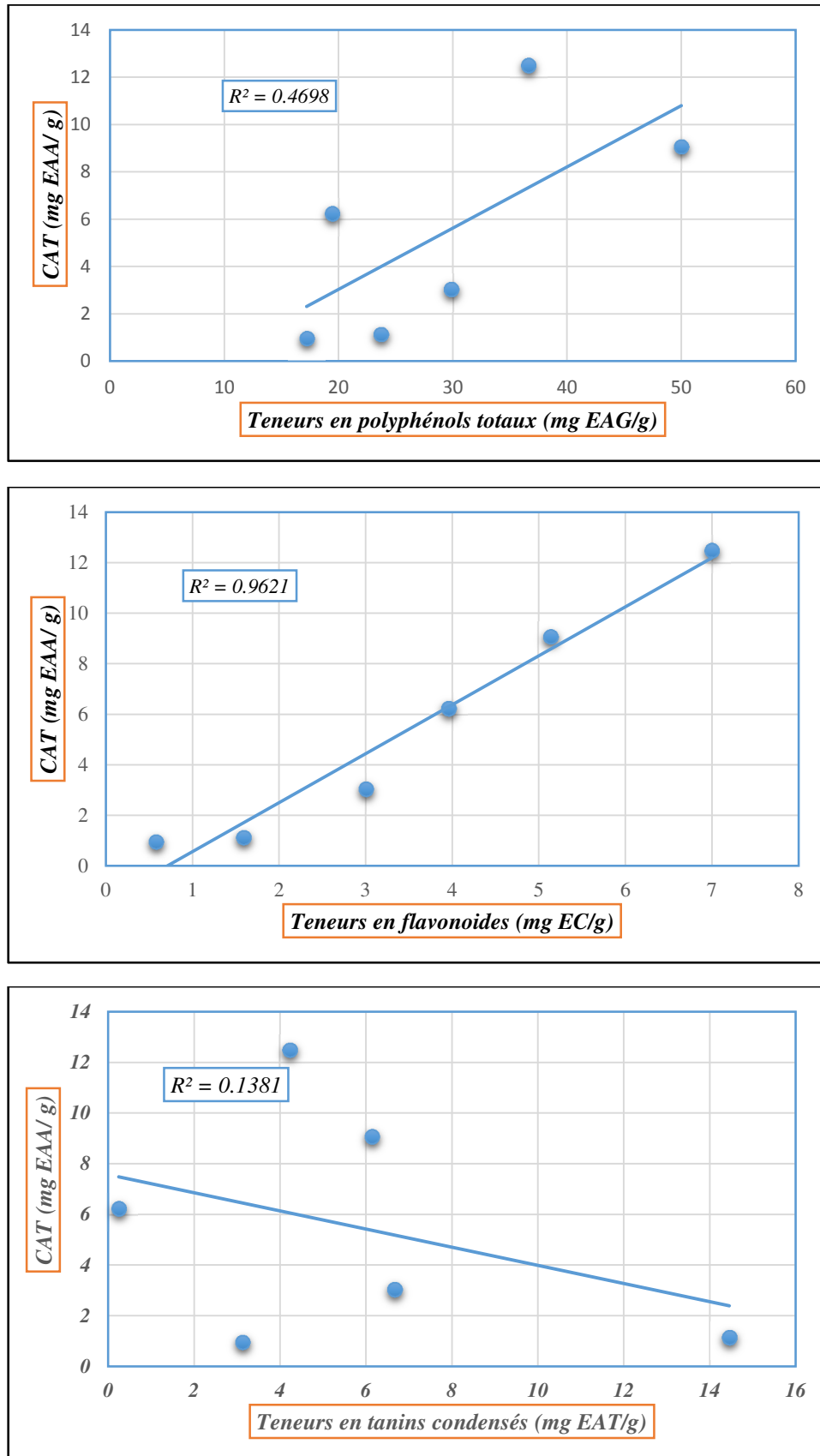


Figure 32 : Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des extraits des graines.

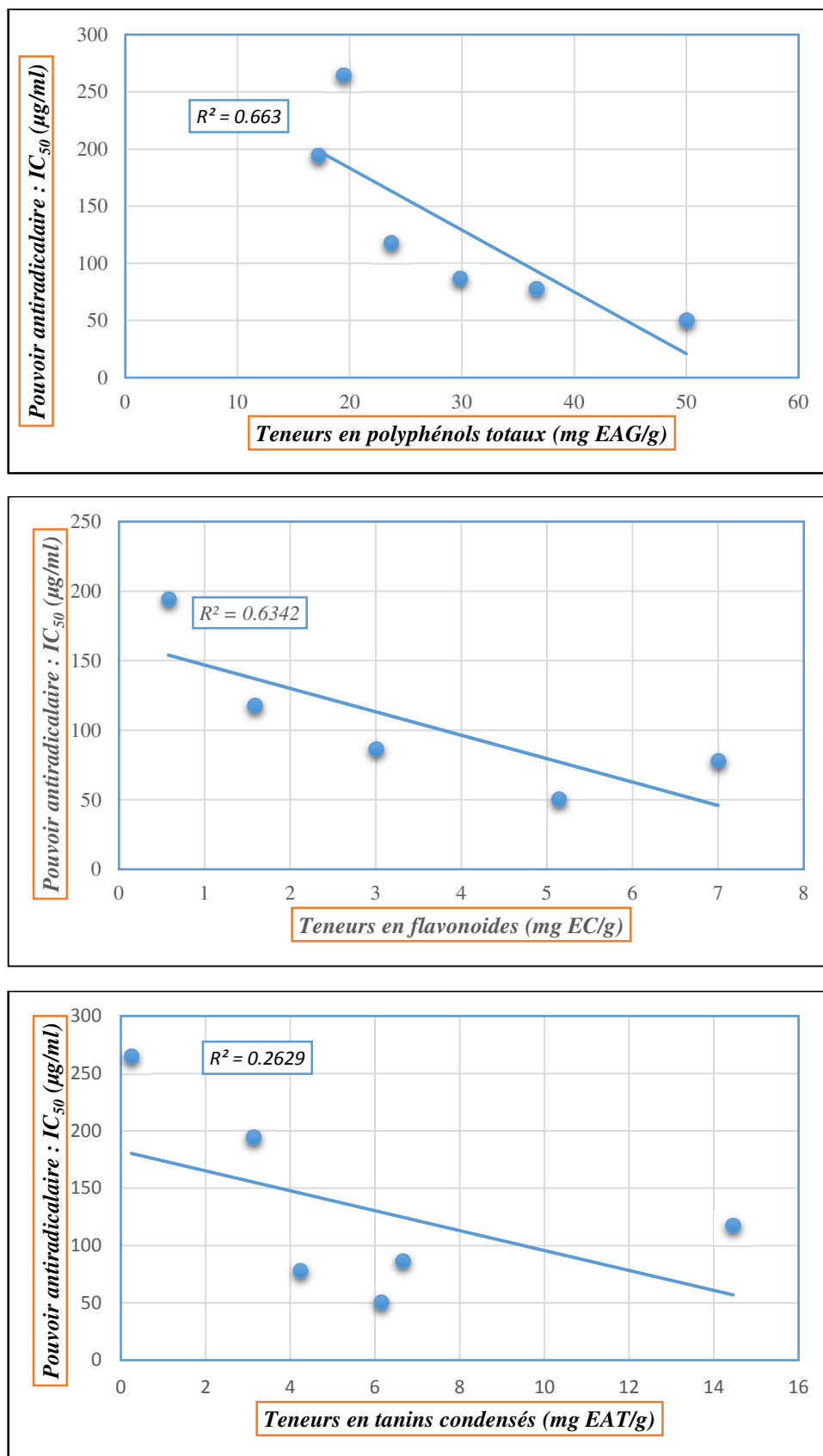


Figure 33 : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques des extraits des graines.

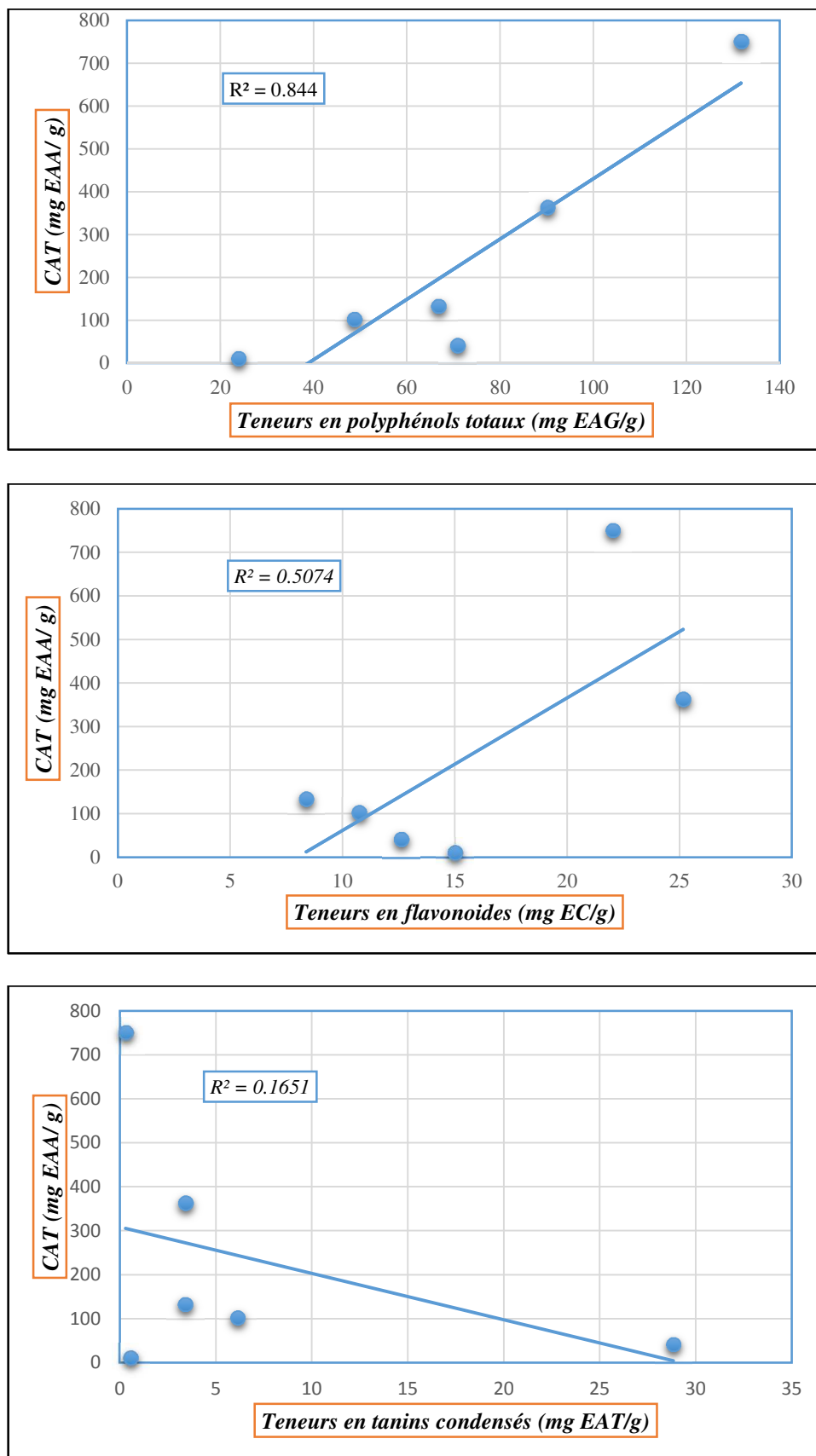


Figure 34 : Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des extraits de la pulpe.

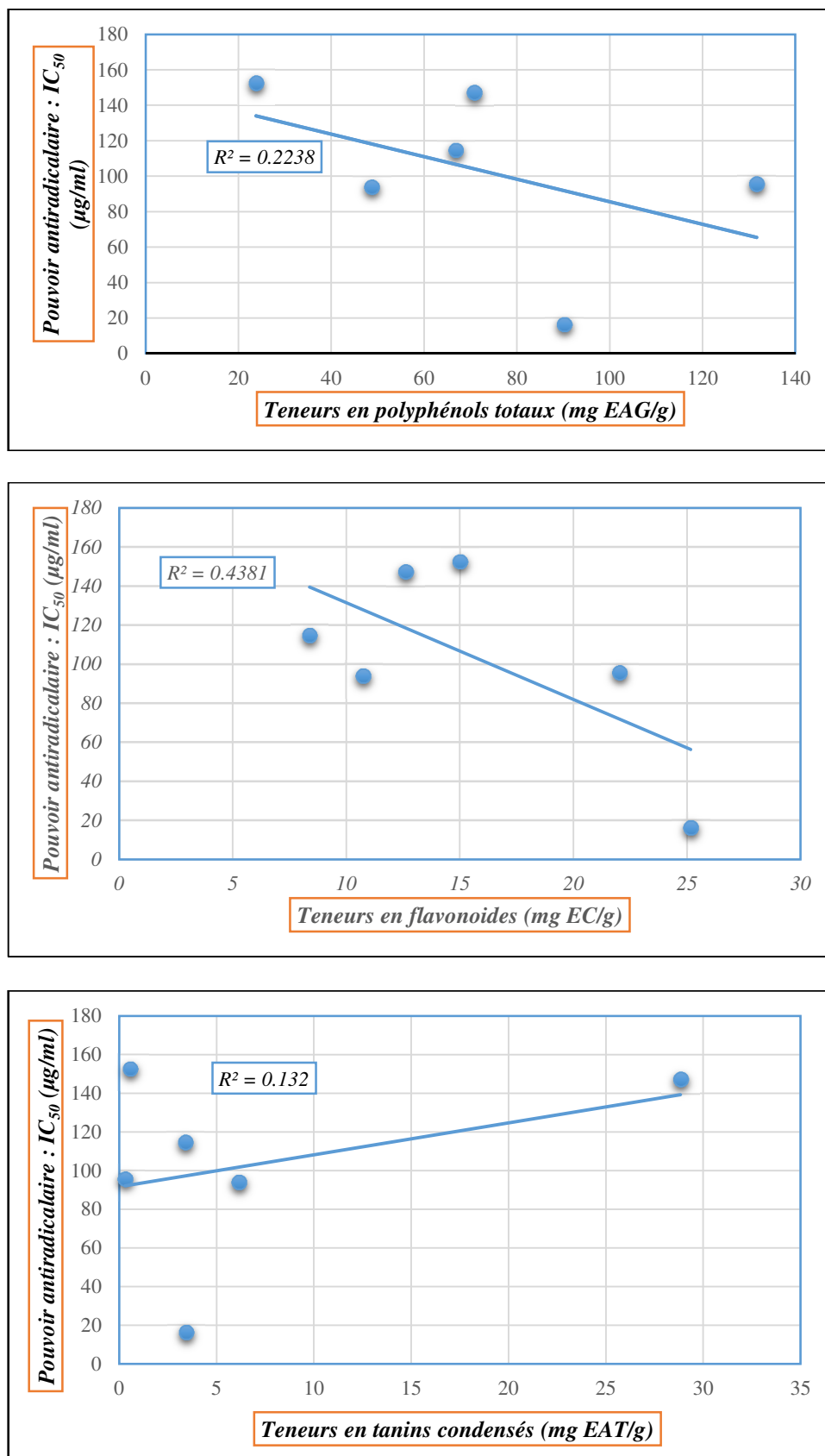


Figure 35 : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques des extraits de la pulpe.

Contrairement aux études précédemment, certains travaux signalent qu'il n'existe pas de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante de certains extraits végétaux (Mohammedi & Atik, 2011 ; Al-Owaisi et *al.*, 2014).

Enfin, nos résultats suggèrent l'importance des composés phénoliques sur l'activité antioxydante (CAT) des extraits végétaux. Cependant, selon Ananthi et *al.* (2010), nous ne pouvons pas négliger l'influence potentielle des autres molécules bioactives pouvant être englobées dans les extraits comme les tocophérols, les saponines, les polysaccharides et l'acide ascorbique.

II.6. Activité antibactérienne

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles ainsi que les effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes et le nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, ont rendu la découverte de nouveaux agents antibactériens plus qu'indispensables, menant ainsi les chercheurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (Garnero, 1991 ; Guinoiseau, 2010).

Dans ce contexte et afin de valoriser nos extraits, l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu solide. Cette technique nous permet une estimation qualitative de l'effet antibactérien des extraits en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition, en millimètre (mm) des disques contenant un volume d'extrait végétal à une concentration prédéfinie (200 mg.ml⁻¹). Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des principes actifs des extraits à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton). Ces diamètres reflètent le pouvoir d'inhibition antibactérien. Une détermination d'une marge de concentration des CMI a été également entreprise sur les extraits les plus actifs par la méthode de dilution sur milieu solide.

II.6.1. Test de sensibilité aux antibiotiques

Un test de sensibilité des souches bactériennes utilisées vis-à-vis des antibiotiques a été réalisé. Ce test a pour but d'étudier l'antibiogramme standard des germes et le comparer avec l'effet de nos extraits. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une gélose Muller Hinton, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à tester. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole appliqué pour les extraits. Les résultats des antibiogrammes sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Sensibilité (zone d'inhibition en mm) des souches bactériennes testées vis-à-vis des antibiotiques.

<i>Souches bactériennes</i>	<i>Antibiotiques standards (contrôle positif)</i>					
	<i>TE</i>	<i>E</i>	<i>GM</i>	<i>SP</i>	<i>NI</i>	<i>OA</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	29	20	26	20	12
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10 240	-	31	22	21	22	22
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	15	11	13	19	20
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	14	30	16	22	18	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	18	11	19	15	21	19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	27	20	12	22	19
<i>Salmonella abony</i> ATCC 6017	-	31	20	27	18	20

(-) : Absence de zone d'inhibition. Tetracycline (TE), Erythromycine (E), Gentamicine (GM), Spiramycine (SP), Nitroxoline (NI), Acide Oxolinique (OA).

II.6.2. Test de sensibilité par méthode de diffusion sur gélose

Les résultats des tests menés sur les extraits hydro-méthanoliques des graines et de la pulpe et leurs fractions sont présentés dans les tableaux 14 et 15. Ils montrent une grande hétérogénéité du comportement des souches bactériennes qui, en effet réagissent différemment vis-à-vis des extraits testés, ce qui rend l'interprétation difficile. Néanmoins, toutes les souches ont présenté une certaine sensibilité aux extraits avec des diamètres compris entre 07 et 25 mm. Concernant le DMSO, on observe que ce dernier n'a aucun effet vis-à-vis des souches bactériennes testées. Par conséquent, toute action inhibitrice observée est donc imputable aux substances actives contenues dans les extraits.

Les extraits hydro-méthanoliques bruts (EMBG et EMBP) et les fractions aqueuses (FAQG et FAQP) ont révélé une activité antibactérienne faible comparativement aux autres fractions des deux parties végétales avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 7 à 13 mm seulement (excepté pour l'extrait EMBG sur la souche *Bacillus subtilis*).

La faible activité de ces extraits peut être expliquée soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes présentes dans ces extraits, soit par leur faible capacité de se

diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha et *al.*, 2000), ou à leurs relatives faibles teneurs en composés phénoliques, ne dépassant pas 48.733 mg /g d'extrait. Ce résultat est en accord avec les travaux de Kivçak et *al.* (2002), sur les extraits méthanoliques bruts et aqueux des feuilles de *Ceratonia siliqua* L, qui soulignent une activité antibactérienne faible (7 à 8 mm) sur ces deux extraits comparativement à l'acétate d'éthyle et l'hexane. Également, les travaux de Bakht et *al.* (2011), sur les extraits d'*Allium sativum* L, indiquent que les échantillons végétaux extraits au méthanol et à l'eau n'ont montré aucune activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*.

Concernant les extraits des graines (tableau 14), les souches les plus sensibles sont *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), montrant des zones d'inhibition de 16 et 25 mm respectivement en présence de la fraction éther de pétrole. Alors que *Salmonella abony* exhibe un diamètre d'inhibition aussi important de 19 mm au contact de la fraction acétate d'éthyle.

Les fractions, chloroformique (FCLG) et butanolique (FBUG) donnent quant à elles des activités antibactériennes modérées. En effet, les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont inhibées avec des zones de 12 et 13 mm respectivement en réaction à la fraction chloroformique, alors que pour la fraction butanolique, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont montrés les plus sensibles avec 14 mm de zone d'inhibition.

Les extraits de la pulpe (Tableau 15) se sont également révélés inhibiteurs de la croissance bactérienne des souches testées. En effet, la souche Gram positif, *Micrococcus luteus* révèle un diamètre d'inhibition de 15 mm en présence de la fraction acétate d'éthyle (FAEP), alors que *Staphylococcus aureus* est inhibée avec 17 mm en présence de la fraction éther de pétrole (FEPP). Pour les Grams négatifs, *Pseudomonas aeruginosa* est sensible avec un diamètre de 16 mm en contact de la fraction chloroformique (FCLP), alors que la souche *Escherichia coli* est inhibée avec 15 mm de diamètre par la fraction butanolique (FBUP). Cependant, les résultats indiquent que la fraction butanolique (FBUP) et acétate d'éthyle (FAEP) ne montrent aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (respectivement).

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits des graines.

<i>Bactéries</i>	<i>EXTRAITS</i>						<i>DMSO</i>
	<i>EMBG</i>	<i>FEPP</i>	<i>FCLG</i>	<i>FAEG</i>	<i>FBUG</i>	<i>FAQG</i>	
Gram positif							
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15	12	13	11	14	11	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10 240	10	14	09	10	10	13	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	16	12	14	12	11	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	08	15	11	11	11	09	-
Gram négatif							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	25	11	12	14	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	07	11	10	13	08	10	-
<i>Salmonella abony</i> ATCC 6017	-	-	09	19	11	10	-

Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits de la pulpe.

<i>Bactéries</i>	<i>EXTRAITS</i>						<i>DMSO</i>
	<i>EMBP</i>	<i>FEPP</i>	<i>FCLP</i>	<i>FAEP</i>	<i>FBUG</i>	<i>FAQP</i>	
Gram positif							
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	09	13	12	08	-	08	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10 240	09	12	11	15	10	07	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	17	10	10	13	08	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	08	13	14	10	12	08	-
Gram négatif							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	12	16	-	11	09	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	08	13	10	09	15	07	-
<i>Salmonella abony</i> ATCC 6017	09	08	14	12	10	07	-

- : absence de zone d'inhibition.

Enfin, on peut conclure que les résultats les plus prometteurs sont l'activité inhibitrice de :

- La fraction éther de pétrole de la pulpe (FEPP) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (17 mm) dépassant même les diamètres d'inhibition de certains antibiotiques standards testés (tableau 13) tel que l'Erythromycine (15 mm), la Gentamicine (11 mm) et la Spiramycine (13 mm).
- La fraction éther de pétrole des graines (FEPG) contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une inhibition de 25 mm. Ce résultat dépasse de loin celui obtenu pour tous les antibiotiques standards testés contre cette souche et qui ont abouti à des zones allant de 11 à 21 mm.
- La fraction acétate d'éthyle des graines (FAEG) contre *Salmonella abony* (19 mm) qui surpasse ou presque égale l'action des antibiotiques standards (Nitroxoline avec un diamètre de 18 mm, Gentamicine et Acide Oxolinique avec 20 mm de zone inhibitrice).

On peut expliquer ces résultats par les teneurs et la nature des composés phénoliques répartis de manière différentielle dans ces extraits, selon les solvants utilisés. En effet, les polyphénols sont reconnus pour avoir une activité microbicide contre un très grand nombre de bactéries pathogènes (Bakasso, 2009).

II.6.3. Profil de sensibilité des souches bactériennes

Au vu des résultats obtenus, le profil de sensibilité des bactéries testées est résumé dans le tableau 16. D'après ces résultats on constate que la souche *Micrococcus luteus* (Gram positif) est la plus sensible suivi de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Bordetella bronchiseptica*. Les souches Gram négatif sont les moins sensibles aux extraits (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella abony*).

Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs études antérieures portant sur l'activité antibactérienne des extraits des plantes, et dont les auteurs confirment que les bactéries Gram positif sont plus sensibles aux extraits végétaux, tandis que les Grams négatifs en sont moins sensibles (Ben Hsouna et *al.*, 2012 ; Yang et *al.*, 2014). La grande résistance des bactéries Gram négatif est liée en partie à la complexité de leur paroi cellulaire qui contient une double membrane. Celle des bactéries Gram positif est relativement simple (Burt, 2004).

Tableau 16 : Profil de sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des extraits testés

<i>Bactéries</i>	<i>EXTRAITS DES GRAINES</i>						<i>EXTRAITS DE LA PULPE</i>					
	EMBG	FEPG	FCLG	FAEG	FBUG	FAQG	EMBP	FEPP	FCLP	FAEP	FBUP	FAQP
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10 240	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	++	+	+	+	+	-	++	+	+	+	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	-	++	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	+++	+	+	+	-	-	+	++	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	++	-
<i>Salmonella abony</i> ATCC 6017	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

- : Résistante, + : Sensible, ++ : Très sensible, +++ : Extrêmement sensible.

À notre connaissance, il n'existe pas encore de travaux sur l'activité antibactérienne du fruit du févier d'Amérique, ce qui nous mène à comparer nos résultats avec ceux des études portant sur des plantes de la même famille (fabaceae).

En accord avec notre étude, les résultats de Mohamed et *al.* (2013), sur l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des feuilles de *Gleditsia triacanthos*, notent que ces extraits montrent une activité importante (de 12 à 25 mm) envers les souches Gram positive (*Staphylococcus aureus*) comparativement aux Gram négatif (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*). En outre, ces mêmes auteurs affirment avoir constaté une sensibilité élevée de *Pseudomonas aeruginosa* (20 mm) vis-à-vis de l'extrait méthanolique des

feuilles, ce qui concorde avec nos résultats sur ce même germe (25 mm) pour l'extrait éther de pétrole des graines. Ce résultat est d'autant plus important que la souche en question est l'agent le plus commun des maladies nosocomiales dans les milieux hospitaliers.

Meziou-Chebouti et *al.* (2015), ont constaté un résultat similaire sur cette même souche bactérienne vis-à-vis des extraits de feuilles et de gousses de *Ceratonia siliqua* (25.33 ± 1.52 et 16.33 ± 1.52 mm respectivement). Les travaux de Ben Hsouna et *al.* (2012), sur les extraits méthanoliques des gousses de cette même plante rapportent une activité antibactérienne significative (10 ± 0.6 à 22 ± 08 mm) sur des souches pathogènes, due aux teneurs importantes des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans leurs extraits, compte tenu de leurs multiples effets pharmacologiques et thérapeutiques reconnus, car ils ont la capacité d'inactiver le processus enzymatique microbien et d'inhiber les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire, ...etc. (Alabri et *al.*, 2014).

Effectivement, plusieurs auteurs ont démontré que les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antibactériennes. Les flavonoïdes hydrophobes (les moins hydroxylés), principalement présents dans les extraits apolaires, détruisent les membranes bactériennes en pénétrant dans la bicouche lipidique et en se positionnant entre les chaînes d'acides gras. Cette action augmente la fluidité des lipides membranaires et altère la perméabilité. De plus, le nombre et la position des groupements hydroxyles présents sur le noyau aromatique des composés phénoliques peuvent entraîner la toxicité des microorganismes (Cowan, 1999). En effet, l'acide gallique, l'acide caféique et bien d'autres acides phénoliques sont aussi connus pour leur activité antibactérienne.

À la lumière de ces résultats, on peut déduire que l'activité antibactérienne des extraits est variable d'une étude à une autre, rendant la comparaison des résultats difficile. Ceci peut être justifié par l'influence de plusieurs paramètres tel que :

- La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne ;
- La charge du disque ;
- La concentration des extraits. En effet, Brantner et *al.* (1996), ont démontré que les composés phénoliques principalement les flavonoïdes et les stéroïdes présents dans les extraits végétaux peuvent inhiber la croissance bactérienne à une certaine concentration donnée ;
- La sensibilité des souches testées ;

- La présence des composés phénoliques, aussi de la présence de divers métabolites secondaires à effet antibactérien, de l'emplacement et du nombre des groupes d'hydroxyles (Falleh et *al.*, 2008).

En plus, du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants phénoliques, il est probable que l'activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

Les différences dans l'activité de nombreuses espèces peuvent aussi s'expliquer par les variations dans la nature et les combinaisons des substances phytochimiques antibactériennes présentes dans les solvants d'extraction. Le produit d'extraction varie également en termes de qualité, quantité et de composition en fonction du climat, de la composition du sol, de la partie végétale, de l'âge, etc. (Erbil et *al.*, 2015).

II.6.4. Détermination de la CMI par méthode de dilution

Les résultats obtenus indiquent l'existence de composés antibactériens dans la majorité des extraits testés, et la différence d'activité antibactérienne entre ces différents extraits, pourrait s'expliquer par la nature des molécules contenues dans chaque fraction. En effet, selon les données du tableau 16, les fractions éther de pétrole et acétate d'éthyle des graines (FEPG et FAEG) ainsi que les fractions éther de pétrole et chloroformique de la pulpe (FEPP et FCLP) issues des gousses *Gleditsia triacanthos* sont les fractions les plus actives, étant donné les zones d'inhibitions importantes engendrées par ces fractions à une concentration égale à 200 mg/ml ainsi que le nombre de tests positifs (souches sensibles) recensés sur les différentes souches testées. On constate donc une différence d'activité selon la nature des solvants d'extraction utilisés. En effet, différentes études ont souligné l'importance et l'influence des solvants d'extraction sur l'activité antibactérienne des extraits végétaux (Hammoudi et *al.*, 2012 ; Alabri et *al.*, 2014 ; Burham, 2016). Ceci est confirmé par les travaux de Michel (2012), sur l'activité antibactérienne de l'argousier, attestant un potentiel antimicrobien plus intéressant des extraits hydro-éthanoliques par rapport aux extraits acétate d'éthyle.

Le solvant d'extraction influe sur l'activité antibactérienne en générant des compositions phytochimiques différentes selon la nature des solvants. Ceci peut être incombé aux différences de solubilisation des composés phénoliques dans les solvants polaires ou apolaires. Selon Cowan (1999), au cours de l'extraction liquide-liquide, les phyto-molécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. On pourrait en déduire que les

substances antibactériennes contenues dans la pulpe sont plus solubles dans l'éther de pétrole et le chloroforme, qu'elles sont présentes dans l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole pour les graines. Ces solvants concentreraient donc mieux le principe actif.

La détermination de leurs CMI par méthode de dilution sur milieu gélosé, s'est avérée donc nécessaire. Les résultats de l'activité inhibitrice des extraits, identifiée sur une large gamme de concentrations allant de 12.5 à 200 mg/ml sont mentionnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Concentrations minimales inhibitrices des fractions actives.

Extrait	Conc. mg/ml	Zone d'inhibition (mm)						
		<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. abony</i>
FEPG	200	12	14	16	15	25	12	
	100	10	11	12	13	19	10	
	50	09	09	09	10	14	09	-
	25	07	07	08	08	11	07	
	12.5	-	-	-	-	09	-	
FAEG	200	11	10	19	11	10	13	14
	100	07	07	14	09	09	10	10
	50	-	-	11	07	07	07	08
	25	-	-	09	-	-	-	07
	12.5	-	-	07	-	-	-	-
FEPP	200	13	12	15	13	12	13	10
	100	10	09	11	09	11	09	7
	50	08	07	09	07	09	07	-
	25	07	-	07	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-
FCLP	200	12	11	10	14	15	10	14
	100	10	09	09	12	12	09	12
	50	08	08	07	11	09	08	09
	25	-	-	-	8	07	-	08
	12.5	-	-	-	-	-	-	-

La zone d'inhibition augmente largement avec l'augmentation de la concentration des extraits, ce qui a aussi été remarqué par Mostafa et *al.* (2018).

On constate que la fraction éther de pétrole des graines (FEPG) révèle un important pouvoir antibactérien contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI qui commence à partir de 12.5 mg/ml, correspondant à une zone d'inhibition de 09 mm. Cependant l'effet inhibiteur de cet

extrait contre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchiseptica* et *Escherichia coli*, se montre à partir d'une concentration minimale de 25 mg/ml avec des zones d'inhibition de 7 à 8 mm de diamètre. Aucun effet inhibiteur n'est observé sur *Salmonella abony*.

L'effet de la fraction acétate d'éthyle des graines (FAEG) vis à vis de *Staphylococcus aureus* se montre à partir d'une concentration minimale de 12.5 mg/ml avec une faible zone d'inhibition de 7 mm de diamètre. *Salmonella abony* est sensible à une CMI de 25 mg/ml, alors que les autres souches testées ne sont inhibées qu'à des concentrations plus élevées allant de 50 à 100 mg/ml.

La fraction éther de pétrole de la pulpe (FEPP) exerce un effet antibactérien modéré contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (une zone d'inhibition de 15 mm et 13 mm respectivement à 200 mg/ml), avec une CMI qui commence à partir d'une concentration de 25 mg/ml, cependant aucun effet antibactérien n'a été constaté à cette concentration contre les souches *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella abony*.

Nos résultats indiquent que la fraction chloroformique de la pulpe (FCLP) est inactive sur toutes les souches bactériennes à une concentration de 12.5 mg/ml. *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella abony* sont sensibles à 25 mg/ml, alors que *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ne sont inhibées qu'à une forte concentration de 50 mg/ml.

On constate que nos extraits de graines et de la pulpe de *Gleditsia triacanthos* présentent des CMI relativement élevées, comparées à celles obtenues par d'autres études sur les plantes de la même famille (fabaceae). Effectivement, l'étude de Bakasso (2009), sur les extraits de cinq plantes appartenant aux fabaceae, démontre une activité antibactérienne de tous les extraits avec des CMI allant de 9,37 à 18,75 mg/ml.

Enfin, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des extraits de *Gleditsia triacanthos*. Ces derniers révèlent la présence de principes actifs antibactériens dans les graines et la pulpe ce qui justifie leur utilisations en médecine traditionnelle. Ces résultats primaires permettent de préconiser leurs usages comme traitement anti infectieux, dans la mesure où des études toxicologiques sont entreprises afin de déterminer leurs doses thérapeutiques et létales ainsi que d'éventuels effets secondaires.

II.7. Analyse chromatographique HPLC

Les composés phénoliques constituent une source importante d'antioxydants largement recherchés pour leurs propriétés biologiques. La famille des polyphénols devient donc le point de départ de toutes les recherches scientifiques pour découvrir de nouvelles molécules naturelles à fort caractère antioxydant, ceci grâce à la présence de nombreux groupes hydroxyles dans leur structure qui peuvent réagir avec les radicaux libres.

L'activité biologique des extraits et fractions du fruit du févier d'Amérique est probablement liée à son contenu phénolique. Ce qui nous mène à établir une caractérisation phytochimique de ces composés phénoliques dans les extraits de la pulpe particulièrement plus riche en composés phénoliques et à caractère plus antioxydant que les extraits des graines, par une chromatographie liquide à haute performance. Cette technique est largement utilisée pour la détermination de ces composés car elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte.

Une tentative d'identification des composés phénoliques contenus dans les extraits de la pulpe par séparation chromatographique a été réalisée par comparaison des temps de rétentions des pics obtenus avec ceux des standards. Ces données appuyées par la littérature mènent à l'identification des composés phénoliques. Cette démarche nous donne une appréciation qualitative sur la composition phénolique des extraits de cette partie végétale.

L'analyse par HPLC-RP enregistrée à 280 nm, a révélé des différences qualitatives dans le profil des composés phénoliques entre l'extrait hydro-méthanolique et ses différentes fractions. Elle a également permis de mettre en évidence la présence de divers composés phénoliques, principalement des acides phénoliques et des flavonoïdes.

II.7.1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait brut

Le chromatogramme de l'extrait brut de la pulpe (figure 36) présente des pics marqués tout au long de la ligne chromatographique, qui en compte 50 minutes, suggérant une importante hétérogénéité en nombre et en composition de cet extrait, et montrant la présence de différentes familles polyphénoliques.

En effet, en se référant aux temps de rétention des standards, avec ceux des composés de l'extrait, il ressort la présence probable de certains composés phénoliques dont dix composés ont pu être identifiés, à savoir : quatre acides phénoliques (l'acide ascorbique, l'acide

cinnamique, l'acide chlorogénique, et l'acide vanillique) et cinq flavonoïdes glycosylés (isovitexine, myricetine-3O-rutinoside, myricetine-3O-glucoside, apéginine glycoside et myricetine rhamnoside)

Nous constatons qu'un acide caffeoylquinique (l'acide chlorogénique) est fortement représenté (11.818%) dans l'extrait brut, cependant le profil chromatographique indique la présence d'un autre pic majoritaire (13.718 %) non identifié, élué à un temps de 28.39 min et présentant une absorbance maximale à 280 nm.

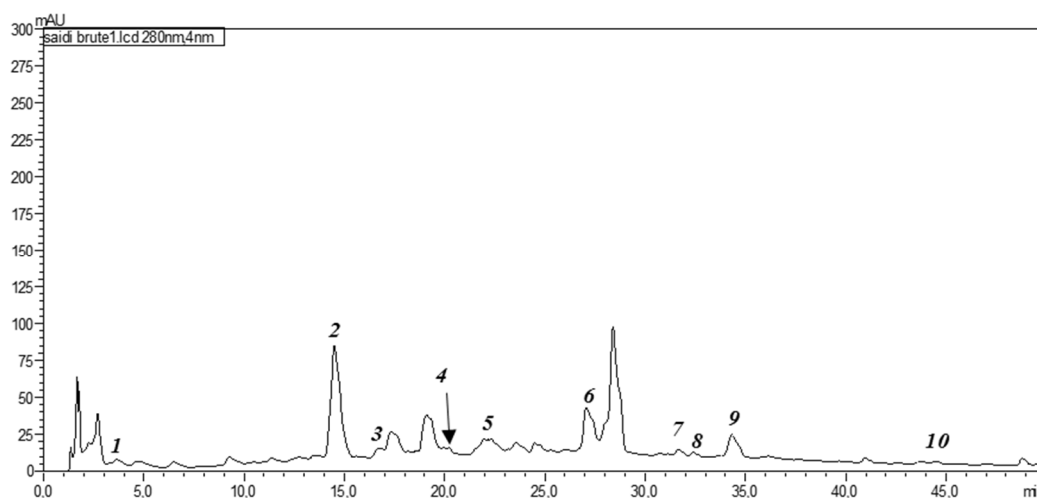


Figure 36 : Profil chromatographique des composés phénoliques de l'extrait brut de la pulpe. (1) acide ascorbique, (2), isovitexine (3) acide cinnamique, (4) catéchine, (5) acide chlorogénique, (6) acide vanillique, (7) myricetine-3-O-rutinoside, (8) myricetine-3-O-glucoside, (9) apéginine glycoside, (10) myricetine rhamnoside.

II.7.2. Identification des composés phénoliques dans la fraction éther de pétrole

Le profil d'éluion des composés issus de la fraction éther de pétrole (figure 37) suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques, indique une composition phénolique moins riche de cette fraction avec des pics moins marqués, probablement due à la nature apolaire du solvant d'extraction. Nous avons ainsi pu déterminer la présence de six composés principalement, des flavonoïdes (vitexine, isovitexine, catéchine, apéginine glycoside, et myricetine rhamnoside) et un acide phénolique (acide vanillique).

On note que les flavonoïdes prédominent dans cette fraction principalement les flavones, dont l'apéginine glycosides est présent avec une aire de 24,531%.

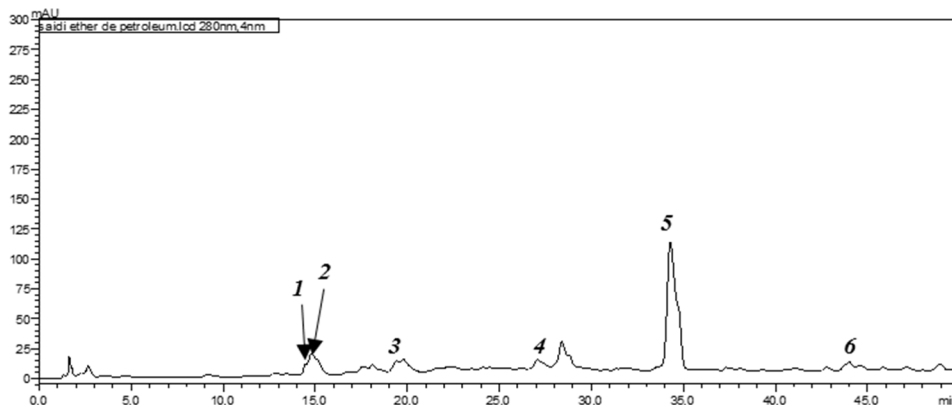


Figure 37 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction éther de pétrole de la pulpe. (1) vitexine, (2), isovitexine, (3) catéchine, (4) acide vanillique, (5) apéginine glycoside, (6) myricetine rhamnoside.

II.7.3. Identification des composés phénoliques dans la fraction chloroformique

Les essais réalisés sur la fraction chloroformique ont mené à l'identification de dix pics (figure 38). Les acides phénoliques sont représentés par l'acide syringique, l'acide cinnamique, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique et l'acide caféique, tandis que les flavonoïdes principalement, les glycosylés (flavonols et flavones) sont représentés par les myricetine-3-O-rutinoside, myricetine-3-O-glucoside, myricetine rhamnoside et l'apéginine glycoside. Le dernier composé est identifié comme étant un flavonoïde aglycone, l'apéginine.

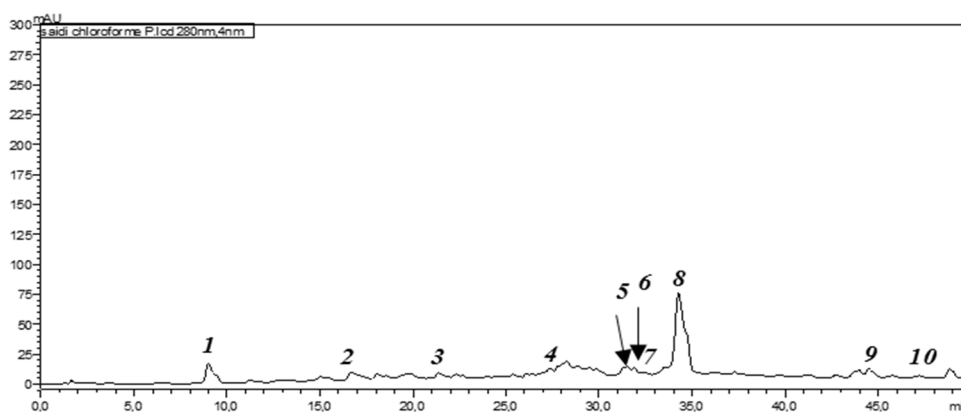


Figure 38 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction chloroformique de la pulpe. (1) acide syringique, (2) acide cinnamique, (3) acide chlorogénique, (4) acide vanillique, (5) acide caféique, (6) myricetine-3-O-rutinoside, (7) myricetine-3-O-glucoside, (8) apéginine glycoside, (9) myricetine rhamnoside, (10) apéginine.

Comme pour la fraction éther de pétrole, l'apéginine glycoside est le composé majoritaire de la fraction chloroformique avec une concentration de 22,649 % (aire du pic n° 8). L'acide

syringique est le deuxième composé phénolique (pic n° 1) le mieux présenté (3,650 %) dans la fraction chloroformique. Néanmoins, le composé non identifié, élué à un temps de rétention de 28,25 min, est également présent avec une concentration importante dans cette fraction (5,655%).

II.7.4. Identification des composés phénoliques dans la fraction acétate d'éthyle

Le chromatogramme de la figure 39, montre d'une part une composition assez riche de cette fraction et d'autre part, que ces composés ont une bonne absorbance à la longueur d'onde utilisée. Des massifs chromatographiques peu résolus, caractéristiques des tanins condensés ont été obtenues principalement dans la plage de 30 à 35 min et 40 à 45 min, ce qui laisse supposer que d'autres composés phénoliques ont été co-élués (ne se sont pas traduits par des pics francs).

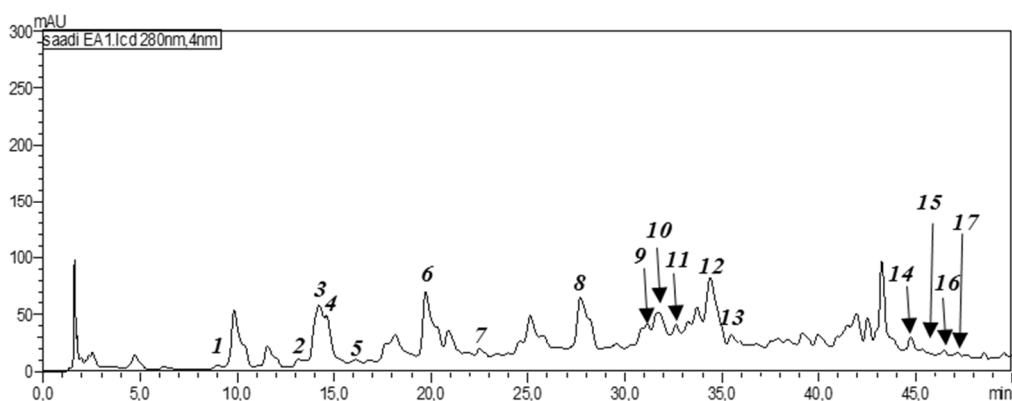


Figure 39 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction acétate d'éthyle de la pulpe. (1) acide syringique, (2) vitexine, (3) isovitexine, (4) acide néochlorogénique, (5) acide cinnamique, (6) catéchine, (7) acide chlorogénique, (8) acide vanillique, (9) acide caféique, (10) myricétine-3-O-rutinoside, (11) myricétine-3-O-glucoside, (12) apéginine glycoside, (13) acide férulique, (14) myricétine rhamnoside, (15) isorhamnetin-3-O-glucoside, (16) lutéoline, (17) apéginine.

Cependant, plusieurs autres pics ont été identifiés, laissant prévoir une bonne composition en flavonoïdes (18.041%) de cette fraction, principalement de type flavone (vitexine, isovitexine, apéginine glycoside, apéginine et lutéoline) et flavonols (myricétine-3-O-rutinoside, myricétine-3-O-glucoside, myricétine rhamnoside, catéchine et isorhamnetin-3-O-glucoside). L'acide phénolique le plus représenté dans la fraction acétate d'éthyle serait l'acide vanillique (5.80 %).

D'autres composés phénoliques avec des pics bien marqués (élus à des temps de rétention de 9.845, 18.166, 20.888, 25.120, 33.711, 39.968, 41.945 et 43.241 min) présentant des pics d'absorption maximale à des longueurs d'ondes variables (259 à 321 nm), n'ont pas pu être identifiés.

II.7.5. Identification des composés phénoliques dans la fraction butanolique

La comparaison des temps de rétention des pics obtenus avec ceux des standards nous a permis de suspecter la présence de dix composés, correspondant à des acides phénoliques (acide ascorbique, acide chlorogénique et acide vanillique) et à des flavonoïdes (vitexine, isovitexine, myricétine-3-O-rutinoside, myricétine-3-O-glucoside, apéginine glycoside et myricétine rhamnoside). Cependant d'autres composés avec des pics bien représentés n'ont pas été déterminés. Il s'agit de composés élués à des temps de 17.186 (6.874 %), 18.939 (7.856 %) et 28.345 (22.714 %).

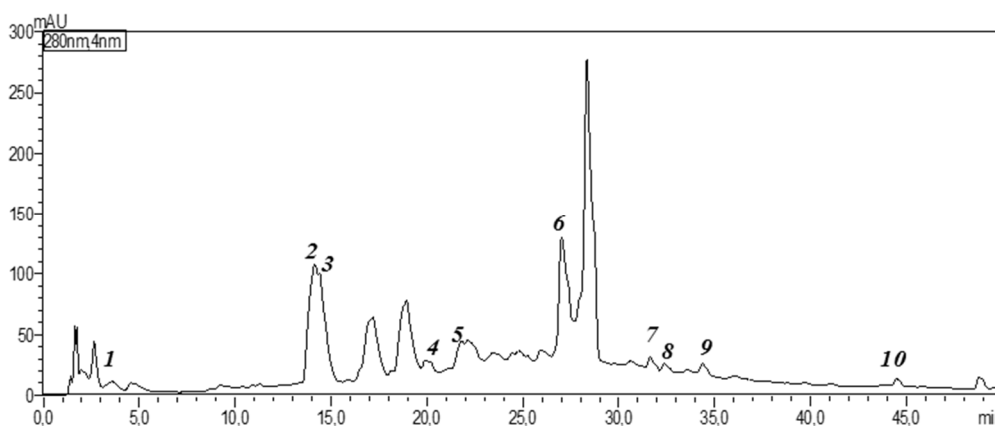


Figure 40 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction butanolique de la pulpe. (1) acide ascorbique, (2) vitexine, (3) isovitexine, (4) catéchine, (5) acide chlorogénique, (6) acide vanillique, (7) myricétine-3-O-rutinoside, (8) myricétine-3-O-glucoside, (9) apéginine glycoside, (10) myricétine rhamnoside.

II.7.6. Identification des composés phénoliques dans la fraction aqueuse

Le chromatogramme de la fraction aqueuse résiduelle obtenue après épuisement successif avec différents solvants organiques, montre une composition phénolique moins riche avec des pics moins marqués. Six pics ont été déterminés. Il est à constater que le composé le plus représenté (16.509 %) est un flavonoïde, il s'agit de l'isovitexine.

D'autres composés élués à 1.678 et 19.156 min, absorbant à une longueur d'onde maximale de 320 nm et représentés par des aires importantes (10.836 et 8.891 % respectivement) n'ont pas pu être déterminés.

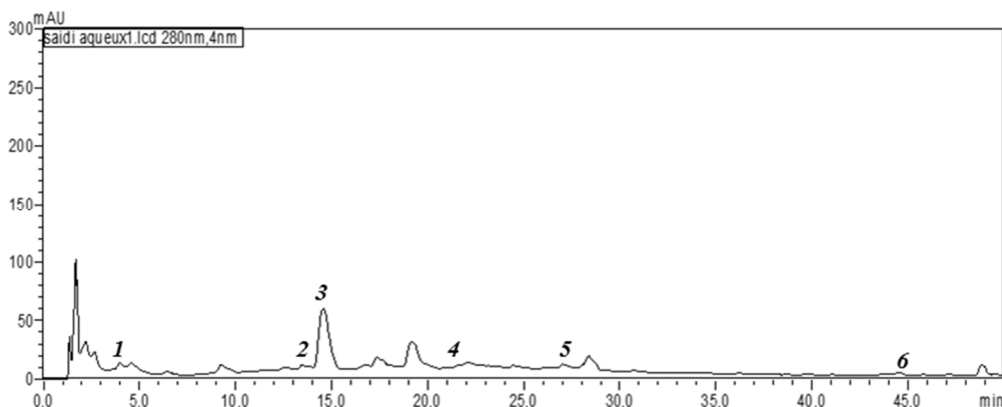


Figure 41 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction aqueuse de la pulpe. (1) acide ascorbique, (2) vitexine, (3) isovitexine, (4) acide chlorogénique, (5) acide vanillique, (6) myricétine rhamnoside.

Dans les chromatogrammes établis en UV à 280 nm, plusieurs pics majoritaires ayant des pourcentages de concentrations (aires) relativement importantes, ont été repérés et leur identification probable déterminée, dont huit acides phénoliques et des flavonoïdes. Les principales composantes identifiées sont : l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, myricétine rhamnoside, vitexine, isovitexine et apigénine-glycoside.

En général, nos résultats ont permis de constater que les flavonoïdes sont prédominants dans l'extrait brut de la pulpe et dans ses différentes fractions, principalement les flavones et flavonols. Les structures chimiques des composés identifiés sont illustrées dans l'annexe 04.

Parmi les six extraits analysés par HPLC, la fraction acétate d'éthyle (FAEP) se trouve être celle qui accumule le mieux les substances bioactives du fruit de l'espèce *Gleditsia triacanthos*, ce qui justifie son activité antioxydante importante. Cette activité est probablement due au fait qu'elle contient plus de flavonoïdes. En effet, les activités biologiques reconnues des flavonoïdes, particulièrement antioxydantes nous mènent à comprendre le mécanisme impliqué dans cette réactivité.

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). Les flavones

possèdent généralement trois hydroxyles phénoliques en C₅, C₇ et C_{4'} et une double liaison C₂-C₃. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C₃. Ces composés peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines, entités dépourvues de reste osidique ou d'hétéroside, portant un ou plusieurs résidus osidiques (Belmokhtar, 2015).

Heim et *al.* (2002), attestent que la structure des flavonoïdes est directement corrélée à leur activité antioxydante. Leurs groupements hydroxyles sont des donneurs d'hydrogènes et d'électrons, conduisant à des espèces beaucoup plus stables. De même, la présence de leur noyau B est le paramètre structural le plus déterminant pour l'activité antioxydante, ainsi que la présence d'une fonction catéchol sur ce cycle. La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend fortement de la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 3 de l'hétérocycle C. En outre, la présence d'un groupement hydroxyle en position 5, peut aussi contribuer à l'activité antioxydante dans le cas des flavones, flavonols et flavanols (Figure 42).

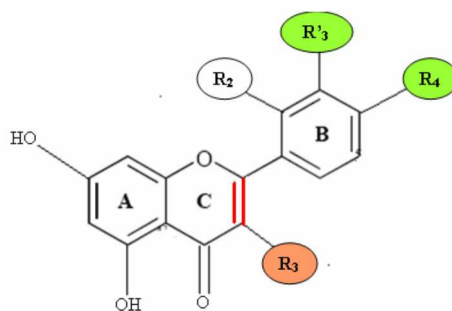


Figure 42 : Eléments impliqués dans l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Aucun travail antérieur n'a été signalé sur l'identification des composés phénoliques dans les fruits de *Gleditsia triacanthos*. Cependant, la présence de flavonoïdes dans les feuilles de cette espèce est signalée par Mohammed et *al.* (2014), qui ont identifié par chromatographie dans l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *Gleditsia triacanthos*, dix flavonoïdes (Vicénine-I, vitexine, isovitexine, orientine isoorientine, lutéoline-7-O-β-glucopyranoside, lutéoline-1-O-β-galactopyranoside, apigénine-7-O-β-glucopyranoside, lutéoline et apigénine).

Par ailleurs, les travaux d'El-Sayed et *al.* (2013), sur les feuilles du févier d'Amérique indiquent la présence de cinq composés isolés à partir des fractions chloroformique et acétate d'éthyle. Leurs structures ont été élucidées comme étant : acide caféique, lutéoline, isovitexine, apigénine-7-O-β-D-glucopyranoside et lutéoline-7-O-β-D-glucopyranoside. Cette composition concorde avec les résultats de nos profils phénoliques identifiés dans ces deux fractions (FCLP et FAEP).

Nos résultats se joignent également à ceux de Bojilov et *al.* (2014), qui citent que les flavonoïdes glycosylés sont les composés prédominants dans le genre *Gleditsia*. Les résultats de ces auteurs sur le profil chromatographique des composés phénoliques de l'extrait hydro-méthanolique (70 %) des feuilles de *Gleditsia triacanthos* soulignent la présence d'acides caféoylquiniques, de glycosides flavonoïdes et d'aglycones. Les flavonoïdes majoritaires étaient les glycosylés : myricetin-3-O-rutinoside, myricetin-3-O-glucoside, apigénine-glycoside, apigénine-7-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-gentiobioside et isorhamnetine-3-O-glucoside.

Cependant ces auteurs mentionnent la présence de composés tels que la rutine et la quercétine, qui n'ont pas pu être détectés dans notre étude. En général, la composition des extraits peut significativement varier en fonction de la partie de la plante utilisée pour l'extraction, ainsi que des conditions expérimentales de l'analyse chromatographique. En effet, bien que cette technique analytique soit caractérisée par des limites de détection très basses, une évaluation minutieuse indique que les données chromatographiques ne sont pas homogènes. Dans plusieurs cas, des résultats contradictoires sont obtenus lorsque différentes phases stationnaires et/ou mobiles sont utilisées pour l'élution (Tasioula-Margari & Tsabolatidou, 2015).

Aussi, et se basant sur le principe fondamental de la chromatographie en phase inverse, les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C18 (apolaire) alors que ceux possédant un caractère apolaire seraient plus retenus par celle-ci. L'ordre d'élution des molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés, ce qui se traduit par des données différentes sur les temps de rétention des standards.

On peut donc envisager que pour des solvants d'élution tel que l'eau acidifiée et le méthanol (système polaire) en système de gradient utilisé dans notre étude, les composés phénoliques sont élués dans l'ordre suivant : les acides hydroxybenzoïques (acides vanillique et syringique), suivis des flavanols, des acides hydroxycinnamiques (acides cinnamique, férulique et caféique), des coumarines, des flavanones, des dihydrochalcones, des flavonols et des flavones. Si les polyphénols devaient contenir des groupements apolaires, ils seraient alors plus retenus par la phase stationnaire. S'ils devaient posséder des sucres, ils seraient alors élués avant leur forme aglycone. Et enfin, dans le cas d'une acétylation éventuelle du sucre, les temps de rétention seraient alors augmentés (Abad-Garcia et *al.*, 2009).

Néanmoins, des résultats contradictoires peuvent être constaté dans cet ordre d'élution, qui peut être justifié par l'implication de mécanismes d'interaction entre les composés phénoliques pouvant retarder donc la sortie des molécules polaires de la colonne chromatographique, augmentant ainsi leur temps de rétention et rendant l'interprétation difficile.

L'analyse par HPLC-RP, réalisée dans ce travail, révèle une grande diversité dans la composition en métabolites secondaires, également détectés dans les gousses de quelques espèce de la même famille. En effet les travaux d'Ydjedd et *al.* (2017), sur la pulpe du caroubier (*Ceratonia siliqua*), mentionnent avoir identifié sur un extrait acétonique à 70%, cinq acides phénoliques libres (acide gallique, syringique, p-coumarique, cinnamique et ellagique) et cinq flavonoïdes (apigénine, naringénine, quercétine rhamnoside, kaempférol et myricétine rhamnoside).

Cependant ces résultats appuyés par ceux d'Owen et *al.* (2003) ; Fadel et *al.* (2011) ; Benchikh et *al.* (2016), signalent contrairement à nos résultats sur le févier d'Amérique, que les acides phénoliques représentent les principaux composés phénoliques de la pulpe du caroubier avec une teneur totale quatre fois plus élevée que celle des flavonoïdes.

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que le fruit de l'espèce *Gleditsia triacanthos* est riche en métabolites secondaires, ce qui confirme les résultats des dosages spectrophotométriques par UV-Visible. Il sera essentiel à l'avenir de préciser la composition qualitative et quantitative de chacun des composés phénoliques, afin de les étudier individuellement. Cela doit d'abord permettre de comprendre le mode d'action de chacun d'eux, et ensuite d'évaluer les éventuels effets de synergie ou d'antagonisme, ainsi que leur biodisponibilité.

Discussion Générale

L'extraction des composés bioactifs à partir des végétaux est la première étape de leur utilisation dans divers domaines. Ainsi plusieurs recherches se focalisent sur les méthodes et les solvants d'extraction de ces composés, afin d'optimiser le rendement et les teneurs en composés phénoliques. L'objectif est de les extraire dans des conditions douces et efficaces pour mieux comprendre leur mécanisme d'activité antioxydante, ce qui constitue des enjeux scientifiques importants qui sont à la base de notre étude.

Les rendements obtenus par extraction solide-liquide des polyphénols avec du méthanol aqueux (70%), se sont montrés relativement importants par rapport au poids de la poudre végétale pour les extraits bruts des graines (EMBG) et de la pulpe (EMBP). L'extraction solide-liquide met en jeu des mécanismes plus complexes et moins bien connus. En effet, le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et le soluté doit ressortir du solide. La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fasse par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion. La force motrice de la diffusion est alors le gradient de concentration entre solide et le reste du solvant (Ribéreau-Gayon, 1968). En outre, Mohammedi & Atik (2011), affirment que l'utilisation des solvants mixtes (hydro-alcooliques) aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. Les solvants purs utilisés seuls sont généralement inefficaces pour l'extraction des polyphénols totaux des plantes, car ils sont associés à d'autres biomolécules comme les protéines, les polysaccharides, les terpènes, la chlorophylle, les lipides et les composés inorganiques. Dans une deuxième étape, l'extraction liquide-liquide par des solvants à polarité croissante des extraits bruts, révèlent un meilleur rendement pour les solvants plus polaires (fractions butanoliques et aqueuses). Cela pourrait être attribué à la perméabilité sélective des différents solvants utilisés. Cependant les solvants apolaires fournissent des rendements d'extraction assez faibles. Selon Klejdus & Kuban (2000), la procédure classique d'extraction liquide-liquide est un processus fastidieux, très long, avec des coûts de solvant élevés et de faibles taux de récupération. Malgré ces inconvénients, l'extraction liquide-liquide et solide-liquide restent les méthodes d'extraction les plus couramment utilisées. En effet, pendant de nombreuses années, ces techniques conventionnelles ont été largement acceptées, principalement en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité et de leur grande applicabilité (Brglez Mojzer et *al.*, 2016).

Afin de pouvoir caractériser les extraits, des expériences préliminaires de criblage phytochimique sont couramment effectuées pour promouvoir une orientation des composés

phytochimiques substantiels qui peuvent être impliqués dans l'activité antioxydante des extraits des plantes. Les résultats ont confirmé la présence des flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, saponosides, stérols et terpènes et les glycosides cardiotoniques dans les extraits, tandis que les anthraquinones étaient absentes.

De nombreux travaux disponibles sur les composés phénoliques ont démontré leurs activités biologiques potentielles tels qu'antioxydants, antidiabétiques, hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, anticancéreux (Sulaiman et *al.*, 2011 ; Kumar & Pandey, 2013), antimicrobiens (Kumar et *al.*, 2009), etc. Les composés phytochimiques identifiés dans les extraits des gousses peuvent être responsables de l'activité biologique de *Gleditsia triacanthos* et la raison de son utilisation en médecine traditionnelle, surtout pour soulager la douleur. En effet, son activité analgésique et antiinflammatoire a été démontrée par Mohamed et *al.* (2013) ; Saleh et *al.* (2016).

Par conséquent, et sur la base des résultats du criblage phytochimique, les teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés des différents extraits des graines et de la pulpe ont été estimées. D'après nos résultats, on constate que les extraits de la pulpe sont plus riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes, par rapport aux graines, et que ces composés se concentrent principalement dans les fractions chloroformiques et acétate d'éthyle pour les deux parties végétales étudiées. Cette distribution dépend de la nature des substances phénoliques contenues dans chaque extrait brut, de leur solubilité et de la polarité de chaque solvant. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures soulignant des fortes teneurs en composés phénoliques dans les fractions acétates d'éthyle (El sayed et *al.*, 2013). Les tanins condensés se retrouvent avec des teneurs importantes dans les extraits hydro-méthanoliques bruts et les fractions butanoliques des deux parties végétales.

Nos résultats ont démontré clairement l'influence du solvant sur l'extractibilité des composés bioactifs. Cet effet du solvant a été plusieurs fois démontré par des travaux scientifiques (Spigno et *al.*, 2007 ; Bakht et *al.*, 2011 ; Caunii et *al.*, 2012 ; Chavan & Amarowicz, 2013; Nur Syukriah et *al.*, 2014 ; Nakamura et *al.*, 2017). Cependant la comparaison des résultats entre les études et leur exploitation afin de choisir un solvant d'extraction universel s'avère difficile et peu fiable, en raison de la complexité des molécules phénoliques végétales et leur réactivité différente vis-à-vis des réactifs de dosage (Dai & Mumper, 2010).

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits a été réalisée par deux méthodes *in vitro*. D'une manière générale, les résultats soulignent que les activités antioxydantes étudiées dans notre expérimentation sont bien prononcées dans la pulpe que dans les graines du fruit du févier d'Amérique. Les résultats du test de DPPH révèlent que les fractions acétate d'éthyle des graines et de la pulpe possèdent les plus forts pouvoirs antiradicalaires ($IC_{50} = 50.455 \pm 1.315$ et $16,288 \pm 0,299$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement) suivis des fractions chloroformiques. Ces mêmes fractions sont les plus riches en polyphénols totaux (de 36.617 ± 1.686 à 131.667 ± 2.055 mg EAG/g) et en flavonoïdes (de 5.137 ± 0.322 à 25.160 ± 0.016 mg EC/g). Les autres extraits/fractions présentent une activité modérée de piégeage du radical libre. On suggère que les composés phytochimiques, en particulier les composés phénoliques à faible poids moléculaire constitués d'acide phénoliques et de simples flavonoïdes, se concentrent dans la fraction acétate d'éthyle dans laquelle ils sont très solubles, étaient susceptibles de donner un atome d'hydrogène de sorte que ces composés pourraient former des complexes avec le radical libre de DPPH. L'efficacité des flavonoïdes en tant que piégeurs des radicaux et chélateurs de métaux est liée à leur structure, particulièrement leurs groupes hydroxyles (Amic et *al.*, 2003).

Les résultats du test de réduction du phosphomolybdène confirment la même tendance observée dans le test de DPPH. En effet les fractions acétate d'éthyle et chloroformiques présentent les plus fortes capacités antioxydantes totales avec des CAT de $362,688 \pm 30,131$ et $750,584 \pm 129,793$ respectivement pour la pulpe et $12,484 \pm 0,458$ et $9,066 \pm 1,770$ pour les graines. Ces capacités antioxydantes importantes retrouvées dans les fractions chloroformiques reflètent la nature apolaire des antioxydants du fruit du févier d'Amérique.

Nos résultats sont en accord avec les conclusions de Mohammed et *al.* (2014), Soulignant que les extraits des feuilles de *Gleditsia triacanthos* présente une bonne activité antioxydante favorisant l'utilisation de cette plante comme source naturelle de composés phénoliques et comme antioxydants. Cette capacité antioxydante de *Gleditsia triacanthos* pourrait être attribuée à la présence de composés phytochimiques tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes. Cependant, plusieurs études sur les composés phytochimiques naturels ont produit des résultats contradictoires en raison du caractère «unidimensionnel» non spécifique des méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante. Étant donné que la plupart des antioxydants naturels et des composés phytochimiques sont multifonctionnels (variations de la composition du système, type de substrat oxydable, milieu d'initiation, accélération de

l'oxydation, et méthodes d'évaluation de l'oxydation), un protocole antioxydant fiable nécessite la mesure de plus d'une propriété pertinente pour les systèmes biologiques (Frankel & Meye, 2000).

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, l'identification de nouveaux antibactériens naturels, s'avère une urgence scientifique. La complexité et la diversité moléculaire des composés phénoliques font de ces derniers des candidats privilégiés pour entreprendre de telles recherches. C'est dans cette optique que l'activité antibactérienne des extraits et fractions a été démontrées vis-à-vis de quelques souches bactériennes. L'activité antibactérienne déterminée par la mesure des diamètres d'inhibition de tous les extraits vis-à-vis des souches bactériennes de référence ATCC, montre que les bactéries Gram-positif sont plus sensibles que les Gram-négatif. On constate que les fractions éther de pétrole des graines et de la pulpe (FEPG et FEPP) sont les plus actives. En effet, FEPG, induit contre *Pseudomonas aeruginosa* un diamètre d'inhibition de 25 mm et 16 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. La fraction FEPP quant à elle se montre inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* avec 17 mm de diamètre. La fraction acétate d'éthyle des graines (FAEG) présente également une zone d'inhibition importante de 19 mm contre *Salmonella abony*. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que ces souches sont des pathogènes reconnus. Cependant, les résultats des valeurs des concentrations minimales inhibitrices sont relativement élevées avec des concentrations allant de 12.5 à 100 mg/ml.

Selon Bakasso (2009), le mécanisme de toxicité des polyphénols contre les bactéries pourrait être dû à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrases) ou à d'autres interactions pour inactiver l'adhésine microbienne, les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire et l'interaction non spécifique avec les carbohydrates. Les composés phénoliques peuvent être également, à la base de la privation de fer ou des liaisons hydrogènes des protéines vitales (les enzymes bactériennes).

Le fait que les tanins sont des inhibiteurs puissants des enzymes est bien documenté dans la littérature. Les tanins sont particulièrement vulnérables aux réactions de polymérisation dans l'air par oxydation ; donc, en pratique, la toxicité des tanins est assez dynamique. Leur polymérisation peut entraîner donc une toxicité des tanins monomères vis-à-vis des microorganismes (Field & Lettinga, 1992). Les saponines sont également des constituants bioactifs impliqués dans le système de défense des plantes en raison de leur activité

antimicrobienne (Barile et *al.*, 2007). Généralement, l'activité antibactérienne des plantes, dépend des concentrations des extraits testés, de la nature des composés phytochimiques solubles dans les différents solvants et des types des germes utilisés.

La caractérisation chromatographique en phase liquide à haute performance nous a permis d'identifier un certain nombre de composés phénoliques dans l'extrait brut de la pulpe et ses différentes fractions. Les molécules identifiées peuvent être classées selon leur structure en deux grands groupes ; les acides phénoliques et les flavonoïdes. Ces derniers prédominent dans tous les extraits.

Nos résultats se joignent aux travaux antérieurs d'El-Sayed et *al.* (2013) ; Mohammed et *al.* (2014) ; Bojilov et *al.* (2014), portants sur l'identification chromatographique (HPLC) des composés phénoliques des graines et des feuilles de *Gleditsia triacanthos*. Selon Bojilov et *al.* (2014), l'acide néochlorogénique est l'acide caféoylquinique majoritaire de l'espèce *Gleditsia triacanthos*. L'acide caféique a quant à lui une répartition quasi-universelle chez les végétaux, où il est souvent présent sous forme d'acide chlorogénique (ester 5-caféoylquinique) retrouvé généralement dans les fruits et légumes. L'acide férulique est un autre acide hydroxycinnamique commun identifié dans la pulpe, présent dans les céréales et estérifié en hémicelluloses dans la paroi cellulaire. Les flavonoïdes retrouvés dans la pulpe du fruit du févier d'Amérique sont principalement de type glycosylés : vitexine, isovitexine, myricetine-3-O-rutinoside, myricetine-3-O-glucoside, apéginine glycoside, myricetine rhamnoside et isorhamnetin-3-O-glucoside. Les autres flavonoïdes non glycosylés sont la lutéoline, l'apéginine et la catéchine.

La fraction acétate d'éthyle s'est montrée la plus riche en composés phénoliques, ce qui justifie le fort pouvoir antioxydant déterminé dans cette fraction, particulièrement antiradicalaire. Les flavonoïdes exercent leur activité antioxydante en piégeant efficacement divers radicaux libres, en régulant l'activité enzymatique induite par le stress oxydatif (Ramos, 2008).

Enfin, cette approche chromatographique nous a permis de caractériser le contenu phénolique du fruit de *Gleditsia triacanthos*, prodiguant un aspect purement qualitatif de sa composition phytochimique, soulignant la prédominance des flavonoïdes glycosylés et des acides caféoylquiniques.

Conclusion
Et
Perspectives

En tant que métabolites secondaires des plantes, les polyphénols représentent un groupe important et diversifié de substances bioactifs, constituant une source inépuisable, puisque seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été explorées sur le plan phytochimique et pharmacologique (Hostettmann et *al.*, 1998).

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris notre étude qui vise la caractérisation phytochimique des extraits des graines et de la pulpe des gousses de l'espèce *Gleditsia triacanthos*, et la recherche de l'activité biologique et des potentialités que peuvent avoir ces extraits, à savoir les activités antioxydante, antibactérienne et l'identification des composés phénoliques par chromatographie HPLC.

Le screening phytochimique démontre une composition riche et variée en métabolites secondaires, où les extraits hydro-méthanoliques bruts des graines et de la pulpe renferment le plus large éventail de métabolites secondaires. L'analyse phytochimique quantitative démontre que les teneurs en composés phénoliques sont nettement plus élevées pour la pulpe. Les fractions acétate d'éthyle et chloroformiques sont les plus riches en polyphénols totaux (131.667 ± 2.055 mg EAG/g dans FCLP) et en flavonoïdes (25.160 ± 0.016 mg EC/g pour FAEP), tandis que les tanins condensés se concentrent dans les fractions butanoliques (28.830 ± 0.269 mg EAT/g dans FBUP) et les extraits bruts (14.456 ± 0.144 EAT/g dans EMBG).

De même, ces extraits ont une activité antioxydante importante, notamment pour les fractions acétate d'éthyle de la pulpe et des graines qui présentent des fortes activités antiradicalaires, avec des IC_{50} de $16,288 \pm 0,299$ et 50.455 ± 1.315 μ g/ml respectivement. La capacité antioxydante totale déterminée par la méthode de réduction du phosphomolybdate révèle que les fractions chloroformiques et acétate d'éthyle présentent les capacités antioxydantes les plus importantes ($750,584 \pm 129,793$ mg EAA/g pour la FCLP). La corrélation obtenue entre les activités antioxydantes (CAT et DPPH), et les teneurs phénoliques est positive, impliquant la contribution d'une partie des antioxydants de la plante qui peuvent être des polyphénols ou des flavonoïdes. Cependant les teneurs en tanins ne présentent aucune corrélation linéaire avec les activités antioxydantes testées.

Les tests de l'activité antibactérienne ont révélés quelques résultats inattendus. En effet ce sont les fractions éther de pétrole des graines et de la pulpe qui semblent les plus actives induisant des diamètres d'inhibition allant de 08 à 25 mm. Les meilleures sensibilités ont été constatées contre les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Les fractions

FAEG et FCLP sont actives à inhiber la croissance bactérienne de certaines souches pathogènes (*Salmonella abony* et *Pseudomonas aeruginosa*).

L'analyse chromatographique par HPLC des composés phénoliques de l'extrait brut de la pulpe et de ces fractions a permis l'identification de plusieurs flavonoïdes principalement des hétérosides de la lutéoline et de l'apéginine, ainsi que des acides phénoliques, dont les acides caffeoylquiniques sont les plus présents. Les chromatogrammes obtenus montrent que la fraction acétate d'éthyle de la pulpe est la mieux dotée en composés phénoliques.

On conclut donc que les résultats obtenus à travers ce travail sont très favorables pour la valorisation du fruit de *Gleditsia triacanthos*, vu sa richesse en molécules bioactives. Ces résultats ne constituent bien évidemment qu'une première étape de recherche des molécules biologiquement actives. Et effet, ce présent travail rapporte une contribution à la connaissance de l'espèce *Gleditsia triacanthos* à travers l'étude de son potentiel antioxydant et antibactérien et ouvre ainsi de nombreuses autres voies d'études intéressantes à explorer.

Pour la poursuite de nos investigations, nous pensons nous intéresser d'avantage à la même plante qui jusqu'à présent, n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études phytochimiques et pharmacologiques. Cela nous permettra peut-être d'isoler les métabolites secondaires participant à la bio-activité de cette plante, notamment l'identification et la purification des autres molécules qui n'ont pas été à ce jour isolées et comparer éventuellement leurs activités biologiques.

En perspectives, il serait intéressant d'envisager les projets :

- D'isoler les molécules contenues dans les fractions chloroformique et acétate d'éthyle des graines et de la pulpe de *Gleditsia triacanthos* ;
- De déterminer leurs structures par des méthodes de spectroscopie de masse ou de résonance magnétique (MS et RMN) ;
- De tester ces molécules purifiées sur des modèles biologiques, *in vivo*, afin de concrétiser leur usage thérapeutique et/ou industriel ;
- D'étudier la cytotoxicité de ces molécules et de déterminer les doses d'administrations thérapeutiques optimales ;
- D'étudier la corrélation et la synergie entre les substances bioactives impliquées dans les différentes activités biologiques et prospecter le rôle possible que peuvent prendre des composés non-phénoliques dans ces activités.

Références
Bibliographiques

A

Abad-Garcia, B., Berrueta, L.A., Garmon-Lobato, S., Gallo, B & Vicente, F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5398-5415.

Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub-Haddada, F., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y aceites*, 62(1), 96-104.

Abdel Karim, M., Tohami, E., Fath-El Rahman A & Hunida, E. (2016). GC-MS Analysis and Biological Activity of Different Fractions of Sudanese *Albiza amara* (Vohl) Benth. Roots. *International Journal of Advanced Research*, 4(8), 1806-1814.

Achat, S. (2013). Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques (Thèse de doctorat). Université d'Avignon.

Afonso, C.A.M., Candeias, N.R., Simao, D.P., Trindade, A.F., Coelho, J.A.S., Tan, B & Franzen, R. (2016). Comprehensive organic chemistry experiments for the laboratory classroom. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324-329.

Agbo, MO., Uzor, P.F., Akazie-Nneji, U.N., Eze-Odurukwe, C.U., Ogbatue, U.B & Mbaoji, E.C. (2015). Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid C *Gupta* guontent of Selected Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 35-41.

Alabri, T.H.A., Al Musalami, A.H.S., Hossain, M.A & Riyami, A.M.Q. (2014). Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *Journal of King Saud University Science*, 26(3), 237-243.

Alitonou, G., Avlessi, F., Wotto, V.D., Ahoussi, E., Dangou, J & Sohounhloué, D.C.K. (2004). Composition chimique, propriétés antimicrobienne et activités sur les tiques de l'huile d'*Eucalyptus tereticornis*. Sm. *Comptes rendus Chimie*, 7(10), 1051-1055.

Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Bulus, T & Oyewale, A.O. (2011). Phenolics content and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Verninia blumeoides* (Asteraceae). *International Journal of Biological Chemistry*, 5(6), 352-359.

Aljabre, SH., Randhawa, M.A., Akhtar, N., Alakloby, O.M., Alqurashi, A.M & Aldossary, A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal Ethnopharmacology*, 101(1-3), 116-119.

Al-Owaisi, M., Al-Hadiwi, N & Alam Khan, S. (2014). GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12), 964-970.

Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D & Trinajsti, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1), 55-61.

Ananthi, S., Raghavendran, H.R.B., Sunil, A.G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G & Vasanthi, HR. (2010). *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornate* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 187-192.

Annegowda, H.V., Bhat, R., Tze, L.M., Karim, A.A & Mansor, S.M. (2013). The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard)-an underutilized legume. *Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 535–541.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst journal*, 127(1), 183-198.

Apel, K & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-99.

Angiosperm Phylogeny Group III (APG III). (2009). an update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.

Arisi, A.C.M., Cornic, G., Jouanin, L & Foyer, C.H. (1998). Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. *Plant Physiology*, 117 (2), 565-574.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H.P & Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 787–791.

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212.

Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F & Estrela, J.M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(5-6), 197–216.

Atchibri, A., Soro, L.C & Armand, K.K. (2016). Phytochemical screening of sheets, antioxidant and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Lippia multiflora* Mold. *International journal of research in plant science*, 6(1), 1-6.

B

Badalbaeva, T.A., Kondratenko, E.S & Abubakirov, N.K. (1973). Triterpene glycosides of *Gleditsia triacanthos* V. Structure of triacanthoside C and the minor glycosides. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(5), 635- 640

Bajaj, K.L & Devsharma, A.K. (1977). A colorimetric Method for the determination of tannins in Tea. *Microchimica Acta*, 68(3), 249-253.

Bakasso, S. (2009). Études phytochimiques et potentialités biologiques de cinq espèces d'*indigofera* (fabaceae) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso (Thèse de Doctorat), Université d'Ouagadougou.

Bakht, J., Tayyab, M., Ali, H., Islam, A & Shafi, M. (2011). Effect of different solvent extracted sample of *Allium sativum* (Linn) on bacteria and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5910-5915.

- Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Ebrahim Sajjadi, S., Scala, F & Lanzotti, V.** (2007). Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritanum*, *bacopa monifera* and *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 68(5), 596-603.
- Bate-Smith, E.C.** (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance: I. Monocotyledons. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 58, 95-173.
- Beauchesne, G & Goutarel, R.** (1963). Activité de certaines purines substituées sur le développement des cultures de tissus d'inoëlle de Tabac en présence d'acide indolylacétique. *Physiologia plantarum*, (16)3, 630–635.
- Béguel, J.P.** (2012). Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thèse de doctorat). Université de Bretagne occidentale – Brest.
- Békro, Y.A., Békro, M.J.A., Boua, B.B., Tra Bi, F.H & Ehilé, E.E.** (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*, 4(2), 217-225.
- Belmokhtar, Z.** (2015). Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L Boiss, intérêt pharmaceutique (Thèse de doctorat). Université Mohamed Boudiaf d'Oran.
- Ben Hsouna, A., Alayed, A.S & Abdallah, E.M.** (2012). Evaluation of antimicrobial activities of crude methanolic extract of pods of *Ceratonia siliqua* L against some pathogens and spoilage bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(14), 3480-3484.
- Benchikh, Y., Louailèche, H., George, B & Merlin, A.** (2014). Changes in Bioactive Phytochemical Content and *in Vitro* Antioxidant Activity of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) as Influenced by Fruit Ripening. *Industrial Crops and Products*, 60, 298-303.
- Benchikh, Y., Paris, C., Louaileche, H., Charbonnel, C., Ghoul, M & Chebil, L.** (2016). Comparative characterization of green and ripe carob (*Ceratonia siliqua* L.): physicochemical attributes and phenolic profile. *Journal of Food Science & Technology*, 2(1), 1-7.
- Benhamiche, S.** (2012). Autoécologique du févier d'Amérique (*Gleditsia triacanthos* L.) et valorisation de ses coproduits en Algérie (Mémoire de Magister). Université de Sidi bel Abbès.
- Benhamiche, S., Benhassaini, H & Chabane, K.** (2016). Evaluation of the Anti-nutritional Substances in the Fruit of *Gleditsia triacanthos* L: Economic Interest and Perspectives of Valorization in Algeria. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 5, 219-222.
- Benhammou, N.** (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Thèse de doctorat). Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
- Bennabi, F., Hamel, L., Bouiadjra, S.E.B & Ghomari, S.** (2012). Ressources hydriques sous tension et enjeux de développement durable dans la wilaya de Sidi Bel Abbès (Algérie occidentale). *Méditerranée* 1,105–111.
- Bhalodia, R.N., Nariya, P.B., Acharya, R.N & Shukla, V.J.** (2013). *In vitro* antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*, 34(2), 209–214.

Bhattacharya, A., Sood, P & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705–719.

Blanc, M.C., Moinard, C & Cynober, L. (2005). Monoxyde d'azote. Radicaux libres et stress oxydant. Paris, France : Lavoisier.

Bojilov, D.G., Simeonova, Z.B., Solakov, N.Y., Angelova-Romova, M.Y., Tsvetanova, V.M & Ivanov, I.I. (2014). Chemical composition of *Gleditsia Triacanthos* L.: application in phytotherapy of socially significant diseases. *Journal of international scientific publications: materials, methods and technologies*, 8, 382-392.

Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris, France : Lavoisier.

Bouayed, J., Rammal, H., Younnos, C.N & Soulimani, R. (2007). Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *European Journal of Pharmacology*, 564(1-3), 146-149.

Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Thèse de Doctorat). Université Mohamed Khider Biskra.

Bouchouka, E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes (Thèse de doctorat). Université Badji Mokhtar-Annaba.

Boukhanouf, S., Louaileche, H & Perrin, D. (2016). Phytochemical content and *in vitro* antioxidant activity of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by maturity stage and cooking practice. *International Food Research Journal*, 23(3), 954-961.

Boumaza, O. (2006). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae) (Thèse de doctorat). Université Frères Mentouri Constantine.

Boutaghane, N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae) (Thèse de doctorat). Université Frères Mentouri Constantine.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technology*, 28(1), 25-30.

Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S & Antolic, A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spinachristi* Mill (Christ's thorn). *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 119-122.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7), 901-938.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales (3^e éd.). Paris, France : Tec et Doc.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales (4^e éd.). Paris, France : Lavoisier.

Bruno-Soares, A.M & Abreu, J.M. (2003). Merit of *Gleditsia Triacanthos* pods in animal feeding: Chemical composition and nutritional evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 107(1–4), 151-160.

Buchanan, B., Gruissem, W & Jones, R. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (1^e éd.). Maryland, USA: American society of plant physiologists.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M & Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica L.*). *Polish journal of food and nutrition academy*, 61(3), 195-199.

Burham, B.O. (2016). Antimicrobial Activity of Petroleum Ether, Ethylacetate and Methanolic Fraction of Five Sudanese Medicinal Plant. *International Journal of Science and Research*, 5(4), 2319-7064.

Burt, S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

C

Canbolat, O. (2012). Determination of Potential Nutritive Value of Exotic Tree Leaves in Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi*, 18 (3), 419-423.

Catalano, L., Franco, I., De Nobili, M & Eita, L. (1999). Polyphenols in olive mill wastewaters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteau and HPLC methods. *Agrochimica*, 43(5-6), 193-205.

Caunii, A., Pribac, G., Grozea, I., Gaitin, D & Samfi, I. (2012). Design of optimal solvent for extraction of bioactive ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 123-131.

Cerqueira, M.A., Souza, W.S.B., Martins, J.A., Teixeira, J.A & Vicente, A.A. (2010). Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. *Food Research International*, 43, 2031- 2038.

Chanforan, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate (Thèse de doctorat). Université d'Avignon.

Chang, C.H., Chang CC., Chang, M., Yang, M & Wen, H. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 178-182.

Chaouch, T.M. (2014). Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales (Thèse de doctorat). Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Chavan, U.D & Amarowicz, R. (2013). Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). *International Food Research Journal*, 20(3), 1139-1144.

Chen, Q., Li, Y & Chen, Z. (2012). Separation, identification and quantification of active constituents in *Fructus Psoraleae* by high performance liquid chromatography with UV, ion trap mass spectrometry and electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2(2), 143-151.

Chung, K.T & Wei, C.I. (2001). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, 9(4), 168-175.

Collin, S & Crouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire. Paris, France : Lavoisier Tec&Doc

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564 - 582.

D

D'Alessandro, L.G. (2013). Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits (Thèse de doctorat). Université de Lille 1.

Daayf, F & Lattanzio, V. (2009). Recent Advances in Polyphenol Research (Vol.1). Oxford, UK: Wiley Blackwell.

Dai, J & Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

Dangles, O. (2006). The physico-chemical properties of polyphenols: How do they relate to their roles in plants, foods and human health. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 17, 64–67.

De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H & Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 445-459.

De-Reynal, B & Multon, J. (2009). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les IAA (4^e éd.). Paris, France : Lavoisier-Tec & Doc.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K & Liu, R.H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014.

Dewick, P.M. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 12(6), 579-607.

Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.

Downey, M.O & Hanlin, R.L. (2010). Comparison of Ethanol and Acetone Mixtures for Extraction of Condensed Tannin from Grape Skin. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 31(2), 154 - 159.

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.

Lien, D.T.P., Tram, P.T.B & Toan, H.T. (2015). Effects of extraction process on phenolic content and antioxidant activity of soybean. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3(1-2), 33-38.

Dupont, F & Guignard, J.L. (2012). Botanique systématique moléculaire (15^e éd.) Paris, France : Elsevier-Masson.

Ďuračková, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 59(4), 459-469.

E

Egamberdieva, D., Mamedov, N., Ovidi, E., Tiezzi, A & Craker, L. (2016). Phytochemical and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from Uzbekistan: A Review. *Journal of Medicinally Active Plants*, 5(2), 59-75.

Eisenman, S.W., Zaurov, D.E & Struwe, L. (2013). Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan. New York, USA: Springer.

El Bouzdoudi, B., Ammouri, N., Joly, N., Martin, P., Saïdi, R., Nejjar El Ansari, Z., Bouras, M et al. (2017). Total Polyphenols and Gallic Acid Contents in Domesticated Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Pods and Leaves. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(4): 22-30.

El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., El Bali, B & Lachkar, M. (2010). Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. *Records of Natural Products*, 4(4), 193-204.

EL-Hashash, M.M., Abdel-Gawad, M.M., El-Sayed, M.M., Sabry, W.A & Abdel-Lateef, E.S.S. (2010). Antioxidant properties of methanolic extracts of the leaves of seven Egyptian Cassia species. *Acta Pharmaceutica*, 60(3), 361–367.

Elkhamlichi, A., El-Hajaji, H., Faraj, H., Alami, A., El-Bali, B & Lachkar, M. (2017). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of seeds and pods extracts of *Calycotome villosa* subsp. *Intermedia*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(4), 192-198.

El-Sayed, M.M., El-Nahas, H.A., Adel-Hameed, E.S & El-Wakil E.A. (2013). Investigation and antioxidant of phenolic compounds of the leaves of *Gleditsia Triacanthos* L. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(2), 172-177.

Erbil, N., Duzguner, V., Durmuskahya, C & Alan, Y. (2015). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Some Turkish Fodder Plants Belongs to Fabaceae Family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*). *Oriental journal of chemistry*, 31(1), 53-58.

Khorasani Esmaeili, A., Mat Taha, R., Mohajer, S & Banisalam, B. (2015). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from *in Vivo* and *in Vitro* Grown *Trifolium pretense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/643285>

F

Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A & Hatimi, A. (2011). Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2(3), 285-292.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D & Guo, Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*. 64 (2), 159-164.

Farrar, J.L. (1996). Les arbres du Canada. Ottawa, Canada : Fides.

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 390-396.

Fellows, L.F. (1986). The biological activity of polyhydroxyalkaloids from plants. *Pesticide management science*, 17(5), 602-606.

Field, J.A & Lettinga, G. (1992). Toxicity of Tannin Compounds to Microorganisms. Plant Polyphenols. Boston, Massachusetts: Springer.

Folin, O & Denis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of biological chemistry*, 12, 239-243.

Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánche, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N & Núñez, M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and Antioxidant power. Electronic. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(8), 3210-3216.

Frankel, E.N & Meye, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.

G

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.

Garnero, J. (1991). Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Paris, France : Encyclopédie des médecines naturelles.

Ghimi, W. (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.

González-Vallinas, M., González-Castejón M., Rodríguez-Casado, A & Ramírez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy; a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71(9), 585-599.

Gormaz, J.G., Valls, N., Sotomayor, C., Turner, T & Rodrigo, R.I. (2016). Potential Role of Polyphenols in the Prevention of Cardiovascular Diseases: Molecular Bases. *Current Medicinal Chemistry*, 23(2), 115-128.

Gross, G.G., Hemingway, R.W., Yoshida, T & Branham, S.J. (1999). Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers cop.

Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Thèse de Doctorat). Université de Corse.

Gupta, S.C., Prasad, S & Aggarwal, B.B. (2016). Aggarwal Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases. Cham, Suisse: Springer.

H

Hamed, M.M., Abdalla, A.M., Ghareeb, M.A & Saleh, S.A. (2017). Chemical constituents, *in vitro* antioxidant activity, oral acute toxicity and LD₅₀ determination of *moringa oleifera* leaves. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 9(5), 240-247.

Hammoudi, R., Hadj Mohammed, M., Ramdane, F & Khodir, A.A. (2012). Antibacterial activity of phenolic extract from *Teucrium polium geurii* plant. *Algerian journal of arid environment*, 2(1), 49-55.

Han, X., Shen, T & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.

Harborne, J.B. (1993). The Flavonoids: Advances in Research since 1986. London, UK: Chapman & Hall.

Harborne, J.B. (1998). Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. London, UK: Chapman & Hall.

Harborne, J.B., Boulter, D & Turner, B.L. (1971). Chemotaxonomie of the Leguminosae. London, UK: Academic Press.

Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126–1134.

Hegnauer, R & Grayer-Arkmeijer, R.J. (1993). Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry*, 34(1), 3-16.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R & Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.

Heywood, V.H. (1996). Les Plantes à Fleurs - 306 Familles de la Flore Mondiale. Paris, France: Nathan.

Hossain, M.A & Shah, M.D. (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 66-71.

Hostettmann, K., Potterat, O & Wolfender, J.L. (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *International Journal for Chemistry*, 52, 10–17.

Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J & Osakai, T. (2002). Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribe to chemical reactions following their oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572(1), 123-132.

K

- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pilaja, K., Kujala, T.S & Heinonen, M.** (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kamalak, A., Guven, I., Kaplan, M., Boga, M., Atalay, A.I & Ozkan, C.O.** (2012). Potential Nutritive Value of Honey Locust (*Gleditsia triacanthos*) Pods from Different Growing Sites for Ruminants. *Journal of agricultural science and technology*, 14(1), 115-126.
- Karamać, M., Kosińska, A., Rybarczyk, A & Amarowicz, R.** (2007). Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4), 471-474.
- Kasangana, P.B., Haddad, P.S & Stevanovic, T.** (2015). Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) Root Bark Extracts. *Antioxidants*, 4(2), 410-426.
- Kaya, E., Canbolat, O., Atalay, A., Kurt, O & Kamalak, A.** (2016). Potential nutritive value and methane production of pods, seed and senescent leaves of *Gleditsia triacanthos* trees. *Livestock Research for Rural Développment*, 28(7), 1.
- Kazmi, M.H., Malik, A., Hameed, S., Akhtar, N & Noor Ali, S.** (1994). An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*, 36(3), 761-763.
- Khan, A.** (2017). Medicinally important trees. Cham, Suisse: Springer.
- Khandelwal, K.R.** (2000). Practical Pharmacognosy: Technique and experiments (8^e éd.). Pune, Maharashtra: Nirali Prakashan.
- Khatoun, M., Islam, E., Islam, R., Rahman, A.A., Alam, A.H., Khondkar, P., Rashid, M & Parvin, S.** (2013). Estimation of total phenol and *in vitro* antioxidant activity of *Albizia procera* leaves. *BMC Research Notes*, 6(1), 121-128.
- Kinghorn, A.D., Hussaina, R.A., Robbins, E.F., Balandrin, M.F., Stirton, C.H & Evans, V.S.** (1988). Alkaloid distribution in seeds of *Ormosia*, *Pericopsis* and *Haplormosia*. *Phytochemistry*, 27(2), 439-444.
- Kivçak, B., Mert, T & Öztürk, H.T.** (2002). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts. *Turkish Journal of Biology*, 26, 197-200.
- Klejdus, B & Kuban, V.** (2000). High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in seed exudates of *Festuca arundinacea* and *F. pratense*. *Phytochemical Analysis*, 11(6), 375-379.
- Knežević, S.V., Blažković, B., Štefan, M.B., Alegro, A., Kószeg, T & Petrik, J.** (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 16(2), 14454-1470.
- Kumar, P., Sharma, B & Bakshi, N.** (2009). Biological activity of alkaloids from *Solanum dulcamara* L. *Natural Product Research*, 23(8), 719-723.

Kumar, S & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.

L

Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 661, 23-67.

Leibovici, B., Petrovanu, M., Lazar, M & Segal, B. (1986). Determination of flavones components from *Gleditschia triacanthos*. *Revista De Chimie*, 37, 81–82.

Lenoir, L. (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat (Thèse de Doctorat). Université D'Auvergne.

Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B & Lock, M. (2005). Legumes of the world. London, UK: Royal Botanic Gardens Kew.

Li, AN., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M & Li, H.B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.

Link, A., Balaguer, F & Goe, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1771-1792.

Liu, F., Liaos Zou, Y & Xiao, G. (2014). Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts. *The FASEB Journal*. 28(1), 830-32.

Loganayaki, N., Siddhuraju, P & Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 687–695.

Long, Y., Zhang, W & Wang, F. (2014). Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa* L. by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical analysis*, 4(5), 325-330.

Long, B., Gu, R., Wang, Y., Kennelly, E., Wu, S., Liu, B., Li, P & Long, C. (2014). Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(6), 903-915.

M

Mabry, T.J., Markham, K.R & Thomas, M.B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer Verlag.

Macheix, J.J., Fleuriet, A & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Suisse. Presses polytechniques et universitaires romandes.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.

- Manach, C., Mazur, A & Scalbert, A.** (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 6(1), 77–84.
- McCord, J.M.** (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- Merlin, M.** (2015). La consommation de polyphénols, en particulier de vin rouge, peut-elle avoir des effets sur la maladie d'Alzheimer : État de la question (Thèse de doctorat). Université de Bordeaux.
- Meziou-Chebouti, N., Merabet, A., Chebouti, Y & Behidj, N.** (2015). Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Ceratonia siliqua* L. Growing in Boumerdes, Algeria. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 9(1), 1.
- Michel, T.** (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (Thèse de doctorat). Université d'Orléans.
- Michel, T., Destandau, E., Le Floch, G., Lucchesi, M.E & Elfakira, C.** (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*, 131(3), 754-760.
- Miyase, T., Melek, F.R., Warashina, T., Selim, M.A., El Fiki, N.M & Kassem, I.A.** (2010). Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpenic acids from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry*, 71(16), 1908-1916.
- Mohamed, T.K., Kamal, A.M., Nassar, M.I., Ahmed, M.A.E, Haggag, M.G & Ezzat, H.A.M.** (2013). Phenolic Contents of *Gleditsia triacanthos* Leaves and Evaluation of its Analgesic, Anti-inflammatory, Hepatoprotective and Antimicrobial Activities. *Life Science Journal*, 10(4), 22.
- Mohammed, R.S., Abou Zeid, A.H., El Hawary, S.S., Sleem, A & Ashour, W.E.** (2013). Antidiabetic and cytotoxic activities of *Gleditsia Triacanthos* L. leaves. *Planta Med*, 79, 175.
- Mohammed, R.S., Abou Zeid, A.H., El Hawary, S.S., Sleem, A & Ashour, W.E.** (2014). Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(6), 547–553.
- Mohammedi, Z & Atik, F.** (2011). Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 609-615.
- Mohlenbrock, R.H.** (2008). Acanthaceae to Myricaceae: Water Willows to Wax Myrtles. Southern Illinois, USA: University Press.
- Mokbel, W & Hashinaga, B.** (2005). The Radical Scavenging Activities of *Radix puerariae* Isoflavonoids: A Chemiluminescence Study. *Food Chemistry*, 86,525-529. In: Nithiya, T & Udayakumar, R. (2016). *In Vitro* Antioxidant Properties of Phloretin-an Important Phytocompound. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 85-94.
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N & Bakri, M.M.** (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 361-366.

Mulvihill, E.E & Huff, M.W. (2010). Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, 26, 17-21.

N

National Research Council. (1983). Firewood Crops: Shrub and Tree Species for Energy Production (2^e vol.) Washington, USA: The National Academies Press.

N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G.N., Traoré, D & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6(1), 1-15.

Naczki, M & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.

Nakamura, M., Ra, J.H., Jee, Y & Kimac, J.S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *Journal of food and drug analysis*, 25(2), 316-326.

NCCLS, "National Committee for Clinical Laboratory Standards". (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, Pennsylvanie, USA.

Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 95–101.

Nitiema, L.W., Savadogo, A., Simporé, J., Dianou, D & Traore, A.S. (2012). *In vitro* Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) against Gastroenteritis Bacterial Strains. *International Journal of Microbiological Research*, 3(3), 183-187.

Nkhili, E.Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant (Thèse de Doctorat). Université de Montpellier.

Nur Syukriah, A.R., Liza, M.S., Harisun, Y & Fadzillah, A.A.M. (2014). Effect of solvent extraction on antioxidant and antibacterial activities from *Quercus infectoria* (Manjakani). *International Food Research Journal*, 21(3), 1067-1073.

O

Obeid, H.K., Karuso, P., Prenzler, P.D & Robards, K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2848-2853.

Ouis, N & Hariri, A. (2017). Phytochemical analysis and antioxidant activity of the flavonoids extracts from pods of *Ceratonia siliqua* L. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutics*, 4(2), 159-165.

Owen, R.W., Haubner, R., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chemistry and Toxicology*, 41(12), 1727-1738.

Ozenda, P. (1983). Flore du sahara. Lyon, France: CNRS.

P

- Panova, D.I. & Georgieva, E.S.** (1972). Study of the flavonoid composition of *Gleditschia triacanthos* leaves. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, 25, 71–74.
- Parekh, J & Chanda, S.** (2007). *In vitro* antimicrobial activity of Trapanatans Linn. Fruit rind extracted in different solvents. *African Journal of Biotechnology*, 6(6), 766-770.
- Patel, K.N., Patel, J.K., Patel, M.P., Rajput, G.C & Patel, H.A.** (2010). Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharmaceutical Methods*, 1(1), 2-13.
- Peacock, J.W.** (1967). An investigation of the chemical constituents of honey locust, *Gleditsia triacanthos* L, as phagostimulants for larvae of the Mimosa webworm, *Homadaula albizziae* (Thèse de doctorat). Université d'Ohio.
- Pękal, A & Pyrzyńska, K.** (2014). Evaluation of Aluminum Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 9,1776-1782.
- Penchev, P., Angelov, G & Condoret, J.S.** (2010). Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*, 5,115-123.
- Péry, A & Garric J,** (2017). Les effets écotoxicologiques : De la molécule à la population. Grande Bretagne, UK : ISTE.
- Phatak, S.R & Hendre, A.S.** (2014). Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 32-35.
- Pietta, P.G.** (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63(7), 1035-1042.
- Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C & Danet, A.F.** (2009). Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14(1), 480-493.
- Popovici, C., Saykova, I & Tylkowski, B.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- Prakash, A.** (2001).Antioxidant activity. *Medallion laboratories analytical progress*, 19(2), 1-6.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Brahma, N & Singh, H.B.** (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*, 104(3), 783-790.
- Prieto, P., Pineda, M & Aguilar, M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Prior, R.L., Wu, X & Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-302.
- Putod, R.** (1982). Les arbres fourragers : le févier. *Forêt méditerranéenne*, 4(1), 33-42.

Q

Quezel, P & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (vol.1). Paris, France : C.N.P.S.

Quispe-Candori, S., Foglio, M.A., Rosa, P.T.V & Meireles, M.A.A. (2008). Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by super critical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46(1), 27-32.

R

Rakhmanberdyeva, R.K., Talipova, M., Gazizov, F & Rakhimov, D.A. (2002). Carbohydrates and lipids of *Gleditsia triacanthos* seeds. *Chemistry of natural compounds*, 38(1), 24-26.

Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(5), 507–526.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.

Rezaire, A. (2014). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) (Thèse de Doctorat). Université des Antilles et de la Guyane.

Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Paris, France : Dunod.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J & Paganga, G. (1996). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-56.

Rowell, R.M. (2012). Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites (2^e éd.) USA: CRC Press.

S

Saffidine K, (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L (Thèse de Doctorat). Université Farhat Abbes de Sétif.

Saffidine, K., Sahli, F & Zerroug, M.M. (2015). Antioxydant and antimicrobial activities of *Plantago major*. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 7(5), 58-64.

Saleh, D.O., Kassem, I & Melek, F.R. (2016). Analgesic activity of *Gleditsia triacanthos* methanolic fruit extract and its saponin-containing fraction. *Pharmaceutical biology*, 54(4), 576-580.

Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S. (1989). Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.

Santamour, F.S. (1977). Flavonoid distribution in *Gleditsia*. *Journal of Arboriculture*, 3, 14-18.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.

Scalbert, A., Canach, C., Morand, C & Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.

- Scanlon, D.H.** (1980). A case study of honey locust in the Tennessee Valley Region Pods as feedstock for biomass energy. Tree crops for energy co-production on farms, Colorado: U.S. Department of Energy.
- Scapagnini, G., Caruso, C & Calabrese, V.** (2010). Therapeutic potential of dietary polyphenols against brain ageing and neurodegenerative disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698, 27-35.
- Schnabel, A., McDonel, P.E & Wendel, J.F.** (2003). Phylogenetic relationships in *Gleditsia* (Leguminosae) based on ITS sequences. *American Journal of Botany*, 90(2), 310-320.
- Schneider, A & Huyghe, C.** (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Paris, France : Quæ.
- Sciarinia, L.S., Maldonadob, F., Ribottaa, P.D., Péreza, G.T & Leo, A.E.** (2009). Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. *Food hydrocolloids*, 23, 306-313.
- Sebai, H., Souli, A., Chehimi, L., Rtibi, K., Amri, M., El-Benna, J & SaklyIn, M.** (2013). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(2), 85-90.
- Shah, A.S., Qaisar, K.N & Rather, M.A.** (2017). Estimated significance of biochemical constituents in seeds and pods reliable criteria for judging maturity of *Gleditsia triacanthos* variety inermis. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 6(4), 1719-1724.
- Shalaby, S & Horwitz, B.A.** (2014). Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. *Current Genetics*, 61(3), 1-12.
- Siek, T.J.** (1978). Effective use of organic solvents to remove drugs from biologic specimens. *Clinical Toxicology*, 13(2), 205-230.
- Smith, F.** (2004). Handbook of Forensic Drug Analysis (1^e éd.). New York, USA: Elsevier academic press.
- Sofowora, A.** (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Paris, France: KARTHALA.
- Southon, I.W., Bisby, F.A., Bunckingham, J & Harborne, J.B.** (1994). Phytochemical Dictionary of the Leguminosae: plants and their constituents. London, UK: Chapman and Hall.
- Spigno, G & De Faveri, D.M.** (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Spigno, G., Tramelli, L & De Faveri, D.M.** (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200 – 208.
- Sprent, J.I & McKey, D.** (1995). Advances in Legume Systematics, the Nitrogen Factor (vol.5). Kew, UK: Royal Botanic Gardens.

Stagos, D., Amoutzias, G.D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M & Kouretas, D. (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2155–2170.

Sulaiman, S., Ibrahim, D., Kassim, J & Sheh-Hong, L. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(4), 436-444.

Symonowicz, M & Kolanek, M. (2012). Flavonoids and their properties to form chelate Complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, 76(1), 35-41.

T

Takeoka, G., Dao, L., Teranishi, R., Wong, R., Flessa, S., Harden, L & Edwards, R. (2000). Identification of Three Triterpenoids in Almond Hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3437–3439.

Tasioula-Margari, M & Tsabolatidou, E. (2015). Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, 4(3), 548-562.

Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., Cacciola, F et al. (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “Berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 22-29.

Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B & Barry, T.N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 321-329.

Thomson, R.H. (1971). Naturally Occurring Quinones (2^e éd.). London. UK: Academic Press.

Trease, G.E & Evans, W.C. (1987). A textbook of Pharmacognosy. Oxford, UK: Tindal Baillière.

Trease, G.E, & Evans, W.C. (1989). Pharmacognosy (11^e éd.). London, UK, Baillière Tindall.

Trease, G.E & Evans, W.C. (2002). Pharmacognosy (15^e éd.). London, UK: Saunders.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

U

USDA, NRCS. (2009). The Plants Database: Honey locust, *Gleditsia triacanthos* L.-Plant symbol. U.S.). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. Consulté sur <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GLTR>.

V

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.

Van Acker, S.A., Van den Beng, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W.J & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.

Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J & Spencer, J.P.E. (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.

Verma, K.S & Pandey, R. (2014). Antioxidant potential of young pods of *Acacia catechu* wild collected from Jabalpur region. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6), 68-73.

Vermerris, W & Nicholson, R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. New York, USA: Springer.

W

Waksmundzka-Hajnos, M & Sherma, J. (2010). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis (vol. 102). Florida, USA: CRC.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M & Sanderson, M.J. (2004). A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846-1862.

Y

Ydjedd, S., Chaalal, M., Richar, G., Kati, D.E., López-Nicolás, R., Fauconnier, M.L & Louaileche, H. (2017). Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages. *International Food Research Journal*, 24(5), 2041-2049.

Yusuf, A.Z., Zakir A., Shemau, Z., Abdullahi, M & Halima, S.A. (2013). Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 6(2), 10-16.

Z

Zhang, C.R., Dissanayake, A.A & Nair, M.G. (2015). Functional food property of honey locust (*Gleditsia triacanthos*) flowers. *Journal of functional foods*, 18, 266–274.

Zhang, J.P., Tian, X.H., Yang, Y.X., Liu, Q.X., Wang, Q., Chen, L.P., Li, H.L & Zhang, W.D. (2016). *Gleditsia* species: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 3(178), 155-171.

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Chen, Y.M & Li, H.B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.

Zou, Y., Qian, Z.I., Li, Y., Kim, M.M., Lee, S.H & Kim, S.K. (2008). Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7001-7009.

Annexes

Annexe 01 :***Composition des milieux de culture utilisés*****1. Gélose Muller-Hinton**

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysât acide de caséine17,5 g
- Infusion de viande2,0 g
- Amidon soluble1,5 g
- Agar-agar bactériologique17,0 g

pH du milieu à 25°C : 7,3 ± 0,2

2. Bouillon Muller-Hinton

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysât acide de caséine17,5 g
- Infusion de viande2,0 g
- Amidon1,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

3. Gélose nutritive

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait de viande.....1,0 g
- Extrait de levure.....2,0 g
- Peptone tryptique5,0 g
- NaCl (ou KCl)5,0 g
- Agar-agar.....5,0 g

4. Bouillon nutritif

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone10,0 g
- Extrait de boeuf.....2,0 g
- NaCl5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

Annexe 02 :***Composition des réactifs utilisés pour l'étude phytochimique*****1. Réactif de Mayer et Wagner :**

La solution de travail consiste en un mélange des deux réactifs de Wagner et Mayer.

Réactif de Wagner : (Khandelwal, 2000)

Dissoudre 1.27 g d'iode avec et 2g de iodure de potassium dans 5ml d'eau distillée et compléter le volume à 100ml avec de l'eau distillée. En présence d'alcaloïdes, l'apparition d'une couleur rouge brunâtre indique un résultat positif.

Réactif de Mayer : (Khandelwal, 2000)

Dissoudre 1.36g de HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée, ajouté à une solution de 5g iodure de potassium dilué dans 20 ml d'eau distillée, compléter le volume à 100ml. En présence d'alcaloïdes l'apparition d'un précipité blanc crémeux indique un résultat positif.

2. Réactif de Dragendorff : (Smith, 2004)

Réactif de Dragendorff en milieu acétique dont la composition est :

Solution mère : mélanger 10 ml de solution A, 10 ml de solution B, 20 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'eau distillée.

Solution A : dissoudre 2 g de nitrate de bismuth dans 25 ml d'acide acétique glacial et ajouter 100 ml d'eau distillée.

Solution B : dissoudre 40 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau distillée.

3. Folin-Denis : (Folin et al., 1912)

Dissoudre 100 g de tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) et 20 g de d'acide phosphomolybdique dans 750 ml d'eau distillée puis ajouter 50 ml d'acide phosphorique. Chauffer à reflux le mélange pendant 2 heures. Le mélange final est complété à 1 l et la solution est conservée à l'abri de la lumière.

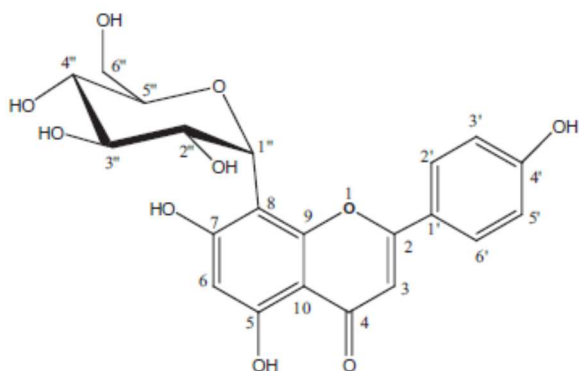
4. Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927)

Le réactif Folin et Ciocalteu et le résultat d'une modification du réactif de Folin-Denis. La modification consistait en l'addition de sulfate de lithium et de brome au réactif phosphotungstique-phosphomolybdique à la fin de la période d'ébullition dans le cadre de sa préparation, suivi d'un refroidissement et d'une dilution. L'addition du lithium empêche la formation de précipité qui interférerait avec la quantification de l'intensité de la couleur.

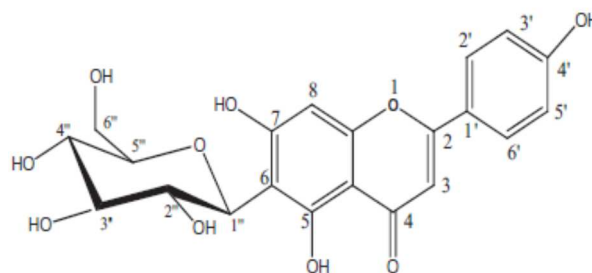
Annexe 03 :***Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)***

Tableau 18 : Temps de rétention des standards utilisés dans l'analyse par HPLC. La longueur D'onde : 280 nm.

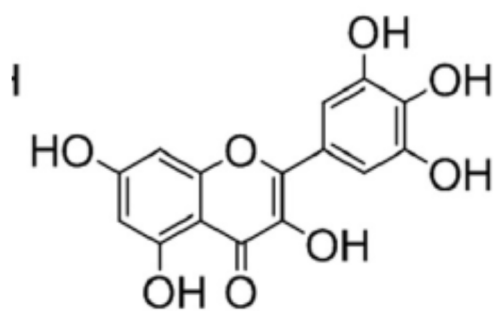
<i>Composés</i>	<i>Temps de rétention</i>
Acide ascorbique	3.60
Acide syringique	8.9
Acide coumarique	12.2
Vitexine	13.98
Isovitexine	14.51
Acide néochlorogénique	14.9
Acide cinnamique	16.3
Catéchine	20.14
Acide chlorogénique	21.9
Acide vanillique	27.35
Acide caféique	31.06
Myricetine-3-O-rutinoside	31.8
Myricetine-3-O-glucoside	32.7
Apigénine-glycoside	34.2
Acide férulique	35.5
Apigénine-7-O-glucoside	36.6
Naringenin	37.7
Acide gallique	38.6
Rutine	38.8
Myricetine rhamnoside	44.7
Isorhamnetin-3-O-glucoside	45.2
Quercétine rhamnoside	45.5
Lutéoline	46.7
Apigénine	47

Annexe 04 :*Structures de quelques composés phénoliques identifiés dans le fruit de
Gleditsia triacanthos**1. Les flavonoïdes glycosylés*

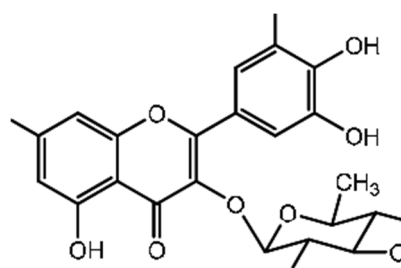
Vitexine



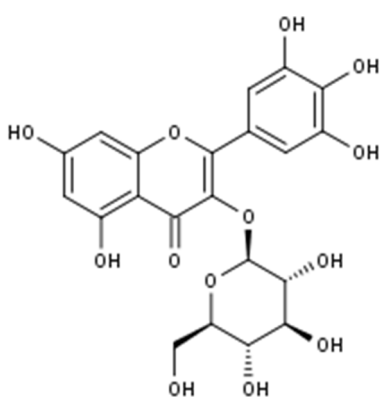
Isovitexine



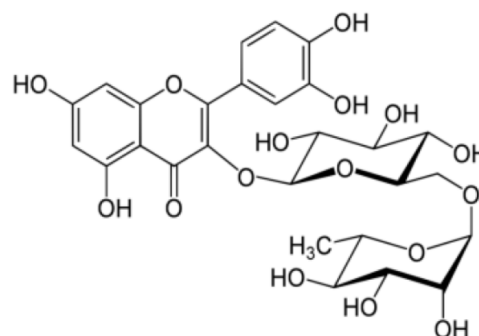
Myricetine



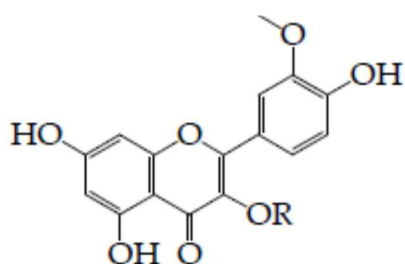
Myricetine 3-O-rhamnoside.



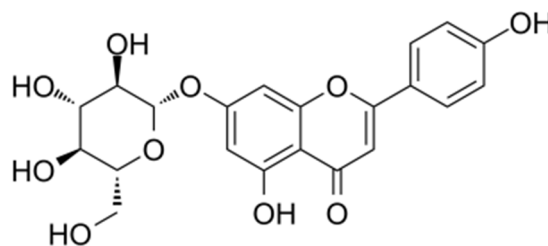
Myricetine 3-O-glucoside



Myricetine-3-O-rutinoside

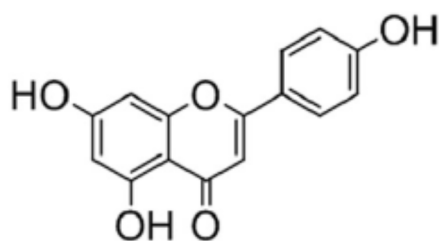


Isorhamnetin-3-O-glucoside

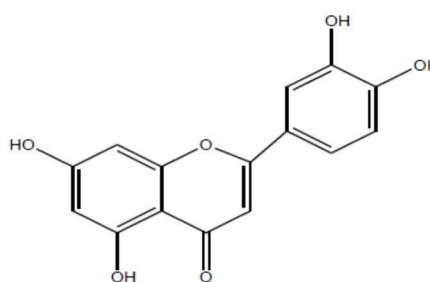


Apéginine glycoside

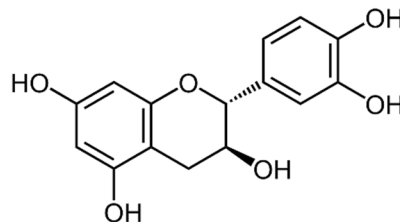
2. Les flavonoïdes aglycones



Apigénine

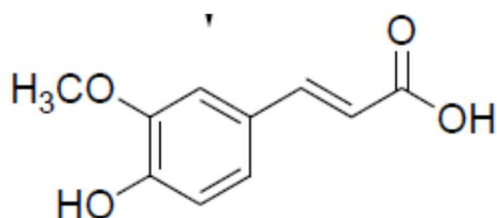


Lutéoline

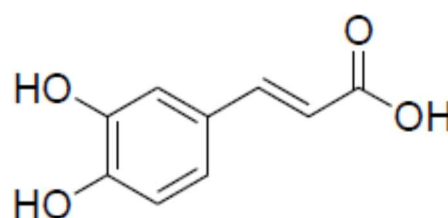


Catéchine

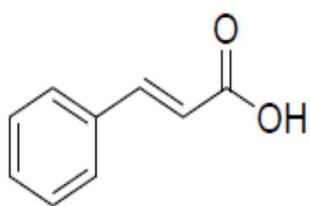
3. Les acides phénoliques



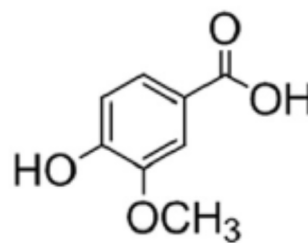
Acide férulique



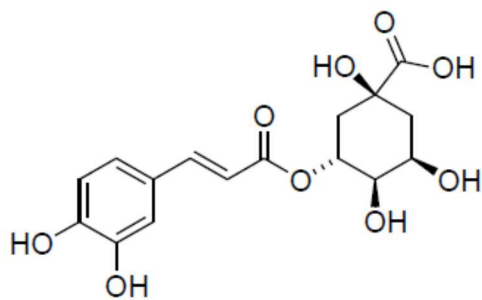
Acide caféique



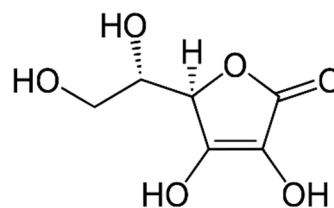
Acide cinnamique



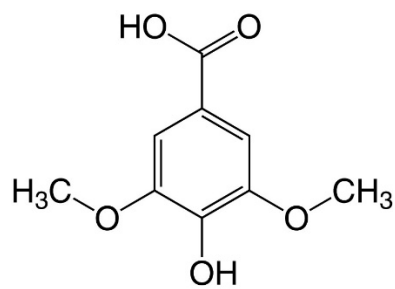
Acide vanillique



Aide chlorogénique



Acide ascorbique



Acide syringique

*Publication
Internationale*

Research Article

Assessment of Antioxidant Potential and phytochemical screening of Phenolic Compounds of *Gleditsia triacanthos* L Pods

Saidi Imène^{1,3}, *Mahdjoub Bessam Hassiba*^{1,2}, *Benchaachoua Abbassia*^{1,3}

¹Laboratory Eco Development of Areas, Faculty of Natural Sciences & Life, Djillali Liabes University of Sidi Bel-Abbes, Sidi Bel-Abbes, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Natural Sciences & Life, Djillali Liabes m,kl

³Department of Biology, Faculty of Natural Sciences & Life, Mustapha Stambouli University of Mascara, Mascara, Algeria

Corresponding Author: SAIDI Imene

Abstract:

Objective: The present study aims at the phytochemical screening, the quantification of phenolic compounds of *Gleditsia triacanthos* L pods (Family Leguminosae) and the assessment of their antioxidant potential by in vitro assays.

Subjects and Methods: The pods were extracted with 70% methanol and further partitioned with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol. The residual aqueous fraction has been also recovered. Colorimetric methods using Folin-Ciocalteu reagent, aluminum chloride and Folin-Denis were carried out to estimate total polyphenols, flavonoids and condensed tannins content of extracts. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and total antioxidant capacity (TAC) were used to determine in vitro antioxidant activity.

Results: In vitro phytochemical screening for all the extracts was tested and shown positive result for flavonoids, tannins, cardiac glycosides, sterols and terpenes, saponins and alkaloids. However, all the extracts were free of anthraquinones. The strongest activity against radical scavenging of DPPH was found in the ethyl acetate fraction ($IC_{50} = 16,288 \pm 0,299 \mu\text{g/ml}$) which contains highest amounts of flavonoids ($25.160 \pm 0.016 \text{ mg CE/g}$), whereas the chloroform fraction showed an important total antioxidant capacity ($750,584 \pm 129,793 \text{ mg AAE/g}$) with the highest amount of total polyphenols ($131.667 \pm 2.055 \text{ mg GAE/g}$). When compared to the other fractions, the aqueous fraction presented the lowest antioxidant activity for the two methods.

Conclusion: These data suggest that the pods of *Gleditsia triacanthos* L can be a good natural source of antioxidants that can be beneficial for food and human health.

Key words *Gleditsia triacanthos*, phenolics compound, pods extracts, phytochemical screening, antioxidant activity.

INTRODUCTION

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of free radicals and reactive metabolites, so-called oxidants or ROS (reactive oxygen species), and their elimination by protective mechanisms referred to as antioxidants. This imbalance leads to damage of important biomolecules and cells, with potential impact on the whole organism¹. The oxidation induced by ROS results in cell membrane disintegration, membrane protein damage, and DNA mutations, which results in aging and further initiates or propagates the development of many diseases such as arteriosclerosis, cancer, diabetes mellitus, liver injury, inflammation, skin damages, coronary heart diseases, and arthritis². Hence antioxidants became a vital part of our lives

today since they decreases the adverse effects of reactive species, neutralizes or destroys free radicals such as reactive oxygen and nitrogen species, before they damage cells^{3,4}.

The body's antioxidant defense consists of both endogenous and diet-derived exogenous compounds, which can be classified into three broad categories: antioxidant enzymes, chain-breaking antioxidant, and metal binding proteins. These antioxidants are small molecules that can be either water soluble or lipid soluble⁵. As shown in recent years, natural antioxidants discovered in plants have attracted some interest due to their widely acclaimed nutritional and therapeutic values⁶. Antioxidant properties stand to be an essential mechanism of beneficial activity of plant-derived compounds

and extracts. Polyphenolic compounds including flavonoids, phenolic acids and tannins have been considered as excellent natural antioxidants⁷.

Legumes are considered as nutraceutical food, due to the presence of wide variety of phytochemicals such as phenolic compounds, flavonoids, tannins, and unsaturated fatty acids. The family of fabaceae (Leguminosae) consists of about 770 genera and over 19,500 species world wide and is the third largest angiosperm family in terms of species numbers after Asteraceae and Orchidaceae⁸. The genus *Gleditsia* (Fabaceae) comprises about 16 species and several amongst them have long been used in traditional medicine. *Gleditsia triacanthos* L., (honey locust) is a deciduous tree belonging to the family Fabaceae. It possesses important biological activities as anti-mutagenic, anticancer, cytotoxic and treating rheumatoid arthritis⁹. The Native Americans used the pods of honey locust as a supplementary food source and medicines were made from various parts of the plant¹⁰.

Therefore, the aim of this study is to investigate phytochemical screening, phenolic contents and the in vitro antioxidant activity of different extracts from *Gleditsia triacanthos* L pods harvested from Norwest of Algeria, which should enhance their therapeutic value and improve the popularization of this specie.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

The fruits of *Gleditsia triacanthos*. L were collected during the month of November 2015 from northwest of Algeria (Sidi-Bel-Abbes). Dr. Asma El Zerey-Belaskri researcher at department of environment sciences, university of Sidi-bel-Abbes, confirmed the identity of the plant and a voucher specimen (BVCV, Fab125) was deposited at the herbarium of the laboratory. The fruits were washed with clean water, then completely air-dried in the shade at room temperature. The seeds were removed, and the pods were reduced to powder by electric mill, and kept in closed containers until subjected to extraction process.

2.2. Preparation of extracts

The crude extract was obtained by maceration of 100 g of dried material in Erlenmeyer flask with 500 ml of aqueous methanol (7:3 v/v) for 24 hours. The extraction process was conducted two times to retrieve more of the active compounds. The soaked powder-solvent mixture was filtered through a Whatman No.1 filter paper twice to remove insoluble matrices. The percolated extracts were concentrated with a rotary evaporator (LABOROTA 4000, Heidolph, Germany) at 45°C.

The residue was dissolved in distilled water and was fractionated successively with four increasing solvents polarity, including petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol to extract phenolic compounds of *Gleditsia triacanthos*. L pods. The organics fractions and residual aqueous fraction were evaporated at 45°C under reduced

pressure. The dried sample of each extract was weighed and the yield was calculated.

2.3. Preliminary phytochemical screening

Preliminary qualitative phytochemical analysis of alkaloids, cardiac glycosides, flavonoids, saponins, Sterols and terpenes, tannins and anthraquinones, was carried out using standard methods according to standard methods¹¹⁻¹⁴. After addition of specific reagents to the extracts, the results were analyzed by visual observation of color change or by precipitate formation.

2.4. Determination of phenolic compounds content

2.4.1. Total polyphenol contents

Total phenolic contents were determined in the extracts by Folin - Ciocalteu procedure¹⁵, using gallic acid as a standard. An aliquot (125 µl) of diluted extract, 500 µl of distilled water and 125 µl of Folin-Ciocalteu reagent were mixed in a test tube. It was left at room temperature in order to the reaction take place. After 6 minutes, 1250 µl of 7 % Na₂CO₃ solution was added to the sample solution. The final volume was adjusted to 3 ml with distilled water. The tubes were kept in the dark for 90 minutes at room temperature. Absorbance was measured at 760 nm. Total polyphenol content was expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry matter (mg GAE g⁻¹ DM).

2.4.2. Total flavonoid contents

Total flavonoids were measured by a colorimetric assay according to Dewanto et al.¹⁵. Briefly, 250 µl of the diluted extract was added to 75 µl of NaNO₂ solution (7%). The mixture was incubated for 6 minutes at room temperature. Subsequently, 150 µl of 10% AlCl₃ was added to the mixture and was incubated at ambient temperature for an additional 5 min. Following that, 500 µl of NaOH (1M) was added to the mixture. The final volume was adjusted to 2500 µl and carefully mixed. The absorbance was immediately read at 510 nm. Catechin was used as standard and the results are expressed as mg of catechin equivalents per gram of dry matter (mg CE g⁻¹ DM).

2.4.3. Condensed tannins

The condensed tannins were determined in extracts by a colorimetric Folin-Denis assay reported by Bajaj and Devsharma¹⁶. 1 ml of each suitably diluted extract was introduced into test tubes containing 7.5 ml of distilled water. 0.5 ml of Folin-Denis reagent and 1 ml of saturated sodium carbonate solution were then added. The tubes were mixed vigorously and allowed to stand at room temperature for 30 minutes. The absorbance was read at 760 nm against a blank containing distilled water. The amount of total condensed tannins were expressed in milligrams of tannic acid equivalents per gram of dry matter (mg TAE.g⁻¹ DM)

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. Determination of free radical scavenging activity by DPPH method

The free radical scavenging activity of each extract of the pods of *Gleditsia triacanthos*. L was determined by using a stable (DPPH) according to the procedure described by Sánchez-Moreno ¹⁷.

Different concentrations extracts were prepared in test tubes. An aliquot of 50 µL of each concentration was added to 1950 µL of methanol solution of DPPH as free radical source. The mixtures were stirred vigorously and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance of the sample was measured using an UV spectrophotometer at 517 nm against methanol blank. A negative control was taken after adding DPPH solution. The scavenging activity on the DPPH radical was expressed as inhibition percentage using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging activity (IP \%)} = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

A_{blank} : is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the sample),

A_{sample} : is the absorbance of the test compound.

The ascorbic acid methanol solution was used as positive control.

Calculation of IC₅₀ concentration

The extract concentration corresponding to 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the curves plotted of inhibition percentage against extract concentrations.

2.5.2. Total antioxidant capacity (TAC)

The total antioxidant capacity of each extract was determined according to the phosphomolybdenum method as reported by Prieto et al. ¹⁸. The assay is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the sample and formation of a green phosphate Mo (V) complex. Briefly, 0.3 ml of each extract and standard (ascorbic acid) with various concentration were mixed in tubes with 3 ml of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). Tubes were incubated in a boiling water bath at 95 °C minutes. The absorbance was measured at 695 nm against a blank using a spectrophotometer after cooling at room temperature. The blank consisted of all reagents and solvents without the sample. The total antioxidant activity was expressed as micrograms of ascorbic acid equivalents per gram of extract (mg AAE/g) using a calibration curve.

2.6. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. The results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical comparisons were performed with one way analysis of variance, and p values < 0.05 were regarded as significant, using Microsoft Excel 2003 software.

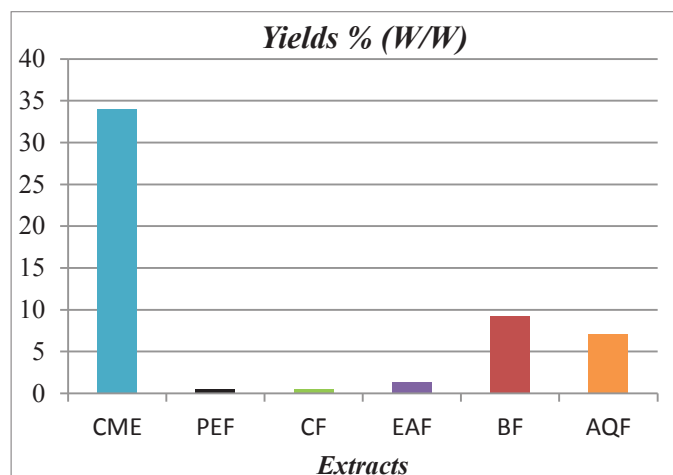
Table 1: Phytochemical screening of phenolic extracts of *Gleditsia Triacanthos*. L pods.

		Extracts					
Compounds	Tests	CME	PEF	CF	EAF	BF	AQF

3. RESULTS

3.1. Extraction yields

The extraction yields are shown in Figure 01. The results described in this figure reveal a significant influence (p < 0.05) of the extraction capacity of the solvent on the yield.



CME: crude methanolic extract, **PEF:** Petroleum Ether Fraction, **CF:** Chloroform Fraction, **EAF:** Ethyl Acetate Fraction, **BF:** n-Butanol Fraction, **AQF:** Aqueous Fraction.

Figure 01: The yield of different extracts of *Gleditsia Triacanthos* pods

The crude methanolic extract showed the highest extraction yield (34.046 ± 2.133%), and the n-butanol offer the second strongest best extraction efficiency (9.260 ± 2.857 %). In addition, the aqueous fraction exhibited a relatively high extraction yield (7.088 ± 3.621 %). However, compared to the fractions mentioned above, the ethyl acetate fraction revealed lower extraction yield (1.313 ± 0.132 %). Among these fractions, the extraction yields of the chloroform fraction (0.519 ± 0.259 %) and petroleum ether fraction (0.435 ± 0.149 %) were the lowest.

3.2. Preliminary phytochemical screening

The phytochemical characteristics of *Gleditsia Triacanthos* L pods extracts investigated are summarized in Table 1. Phytochemical screening had highlighted the wealth of pods in various classes of secondary metabolites. The results provide evidence of the presence of flavonoids, tannins, cardiac glycosides, sterols and terpenes, saponins and alkaloids depending on the solvents used. However, the results revealed the absence of anthraquinones in all solvents. Three groups of bioactive compounds are present in all extracts; tannins, alkaloids and cardiotoxic glycosides. Sterols and terpenes are present in the crude methanolic extracts, and the n-butanol fraction, and were not detected in the other fractions. Saponins and flavonoids were absent in petroleum ether fraction.

Flavonoids	Cyanidin test	++	-	+	+++	+++	++
Tannins	Ferric chloride test	++	+	++	+++	+++	++
Cardiac glycosides	Killer killiani test	+	+	+	+	+	+
Sterols and terpenes	Liebermann test	+	-	-	-	++	-
Saponins	Foam test	+	-	+	+++	++	+++
Anthraquinones	Borntraeeger test	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff test	++	+	+	+	+	+
	Bouchardat test	++	+	+	+	+	+
	Mayer and Wagner test	++	+	+	+	+	+

(+) = present; (-) = absent

3.3. Determination of phenolic compounds content

The results of the determination of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins in the *Gleditsia triacanthos* pods extracts shown in Table 2, revealed the presence of these compounds in the pods of the plant studied with different amounts depending on the extraction solvent.

3.3.1. Total polyphenols

The value of total phenol content varied, and ranged from 23.833 ± 3.171 to 131.667 ± 2.055 mg GAE/g. Chloroform fraction was found to contain the highest amount of phenolic compounds (131.667 ± 2.055 mg GAE/g) followed by ethyl acetate fraction (90.166 ± 2.321 mg GAE/g) and n-butanol fraction (70.833 ± 1.699 mg GAE/g). However, low amount were detected in aqueous fraction (23.833 ± 3.171 mg GAE/g). The hydromethanolic crude extract (48.733 ± 0.865

mg GAE/g) are not the richest in total polyphenols compared to the other fractions. We found high amount of polyphenols in both polar (aqueous methanol and n-butanol) and non-polar (petroleum ether and chloroform) solvents. However, the difference were not found to be statistically significant for all the solvents.

3.3.2. Total flavonoids

Among extracts, maximum amount of flavonoid content was found in ethyl acetate and chloroform fractions (25.160 ± 0.016 and 22.023 ± 0.660 mg CE/g respectively) followed by aqueous fraction (14.995± 0.960 mg CE/g), n-butanol fraction (12.615 ± 0.884 mg CE/g) and the crude methanolic extract (10.726 ± 0.561 mg CE/g). The lowest amount of flavonoids was in petroleum ether fraction (8.387 ± 0.397 mg CE/g). The difference in amount of flavonoids were also, observed to be statistically insignificant.

Table 2: The content in total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins for different tested *Gleditsia triacanthos* extracts.

Extracts	Total polyphenols (mg GAE/g DM)	Total flavonoids (mg CE/g DM)	Condensed tannins (mg TAE/g DM)
CME	48.733 ± 0.865	10.726 ± 0.561	6.140 ± 0.148
PEF	66.800 ± 5.722	8.387 ± 0.397	3.410 ± 0.288
CF	131.667 ± 2.055	22.023 ± 0.660	0.305 ± 0.058
EAF	90.166 ± 2.321	25.160 ± 0.016	3.429 ± 0.082
BF	70.833 ± 1.699	12.615 ± 0.884	28.830 ± 0.269
AQF	23.833 ± 3.171	14.995 ± 0.960	0.567 ± 0.108

3.3.3. Condensed tannins

The results of the amounts of condensed tannins indicate that these molecules were not the majority constituents of the phenolic compounds of the different fractions, their quantities varied significantly (p<0.05) between 0.305 ± 0.058 and 28.830 ± 0.269 mg EAT/g. The most important amounts were in the n-butanol fraction (28.830 ± 0.269 mg EAT/g) and the crude methanolic extract (6.140 ± 0.148 mg EAT/g). The other factions had low levels of condensed tannins (0.305 ± 0.058 to 3.429 ± 0.082 mg EAT/g).

The antioxidant activity through free radical scavenging activity (DPPH) method of the different extracts from honey locust pods at 1.562 to 200 µg/ml concentrations was determined (Figure 2). The percentage DPPH scavenging activities of all the extracts were dose dependent. A higher percentage inhibition means better antioxidant activity. All the extracts exhibited varying degrees of scavenging capacity.

3.4. In vitro antioxidant activity

3.4.1. DPPH radical scavenging activity

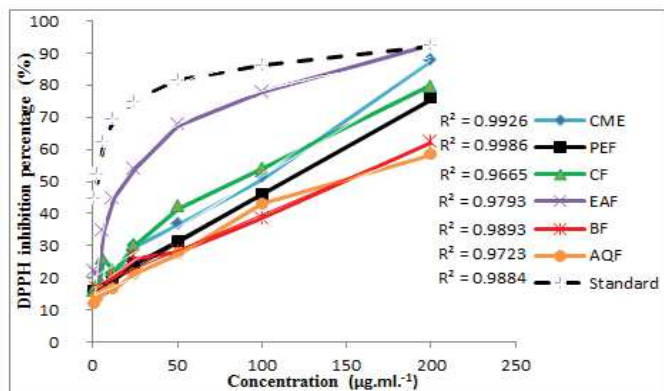


Figure 2: DPPH radical scavenging activity of *Gleditsia triacanthos* L pods extracts.

Since the IC₅₀ value is inversely proportional to percent inhibition, a lower IC₅₀ value corresponds with a higher antioxidant power. The IC₅₀ values for DPPH assay of the extracts have been given in Figure 3. A significant difference was observed (P<0.05) between the various solvents. The antioxidant activity of different extracts as equivalent to DPPH was in the order of: EAF > CME > CF > PEF > BF > AQF. The highest radical scavenging activity was obtained with the ethyl acetate fraction, with 92,436% inhibition of the free radical of DPPH at the concentration of 200 µg/ml, corresponding to the lowest value of IC₅₀ (16,288 ± 0,299 µg/ml).

According to the obtained results, the crude methanolic extract and the chloroform fraction had a moderate antioxidant capacity; their IC₅₀ were 93,964 ± 1,350 and 95,583 ± 3,529 µg/ml respectively, which is much higher than that of ascorbic acid whose value is of the order of 2,180 ± 0,0188 µg/ml. The petroleum ether fraction (114,619 ± 0,882 µg/ml), the n-butanol fraction (147,302 ± 3,320 µg/ml), and the aqueous fraction (152,465 ± 6,262 µg/ml), showed weak antiradical powers compared to the other fractions and the standard. From the results, it appears that the crude methanolic extract and his derivate fractions possess hydrogen-donating capabilities and can act as antioxidants.

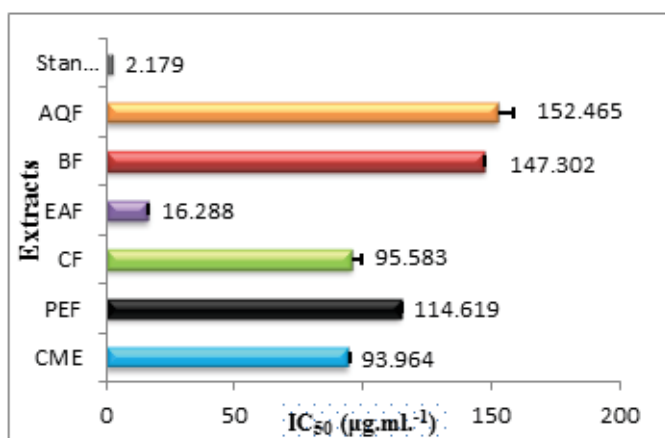


Figure 3: The IC₅₀ values of DPPH scavenging effect of *Gleditsia triacanthos* L pods extracts

3.4.2. Total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity of *Gleditsia triacanthos* L pods extracts using the phosphomolybdate method are displayed in Figure 4. A high absorbance value of the sample indicates its strong antioxidant capacity due to the intensity of the formation of the green phosphomolybdenum complex. Significant difference (p < 0.05) in total antioxidant capacity was observed between the different solvents.

In the ranking of the antioxidant capacity obtained by this method, the chloroform fraction showed higher phosphomolybdenum reduction (750,584 ± 129,793 AAE/g), followed by ethyl acetate fraction (362,688 ± 30,131 AAE/g). The values of total antioxidant capacities were also remarkably good for of the petroleum ether fraction (132,923 ± 14,474 AAE/g) and the crude methanolic extract (102,180 ± 3,728 AAE/g). These strong activities (TAC) can be attributed to the important levels of phenolic compounds in these fractions. The lowest antioxidant capacity was observed for the n-butanol and aqueous fractions (40,828 ± 2,766 and 10,723 ± 0,658 AAE/g respectively).

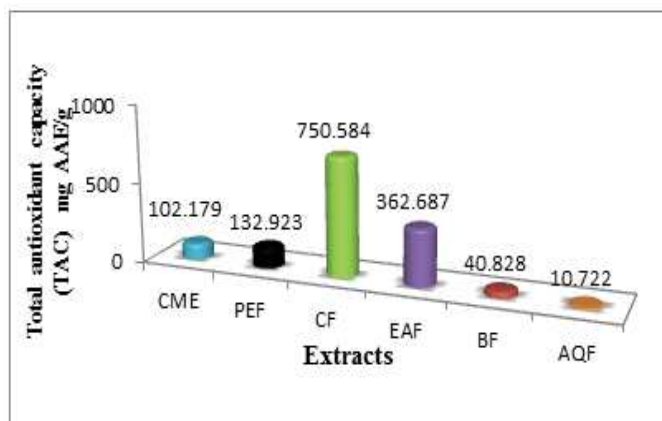


Figure 4: Total antioxidant capacity of *Gleditsia triacanthos* pods extracts

4. DISCUSSION

Extraction of active compounds from plant material raises currently a lot of interest because of their biological proprieties. Phenolic compounds are considered important natural antioxidants and represent one of the most abundant compounds in plants. They display several functions such as pigmentation, protection against ultraviolet rays, allelopathic action, defense against microbial attack and predators¹⁹.

Biologically active compounds usually occur in low concentration in plants. An extraction technique is that which is able to obtain extracts with high yield and with minimal changes to the functional properties of the extract required²⁰. Extract yield of *Gleditsia triacanthos* L pods prepared by maceration using increasing polarity solvents showed that the polar extracts (crude methanolic extract, n-butanol and aqueous fractions), were found to contain the highest yields. This result was in full agreements with other studies^{7,19, 21, 22}. The yield is a relative parameter and depends on the plant species studied, the part used in the extraction, the drying and storage conditions, the content of each species in secondary

metabolites and the nature of the solvent used in the plant extraction as well as the extraction method itself.

The phytochemical screening of the crude methanolic extract and his fractions from *Gleditsia triacanthos* L pods, revealed that tannins, alkaloids and cardiotoxic glycosides were present in all the solvents used in this study, while anthraquinones were absent in all of them. The screening of chloroform, ethyl acetate and aqueous fractions showed the absence of sterols and terpenes. The petroleum ether fraction had the poorest phytochemical composition. Phytochemicals were distributed differently depending on the extraction solvent. Therefore solvent or the extraction agents used in the preparation of phytochemicals compounds must be suitable for dissolving the bioactive constituents and thus for separating them from the substances containing the compounds which are to be extracted²³. These phytochemical compounds, identified in the pods extracts may be responsible for the biological activity shown by *Gleditsia triacanthos* and the reason for their use in folk medicine for pain relief²⁴.

Few studies concerning the phenolic compound content of the studied specie were carried out. Therefore, and based on the phytochemical screening results, the total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins contents of the different extracts of *Gleditsia triacanthos* L pods were estimated.

The values of the phenolic content clearly show that almost all the phenolic compounds present in the crude extract were depleted by organic solvents with increasing polarity and were concentrated in the chloroform and ethyl acetate fractions. This is confirmed by the relatively low levels of polyphenols observed in the aqueous fractions. The chloroform fraction showed the highest level of polyphenols. The results of El-Sayed et al.⁷ on the leaves extracts of *Gleditsia triacanthos*, indicate that polyphenols content were 240.32 ± 1.56 mg GAE/g DM in the crude hydromethanolic extract, 160 ± 1.65 mg GAE / g DM in chloroform fraction and 275.42 ± 1.53 mg GAE /g DM in ethyl acetate fraction. These levels are very important compared to our results.

The total flavonoid content was quantified by the aluminum chloride method. The result shows that this species is rich in flavonoids mainly in the ethyl acetate fraction (25.160 ± 0.016 EC/g). This result is in full agreement with several studies, which proved that ethyl acetate solvent was the most efficient to retrieve flavonoids⁷. The flavonoids of this plant have very heterogeneous degrees of solubility resulting from their structural differences. Previous works^{7, 25-28}, have demonstrated that this botanical genus contains both types of flavonoids namely: the glycosylated flavonoids (vicenin, lucenine, isorientin, orientine, vitexin and isovitexin), mainly present in Fabaceae, and aglycones flavonoids (luteolin and apigenin), which explains their high levels in solvents with different polarity. Less polar solvents are useful for extracting aglycone flavonoids, while more polar solvents such as water, ethyl acetate and alcohols are used to extract glycosidic flavonoids^{29, 30}.

The condensed tannins in our study are distributed with varying contents depending on the nature of the solvents. This inequality can be attributed to the difference in the degree of polymerization of the tannins extracted by the different solvents. Condensed tannins with low degrees of polymerization are soluble in water and polar solvents, while tannins with high degrees of polymerization are soluble in the alkaline solution³¹. Their amounts were higher in the n-butanol fraction and in the crude methanolic extract. However, our rates were much lower, than those, of earlier studies³²⁻³⁵, indicating higher amounts of condensed tannins in *Gleditsia triacanthos* L pods, compared to our results.

Our results were in full agreement with the previous studies, which reported that the percent of the phenolic compounds from the plants depends on the nature of the solvent used in the extraction process of the plant. This can be explained by the differential solubility of the biomolecules extracted from the plant material and the selectivity of the solvents used. A polar solvent isolates the polar compounds and the nonpolar solvent extracts the nonpolar compounds, thus different solvents will give different extract compositions³⁶.

The antioxidant potential of the extracts was investigated by two in vitro assays, namely, DPPH and the phosphomolybdenum method (TAC). DPPH antioxidant assay is based on the ability of a potential antioxidant to scavenge the stable radical of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), a stable free radical contains an odd electron, which is responsible for a strong absorption band in the range of 515-520 nm. In the presence of antioxidant compounds, DPPH can accept an electron or a hydrogen atom from the antioxidant scavenger molecule, to be converted to a more stable DPPH molecule. As the reduced form of DPPH is pale yellow, the greater the free radical scavenging capacity of an antioxidant compounds, is identified by the more reduction of DPPH and the less purple color there is in the sample³⁷. Our result clearly indicated that the ethyl acetate fraction presented an inhibition percentage of quite higher than other fractions (92,436 %) which was in agreement with the results reported in the literature^{7, 22, 38, 39}, indicating better DPPH free radical scavenging activity in the ethyl acetate solvent. This good antioxidant activity might be attributed to the presence of high amounts of phenolic compounds in this fraction. We suggest that the phytochemicals such as flavonoids, mostly present in the ethyl acetate fraction of *Gleditsia triacanthos* L pods could donate hydrogen to free radicals. In fact, these bioactive components could form complex compounds with the aluminum ion used in the flavonoid assay. The effectiveness of flavonoids as radical scavengers and metal chelators has been assigned to the hydroxyl group of the ortho position in the catechol structure (ring B), to the C2-3 double bond, conjugated to the C4 carbonyl group (cycle C) and the hydroxyl group at C5 (ring A)^{40, 41}. The antioxidant potential can, also be related to the quality and structure of phenolic compounds than their amount in plant tissues.

The total antioxidant capacity (TAC) is a spectrophotometric

assay based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the action of an antioxidant substance with the subsequent formation of a green phosphate/ Mo (V) complex with a maximum absorption at 695 nm¹⁸. The total antioxidant capacity of the extracts were higher in chloroform fraction (750,584 ± 129,793 mg AAE/g) followed by ethyl acetate fraction (362,688 ± 30,131 mg AAE/g). In addition, they also were the ones that showed the highest total polyphenolic and flavonoids contents among the studied extracts. These results suggest the importance of phenolic compounds on the antioxidant activity of these plant extracts, however we cannot neglect the potential influence of other bioactive compounds that may be extracted. Our results were different to those of El Sayed et al.⁷. According these authors, the leaves of *Gleditsia triacanthos* L had the highest total antioxidant capacities on the ethyl acetate fraction, (418.53 ± 3.78 mg AAE/ g), followed by the crude methanolic extract (288.51 ± 2.19 mg AAE/g) and finally on the chloroform fraction (174.51 ± 2.92 mg AAE/g). The variable results of total antioxidant capacity of *Gleditsia triacanthos* L crude extract and factions may be explained by the fact that the transfer of electrons/hydrogen from antioxidants depends on the structure of the antioxidants. In the two methods, aqueous faction exhibited the lowest antioxidant activity than that of other extracts probably due to the low level of polyphénols observed in this fraction.

A significant difference was observed for the antioxidant activity in relation to different extraction solvents used (p<0.05), thus prompting the need for utilization of appropriate solvent for isolation of maximum amount of antioxidants. Indeed, several studies have reported variations in the biological activities of extracts using different solvents extraction. Iloki-Assanga et al.⁴² confirmed that antioxidant activity of extracts is strongly dependent on the solvent due to the different antioxidant potentials of compounds with different polarity.

5. CONCLUSION

The present study demonstrate the richness in phenolic compounds as well as the large antioxidant capacity of the crude methanolic extract and fractions of *Gleditsia triacanthos* L pods. Phytochemical screening showed that the antioxidant activity of the extracts depend on the presence of phytochemicals such as, steroids, flavonoids, saponins tannins and alkaloids. Those phytochemicals were present diversely in different solvents. The choice of the extraction solvent is therefore essential because the secondary metabolites of the plant are distributed differently according to their respective polarity in each fraction, thus conferring on them medicinal and therapeutic properties. The study of antioxidant activity by two methods demonstrates that the ethyl acetate and chloroform fractions of *Gleditsia triacanthos* L pods could serve as potential sources of new antioxidant products. Further research is needed for the extraction and identification of active compounds present in these fractions, which will allow them to be used in pharmaceutical and human health fields. In vivo studies are also needed to understand the involvement of

phenolic compounds in the antioxidant mechanism.

References

- [1] Ďuračková, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol. Res*, 59, 459-469.
- [2] Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 546-566.
- [3] Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian J Pharm Clin Res*, 9, 14-32
- [4] Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F. (2018). Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications. Wiley edition. p 1-3.
- [5] Dasgupta, A., Klein, K., (2014). Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of diseases. Elsevier edition. P 10-11.
- [6] Esmaeili, A.K., Taha, R.M., Mohajer, S., Banisalam, B. (2015). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *Biomed Res Int*, 2015, 1-11 doi:10.1155/2015/643285.
- [7] El-Sayed, M.M., El-Nahas, H.A., Adel-Hameed, E.S., El-Wakil, E.A. (2013). Investigation and antioxidant of phenolic compounds of the leaves of *Gleditsia Triacanthos* L. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5, 172-177.
- [8] LPWG: The Legume Phylogeny Working Group. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66, 44-77.
- [9] Mohammed, R.S., Abou Zeid, A.H., El Hawary, S.S., Sleem, A., Ashour, W.E. (2014). Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 547-553.
- [10] USDA Plants Database (1996). Honey locust, *Gleditsia triacanthos* L.-Plant symbol. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- [11] N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G.N., Traoré, D., Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6, 1-15.
- [12] Békro, Y.A., Békro, M.J.A., Boua, B.B., Tra Bi, F.H., Ehilé, E.E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*, 4, 217-225.
- [13] Yusuf, A.Z., Zakir, A., Shemau, Z., Abdullahi, M., Halima, S.A. (2013). Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 6, 10-16.
- [14] Trease, G.E., and Evans, W.C. (2002). *Pharmacognosy*. 15th Ed. Saunders Editions. p 22-29
- [15] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.
- [16] Bajaj, K. L., and Devsharma, A. K. (1977). A colorimetric Method for the determination of tannins in Tea. *Microchimica Acta*, 68, 249-253.

- [17] Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- [18] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- [19] Naczki, M., and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- [20] Quispe Candori, S., Foglio, M.A., Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.A. (2008). Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by super critical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 27-32.
- [21] Nakamura, M., Ra, J.H., Jee, Y., Kimac, J.S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *Journal of food and drug analysis*, 25, 316-326.
- [22] EL-Hashash, M.M., Abdel-Gawad, M.M., El-Sayed, M.M., Sabry, W.A., Abdel-Lateef E.E. (2010). Antioxidant properties of methanolic extracts of the leaves of seven Egyptian Cassia species. *Acta Pharmaceutica*, 60, 361-367.
- [23] Visht, S., and Chaturvedi, S. (2012). Isolation of Natural Products. *Current Pharma Research*, 2, 584-599.
- [24] Saleh, D.O., Kassem, I., Melek, F.R. (2016). Analgesic activity of *Gleditsia triacanthos* methanolic fruit extract and its saponin-containing fraction. *Pharmaceutical Biology*, 54, 576-580.
- [25] Leibovici, B., Petrovanu, M., Lazar, M., Segal, B. (1986). Determination of flavones components from *Gleditschia triacanthos*. *Revista De Chimie*, 37, 81-82.
- [26] Panova, D.I., and Georgieva, E.S. (1972). Study of the flavonoid composition of *Gleditschia triacanthos* leaves. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, 25, 71-74.
- [27] Santamour, F.S. (1977). Flavonoid distribution in *Gleditsia*. *Journal of Arboriculture*, 3, 14-18.
- [28] Bojilov, D.G., Simeonova, Z.B., Solakov, N.Y., Angelova-Romova, M.Y., Tsvetanova, V.M., Ivanov, I.I. (2014). Chemical composition of *Gleditsia Triacanthos* L.: application in phytotherapy of socially significant diseases. *Journal of international scientific publications: materials, methods and technologies*, 8, 382-392.
- [29] Liu, F., Liaos, Zou, Y., Xiao, G. (2014). Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts. *The FASEB Journal*, 28, 830-32.
- [30] Mabry, T.J, Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Verlag, New York. p 15-19.
- [31] Rowell, R.M. (2012). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. 2nd Edition. USA. CRC Press. p 44-47
- [32] Kamalak, A., Guven, I., Kaplan, M., Boga, M., Atalay, A.I., Ozkan, C.O. (2012). Potential Nutritive Value of Honey Locust (*Gleditsia triacanthos*) Pods from Different Growing Sites for Ruminants. *Journal of agricultural science and technology*, 14, 115-126.
- [33] Eisenman, S.W., Zaurov, D.E., Struwe, L. (2013). *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*. Springer Edition. New York. USA. p 127.
- [34]. Kaya, E., Canbolat, O., Atalay, A., Kurt, O., Kamalak, A. (2016). Potential nutritive value and methane production of pods, seed and senescent leaves of *Gleditsia triacanthos* trees. *Livestock Research for Rural Development*, 28.
- [35] Bruno-Soares, A.M., and Abreu, J.M. (2003). Merit of *Gleditsia Triacanthos* pods in animal feeding: Chemical composition and nutritional evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 151-160.
- [36] Nur Syukriah, A.R, Liza, M.S., Harisun, Y., Fadzillah, A.A.M. (2014). Effect of solvent extraction on antioxidant and antibacterial activities from *Quercus infectoria* (Manjakani). *International Food Research Journal*, 21, 1067-1073.
- [37] Elkhmalichi, A., El-Hajaji, H., Faraj, H., Alami, A., El-Bali, B., Lachkar, M. (2017). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of seeds and pods extracts of *Calycotome villosa* subsp. *Intermedia*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7, 192-198.
- [38] Belmokhtar, Z., and Harche, M.K. (2014). In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Natural Product Research*, 28, 2324-2329.
- [39] El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., El Bali, B., Lachkar, M. (2010). Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. *Records of Natural Products*, 4, 193-204.
- [40] Loganayaki, N., Siddhuraju, P., Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 687-695.
- [41] Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Trinajsti, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.
- [42] Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Luján, L.M., Lara-Espinoza, C.L., Gil-Salido, A.A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J.L., Haines, D.D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes*, 1, 396.