

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de
Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

**Etude phytochimique et l'étude de l'activité
antioxydante et antibactérienne du *Beta vulgaris* L. et
Daucus carota L. et des colorants azoïques.**

Présenté par :

- BENRABAH Soumia.
- BOUCHEKOUT Chaima.

Devant le jury composé de :

- Promotrice : Bougueria HASSIBA (MCB) Centre universitaire de Mila.
- Examinatrice : Boukeria SABAH (MCB) Centre universitaire de Mila.
- Présidente : Merzouki SOURIA (MCB) Centre universitaire de Mila.

Année Universitaire: 2020/2021

Merci !

Nous tiens tout d'abord à remercier *Dieu* tout puissant qui a permis que nous soyons ce que nous sommes aujourd'hui. Car l'homme propose mais Dieu dispose, seigneur, veuille toujours diriger nos pas.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à :

M^{me} **MERZOUKI Souria**, enseignante au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Nous tenons à signaler que sa présence en tant que présidente nous honore.

M^{me} **BOUKERIA Sabah**, enseignante au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous avoir honorés par sa présence. Merci pour vos profondes connaissances scientifiques.

Nous remercierons très chaleureusement M^{elle} **BOUGUERIA Hassiba**, d'avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger, pour son soutien, et pour la confiance qu'elle nous a accordée pour la réalisation de ce travail.

Nous exprimons nos vives gratitude aux :

- Dr. **MIROUH. H**, le responsable du laboratoire d'analyses médicales à FERDJIOUA.
- M^{elle} **YAHIA Imane**, pour leur aide, sa sympathie, et ses connaissances scientifiques.

Un grand merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail tout d'abord :

♥ *A mes chers parents, que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez ! ♥*

♥ *Ma chère mère, ouahiba. Merci de m'avoir soutenu tant moralement que matériellement pour que je puisse attendre mon but, et de vos prières pour moi ♥*

♥ *Mon cher père, Nouredine que dieu vous garde et vous protège ♥*

♥ *A la mémoire de mon oncle Foudil qui a disparu très tôt ♥*

♥ *Ma cher binôme : Chaima ♥*

♥ *A mon grand-père : Ammar ♥*

♥ *A mes frères : Moumen, Mouhssen et Oussama ♥*

♥ *A mon fiancé : Bilel, Merci vivement de vos encouragements ♥*

♥ *A mes amis : Rihab, Bouchra, Amira, Dounia, Aya, Manel, ♥*

♥ *A tous ceux qui ont une place dans mon cœur : Madjda, Malek, mon oncle Sadik et sa femme Warda ♥*

♥ *A ma famille Benrabah, Zaimeche ♥*

SOUMIA

Dédicace

A l'aide de DIEU tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

♥ A mes chers parents, NADIA et ABDELHAK ♥

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour éternel, mon respect, ma reconnaissance pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être dès mes premiers pas d'enfance jusqu'aujourd'hui, et à l'infini.

♥ A mes frères: Islam et Adem ♥

♥ A mes sœurs : Nour el houda et Dhouha ♥

♥ Ma cher binôme : Soumia et sa mère ; tante ouahiba ♥

♥ A ma grand-mère Massouda et mon grand-père Hamza ♥

♥ A ma cousine ; Hadjer, et mes amis; Dounia et Aya ♥

♥ A toute la famille ; Bouchekout et Attia ♥

CHAIMA

Résumé

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'établir une étude phytochimique de deux plantes : *Beta vulgaris* L. de la famille d'*Amaranthaceae* et de *Daucus carota* L de la famille d'*Apiaceae*.

D'autres part, nous sommes aussi intéressés à l'étude des colorants synthétiques azoïque a pour buts de remplacer nos colorants naturels (du *Beta vulgaris* L et *Daucus carota* L) par ces colorants azoïques dans différents domaines.

L'étude des tests phytochimique des différents extraits montrent que ces plantes riches en flavonoïdes, Saponosides, stéroles et terpénoides.

La deuxième partie, porte sur la valorisation des différents extraits des plantes. Dans un premier temps, l'activité anti-oxydante des extraits méthanolique et aqueux des deux espèces et les colorants, (E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide ; (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol ; (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol ; (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide est mesurée par la méthode de DPPH. Ensuite, l'extrait méthanoliques et les colorants ont subi une étude de leurs activités antibactérienne. Les résultats n'ont montrés aucune activité antibactérienne de l'extrait méthanolique pour les deux espèces et les trois colorants synthétiques sauf le colorant E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol qui réagit sur *E.coli* dans ma concentration 25 mg/ml.

Pour les quatre colorants synthétiques étudiés dans ce travail nos résultats sont considérés comme premiers de ce genre, parce que l'étude de l'activité antioxydant et l'activité antibactérienne de ces colorants n'a jamais fait l'objet d'une publication.

Mots clés : *Beta vulgaris* L, *Daucus carota* L, colorants azoïques, screening phytochimique, antioxydant, antibactérienne, DPPH.

Abstract

The main objective of this research work is to establish a phytochemical study of two plants: *Beta vulgaris* L. from the family of *Amaranthaceae* and *Daucus carota* L. from the family of *Apiaceae*.

On the other hand, we are also interested in the study of synthetic azo dyes aimed at replacing our natural dyes (*Beta vulgaris* L. and *Daucus carota* L.) by these azo dyes in different fields.

The study of phytochemical tests of the various extracts shows that these plants are rich in flavonoids, saponosides, steroles and terpenoids.

The second part deals with the valuation of the various plant extracts. Firstly, the antioxidant activity of the methanolic and aqueous extracts of the two species and the dyes, (E) -4- (3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide; (E) -1- (phenylazo) -2-naphthol; (E) -1- (3-aceto phenylazo) -2-naphthol; (E) -4- (2-naphtholazo) benzenesulfonamide is measured by the method of DPPH. Then, the methanolic extracts and dyes underwent a study for their antibacterial activities. The results showed no antibacterial activity of the methanolic extract for the two species and the three synthetic dyes except the dye E) -1- (3-aceto phenylazo) -2-naphthol which reacts on E.coli in my concentration 25 mg / ml.

For the four synthetic dyes studied in this work our results are considered the first of their kind, because the study of the antioxidant activity and the antibacterial activity of these dyes has never been published.

Key words: *Beta vulgaris* L, *Daucus carota* L, azo dyes, phytochemical screening, antioxidant, antibacterial, DPPH.

الملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل البحثي هو إنشاء دراسة كيميائية نباتية من نباتين: *Beta vulgaris* L من عائلة *Amaranthaceae* و *Daucus carota* L من عائلة *Apiaceae*.

ومن ناحية أخرى ، نحن مهتمون أيضًا بدراسة الأصباغ الاصطناعية ذات طبيعة الأزويك التي تهدف إلى استبدال الأصباغ الطبيعية (*Beta vulgaris* L و *Daucus carota* L) بصبغات الأزويك في المجالات الصناعية.

أظهرت دراسة الاختبارات الكيميائية النباتية للمستخلصات المختلفة أن هذه النباتات غنية بمركبات الفلافونويد والسابونوزيدات والستيرولات والتربينويدات.

يتناول الجزء الثاني تقييم المستخلصات النباتية المختلفة. أولاً ، يتم قياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الميثانولية والمائية للنوعين والأصباغ (E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide ; (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol ; (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol ; (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide ، بطريقة DPPH. بعد ذلك ، خضعت المستخلصات والصبغات الميثانولية لدراسة أنشطتها المضادة للبكتيريا. أظهرت النتائج عدم وجود نشاط مضاد للجراثيم للمستخلص الميثانولي للنوعين والأصباغ الاصطناعية الثلاثة باستثناء الصبغة (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol الذي يتفاعل مع *E.coli* بتركيزي 25 مجم / مل.

بالنسبة للأصباغ الاصطناعية الأربعة التي تمت دراستها في هذا العمل ، تعتبر نتائجنا الأولى من نوعها ، لأنه لم يتم نشر دراسة نشاط مضادات الأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا لهذه الأصباغ.

الكلمات المفتاحية: الجزر ، الشمندر ، الأصباغ الاصطناعية ، المعاينة البيوكيميائية ، مضادات الأكسدة ،

مضاد للجراثيم ، DPPH

Table des matières

RÉSUMÉ

ABREVIATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Partie 01 : synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Les colorants

I. LES COLORANTS :	1
I.1. DEFINITION	1
I.2. NATURE DES PRINCIPAUX COLORANTS	1
I.3. LES COLORANTS SYNTHETIQUES	1
I.4. APPLICATION DES COLORANTS	2
I.5.1. Effets toxiques des colorants sur la santé humaine :	2

Chapitre 02 : Généralité sur les métabolites secondaires

II.A. GÉNÉRALITÉ SUR LES MÉTABOLITES SECONDAIRES :	4
II.A.1. CLASSIFICATION DES METABOLITES SECONDAIRES	4
II.A.1.1. Les polyphénols	5
II.A.1.2. Les alcaloïdes	5
II.A.1.3. Les terpènes	5
II.B. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES	5
II.B.1. CLASSIFICATION DES POLYPHENOLS	6
II.B.1.1. Acides phénoliques	6
II.B.1.2. Tanins	6
II.B.1.3. Coumarines	6
II.B.1.4. Flavonoïdes	7
II.B.1.5. Saponines	7
II.B.1.6. Quinones	8
II.B.1.6. Alcaloïdes	8
II.B.1.8. Les stérols	8
II.B.1.9. Stéroïdes et terpènes	9
II.B.2. ACTIVITE BIOLOGIQUES DES POLYPHENOLS	9

Chapitre 03: Les activités biologiques

III.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	11
III.1.1. QU'EST-CE QU'UN RADICAL LIBRE ?	11
III.1.2. STRESS OXYDATIF	12
III.1.3. LES ESPECES REACTIVES OXYGENEES	12
III.1.4. L'ANTIOXYDANT.....	12
III.1.4.1. Antioxydants endogènes.....	12
III.1.4.2. Antioxydants exogènes.....	13
III.1.5. Mécanismes d'action des antioxydants	13
III.1.6. METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	13
III.2.ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....	14
III.2.1. LES PRINCIPALES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES	14
III.2.1.1 Les bactéries	14
III.2.1.2.Les antibiotiques.....	14
III.2.3. MICRO-ORGANISMES UTILISES	14
III.2.2. METHODES D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	15

Chapitre 04: Présentation sur les espèces étudiées

IV.1. BETA VULGARIS L	17
IV.1.1. ÉTUDE BOTANIQUE.....	17
IV.1.2. SYSTEMATIQUE	18
IV.1.3.SYNONYMES	18
IV.1.4. DESCRIPTION GENETIQUE	18
IV.1.5. DESCRIPTION BOTANIQUE	19
IV.1.6. UTILISATIONS.....	19
IV.1.7.LES PRINCIPAUX COLORANTS DU BETA VULGARIS L:	20
IV.2. DAUCUS CAROTA L	21
IV.2.1. ÉTUDE BOTANIQUE.....	21
IV.2.2.SYSTEMIQUE	21
IV.2.3. SYNONYMES.....	22
IV.2.4. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE	22
IV.2.5. DESCRIPTION GENETIQUE	23
IV.2.6. UTILISATIONS.....	24
IV.2.7.LES PRINCIPAUX COLORANTS:.....	24

Partie 02 : Partie expérimentale

Chapitre 01: Matériel et méthode

I.MATERIELS ET METHODES.....	26
I.1. MATERIEL VEGETAL	26
I.2. SCREENING PHYTOCHIMIQUE :	27
I.2.1. Préparation des extraits végétaux :.....	27
I.2.2. Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait éthanolique	28
I.2.3. Identification des groupes chimiques à partir de chloroforme :.....	29
I.2.4. Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait méthanolique :.....	30
I.3. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE :	30
I.3.1. Préparation de l'extrait méthanolique des deux plantes étudiées.....	31
I.3.2. Préparation de l'extrait aqueux des deux plantes étudiées.....	31
I.3.3. Préparation des solutions méthanoliques des colorants synthétiques:	31
I.3.4. Préparation de la solution DPPH.....	33
I.3.5. L'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux	34
I.3.6. Expression des résultats	34
I.3.7. Calcul des IC ₅₀ (EC ₅₀).....	35
I.3.8. Méthodes d'analyses statistiques.....	35
I.4. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :	35
I.4.1. Méthode utilisée	35
I.4.2. Microorganismes utilisées.....	36
I.4.3. Stérilisation du matériel	36
I.4.4. Préparation de l'inoculum bactérien	36
I.4.5. milieux de cultures	36
I.4.6. Préparation des dilutions des extraits	36
I.4.7. Ensemencement et dépôt des disques	37
I.4.8. Lecture.....	37

Chapitre 02: Résultats et discussion

I.RESULTATS ET DISCUSSION	38
I.1. SCREENING PHYTOCHIMIQUE.....	38
I.2. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE :	39
I.2.1. Résultats	40
I.2.1. Discussion	43
I.3. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	44
I.3.1. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits des deux espèces	44
I.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne des colorants synthétique (azoïques).	46
I.3.3. Discussion	49

CONCLUSION

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

ABRÉVIATIONS

BV : *Beta Vulgaris* L.

DC : *Daucus Carota* L.

C : Carbone.

ERO : espèces réactives oxygénées.

EOA : d'espèces oxygénées activées

UV : ultra-violet.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

Abs : Absorbance.

DMSO : diméthylsulfoxyde.

ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique.

ATB : antibiogramme.

ASC : Acide ascorbique.

CLR : Colorant.

EXA : Extrait aqueux.

EXM : Extrait méthanolique.

mg : milligramme.

MH : Mueller Hinton.

Min : minute.

ml : millilitre.

µg : Microgramme.

µl : Microlitres.

DO : densité optique.

AAO : activité anti-oxydante.

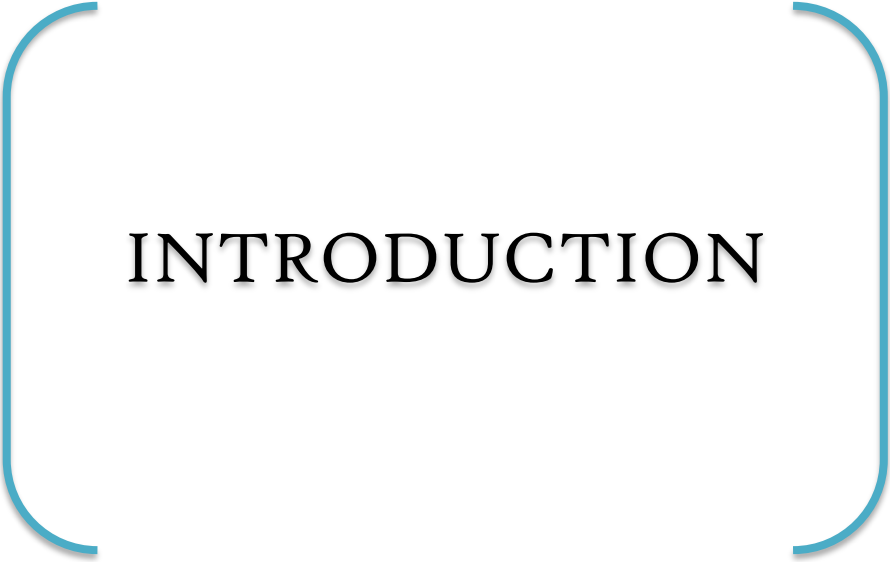
AAB : activité antibactérienne.

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Structure chimique des acides coumariques.....	7
Figure 02 : Squelette de base des flavonoïdes	7
Figure 03 : Structure de base des alcaloïdes.....	8
Figure 04 : Cholestérol.....	9
Figure 05 : Effet biologique des polyphénols.....	10
Figure 06 : Vue sous le microscope électronique de bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure 07: Aspect morphologique de <i>Beta vulgaris</i> L	17
Figure 08 : Aspect morphologique de carotte.....	21
Figure 09 : Les fleurs de <i>Daucus carota</i> L.....	23
Figure 10 : Les graines de <i>Daucus carota</i> L.....	23
Figure 11 : Le matériel végétal utilisé.....	26
Figure 12 : Préparation du matériel végétal (broyage et tamassage).....	27
Figure 13 : Structure chimique du radical libre DPPH.....	30
Figure 14 : Protocole de dilution des colorants.....	33
Figure 15 : Préparation de la solution DPPH.....	33
Figure 16 : Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante.....	34
Figure 17 : Effet de l'extrait méthanolique de <i>Daucus carota</i> L sur les bactéries étudiées	41
Figure 18 : Effet de l'extrait méthanolique de <i>Beta vulgaris</i> L sur les bactéries étudiées	42
Figure 19 : Effet de l'extrait de CLR1 sur les bactéries étudiées.....	43
Figure 20 : Effet de l'extrait de CLR2 sur les bactéries étudiées.....	44
Figure 21 : Effet de l'extrait de CLR3 sur les bactéries étudiées.....	44
Figure 22 : Effet de l'extrait de CLR4 sur les bactéries étudiées.....	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Etude systématique de <i>Beta vulgaris</i> L.....	18
Tableau 02 : Etude systématique de <i>Daucus carota</i> L.....	22
Tableau 03 : Code, nomenclature, formule et structure chimique des deux colorants synthétiques	31
Tableau 04 : Screening phytochimique de la partie aérienne des espèces étudiés.	38
Tableau 05 : Carrés moyens des écarts des moyens des paramètres mesurés sur IC ₅₀	40
Tableau 06 Effet extrait sur IC ₅₀	42
Tableau 07 : Effet Temps sur IC ₅₀	42
Tableau 08 : Effet interaction extrait /temps sur IC ₅₀	42
Tableau 09 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique en utilisant la méthode de diffusion du disque.....	45
Tableau 10 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de 04 colorants en utilisant la méthode de diffusion de disque.....	47



INTRODUCTION

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aujourd'hui, Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules indispensables à la mise au point de futurs médicaments (**Abou-chaar et al, 1980**). Sachant que plus de 25% des médicaments ordonnés dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (**Newman et al, 2000 ; Calixto, 2005**). Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par insuffisance d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu prouver une réelle efficacité, Une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne strictement avec des remèdes traditionnels à base de plantes (**World Health Organisation, 1999**).

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (**Gurib-Fakim, 2006**).

Malgré le développement obtenu grâce à l'utilisation des plantes dans de nombreux domaines industriels, alimentaires et pharmaceutiques ; les chimistes ont essayé de trouver des alternatives à cette source naturelle, comme l'utilisation de colorants ou l'utilisation de colorants synthétiques (**Batzias F.A. et SidirasD.K, 2007**).

Les colorants synthétiques sont obtenus par synthèse chimique et les colorants naturels proviennent de sources animales, minérales et végétales.

C'est dans le cadre de la valorisation des substances naturelles des plantes jouissant d'activités biologiques, que s'inscrit notre travail. Et dans le but de poursuivre ce programme de recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de deux espèces :

➤ *Daucus Carota* L.

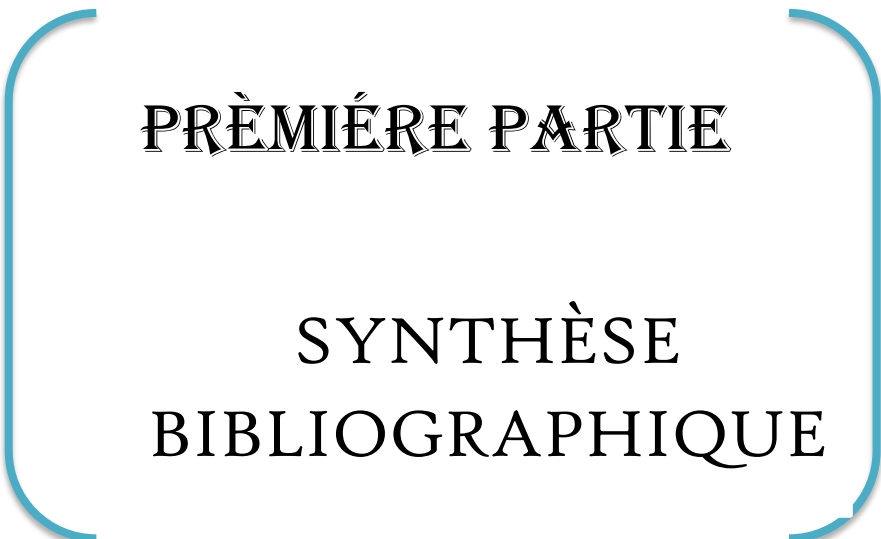
➤ *Beta vulgaris* L.

La première partie de ce travail de recherche porte sur une synthèse d'une recherche bibliographique. D'abord, une étude sur les colorants et les colorants synthétiques, les métabolites secondaires, en l'occurrence les composés phénoliques, et les activités biologiques.

La seconde partie, expérimentale, s'articule autour :

- ✓ le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail.
- ✓ Le screening phytochimique.
- ✓ L'étude de l'activité anti-oxydante des extraits des deux espèces mesurée par la méthode du DPPH.
- ✓ Ensuite, une étude de leurs activités antibactérienne.

On termine notre travail par une conclusion générale.



PRÈMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE-I-
LES
COLORANTS

I. LES COLORANTS :

I.1. Définition

Un colorant est une substance fortement colorée qui interagit avec le milieu dans lequel elle est introduite, et le colore en s'y dissolvant et en s'y dispersant.

Un colorant possède généralement une très grande aptitude à se fixer par teinture ou impression sur la plupart des textiles. Sa couleur dépend essentiellement de sa structure.

Les groupements chromophores qui possèdent la propriété d'absorbance dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet. Pour les colorants organiques, trois des chromophores les plus importants sont l'azobenzène, le triphénylméthane et l'anthraquinone (**Bougueria, 2007**).

Il existe plusieurs classes de colorants selon leurs structures chimiques, leurs colorations et leurs domaines d'utilisations.

I.2. Nature des principaux colorants

Les colorants naturels sont extraits des plantes, des fruits, des arbres, des lichens, des insectes ou des mollusques par des procédés simples comme le chauffage ou le broyage. Le jaune est le colorant naturel le plus répandu, mais l'indigo et le pourpre sont aussi présents en grande quantité dans le règne végétal (**Batra et Devi, 2015**).

I.3. Les colorants synthétiques

Les colorants synthétiques dominent aujourd'hui le marché surtout que leurs propriétés peuvent être précisément adaptées à leur utilisation. Tous ces colorants sont synthétisés principalement à partir des produits pétroliers, notamment du benzène et de ses dérivés (toluène, naphthalène, xylène et anthracène) (**Simont, 1982**).

Ils sont de plus en plus utilisés dans les industries de coloration et des textiles grâce à leur synthèse assez facile, à leur production rapide et à la variété de leurs couleurs comparées aux colorants naturels (**Griffiths, 1984**).

Les colorants synthétiques sont classés selon leur structure chimique (**Willmott et al, 2012**), repose sur la nature du groupement chromophore on distingue : colorants

azoïques, colorants triphénylméthanes, colorants indigoïdes ...etc (Šuleková et al, 2017).

I.4. Application des colorants

Les colorant aujourd'hui jouent un rôle essentiel dans de nombreux domaines tel que : la teinturerie, l'alimentation, la chimie, la biologie et la santé.

- ✓ Utilisé comme additifs de produits alimentaires (Une alimentation sans additifs est désormais inconcevable. Les aliments à l'état brut paraîtraient aux yeux des consommateurs comme « moins bons ». La couleur, l'aspect de la nourriture ont une influence psychologique sur le goût perçu des aliments) (Ahmad H et al, 1995).
- ✓ Augmenter l'attractivité du produit, et donc son acceptabilité, surtout chez les enfants.
- ✓ Rendre une préparation plus uniforme lorsqu'un ingrédient de la formulation a lui-même un aspect variable d'un lot à l'autre (Rowe, 2009).
- ✓ Permettre aux patients qui utilisent plusieurs produits, en particulier ceux qui ont des difficultés pour lire, de reconnaître et de différencier plus aisément les médicaments prescrits (Guindo, 2019).
- ✓ Juger de la bonne conservation d'un médicament, car un changement de coloration au cours du stockage peut généralement attester d'une possible altération du principe actif (Guindo, 2019).

I.5. Aspect toxicologique des colorants

Les colorants sont des composés difficilement biodégradables par les microorganismes, ils sont toxiques ou nocifs pour l'homme et les animaux.

I.5.1. effets toxiques des colorants sur la santé humaine :

Plusieurs travaux de recherche sur les effets toxiques des colorants sur la santé humaine ont été développés (Abouzaid, 2001).

En effet, des chercheurs (Desoille, 1987), ont montré que les colorants aminés sont souvent aptes à provoquer des irritations de la peau et des dermites.

Des effets similaires avec production d'eczéma et d'ulcération ont été observés chez les ouvriers d'usine de fabrication des colorants de la série du triphénylméthane **(Abouzaid, 2001)**. Des réactions allergiques, ont été observés avec divers colorants aminés azoïques, anthraquinoniques, et avec certains colorants du groupe des naphthalènes (chelite de rouge).

Les colorants de synthèse à base d'amines entraînent des risques cancérogènes, des tumeurs urinaires et plus spécialement les tumeurs bénignes et malignes de la vessie **(Desoille, 1987)**.

Les colorants azoïques sont aussi responsables d'apparition de Lépatomes chez l'homme. Les colorants métallifères sont parmi les substances qui représentent de grands risques pour la santé de l'homme. Ils peuvent également causer des dégâts sur les réseaux d'assainissement et des perturbations des traitements biologiques dans les stations d'épuration à cause de leur toxicité élevée **(Norseth, 1981)**.

L'utilisation des colorants à base d'arsenic tels que le vert de Scheele (arsénite de cuivre), vert de Schweinfurt (acétoarsénite de cuivre) provoquent des troubles digestifs : digestion pénible, nausées, diarrhée et peuvent être à l'origine des irritations de peau, des muqueuses oculaires et pulmonaires et surtout de cancer **(Desoille, 1987)**.

CHAPITRE -II-

LES

METABOLITES

SECONDAIRES

II.A. GÉNÉRALITÉ SUR LES MÉTABOLITES SECONDAIRES :

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment 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**).

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont divisés en quatre grandes familles : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des molécules essentielles à la vie des plantes, ce sont des molécules organiques complexes synthétiques, accumulés par les plantes en petite quantité. Les métabolites secondaires marquent une espèce, un genre ou une famille de manière originale. Ils sont classés selon leur appartenance chimique (**Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006**). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace dans:

- ✓ La tolérance des végétaux à des stress variés : action anti-herbivore (menthe par exemple),
- ✓ Inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes.
- ✓ Défense contre la sécheresse et lumière UV. (elles peuvent être anti-nutritives).
- ✓ Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole (**Sandrin, 2004**).

II.A.1. Classification des métabolites secondaires

On estime à plusieurs centaines de milliers les métabolites secondaires (200.000), de structure et de fonction très diverses. Il existe donc un grand nombre de classification selon les sources. . Ils sont divisé principalement en trois grandes familles : Les

polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (**Lutge et al, 2002 ; Abderrazak et Joël ,2007**).

II.A.1.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les plantes et appartiennent au métabolisme secondaire des plantes. Ils :

- ✓ Participent à la protection des plantes contre les agressions environnementales.
- ✓ Se caractérisent par la présence de plusieurs groupements phénoliques liés dans une structure plus ou moins complexe, généralement de poids moléculaire élevé (**Zakkad, 2017**).

II.A.1.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont les plus couramment trouvés dans les plantes sous forme de sels. Ce sont des composés spécifiques contenant au moins un atome d'azote. (**Zakkad, 2017**).

Ils forment un groupe important de substances naturelles d'intérêt thérapeutique par leur diversité structurale et l'éventail de leurs activités pharmacologiques (**Almaïmoune MAÏG, 2014**).

II.A.1.3. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures qui contiennent généralement une ou plusieurs doubles liaisons C = C. Ils sont complètement distribués dans le règne végétal, mais peuvent également être trouvés chez les animaux (**Bruneton, 2009 ; Bouvie et al ,2005**).

II.B. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bamforth, 2000; Lugasi et al, 2003**)

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

- **La voie de Shikimate**

C'est la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle permet de contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Kening et al, 1995**).

- **La voie de phénylpropanoïde**

Ça commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, isoflavonoïdes, flavonoïdes, coumarines, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second bio-polymère le plus important après la cellulose (**Zakkad, 2017**).

II.B.1. Classification des polyphenols

II.B.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénols, Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils présentent des propriétés biologiques : anti radicalaires, anti-inflammatoires, immunostimulants, hépatoprotecteurs, cholérétiques, antiseptiques urinaire (**Bruneton, 1999**).

II.B.1.2. Tanins

Les tanins sont des macromolécules de structure variée, on les trouve chez nombreux végétaux comme les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café....) (**Hemingway, 1992**).

Sont des substances d'origine végétale, non azotées de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther. Ils ont la propriété de former des complexes avec les protéines (**Harborne, 1997**).

Deux groupes de tanins différents par leur structure : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Pietta, 2000**).

II.B.1.3. Coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles sont connues dans la nomenclature internationale par : 2H-1-benzopyrane-2-one. Les coumarines sont répandus pour leurs nombreuses activités : cytotoxiques, antivirales, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes, hypotensives (**Gonzalez et Estevez, 1997**).

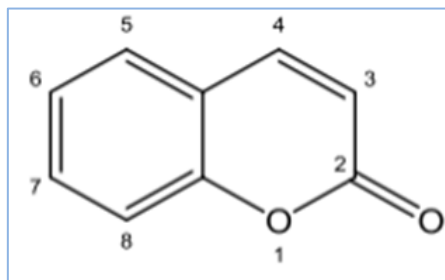


Figure 01 : Structure chimique des acides coumariques (Macheix et al, 2005)

II.B.1.4.Flavonoïdes

Le terme flavonoïde a été prêté du flavus ; (flavus = jaune) (Male Éev et Kuntic, 2007).

Ce sont les pigments universels des végétaux responsables de la coloration des fruits, des fleurs et des feuilles (Anta Almaïmoune MAÏG, 2014). On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou des chromoplastes (Guignard, 1996).

Les flavonoïdes ont une structure de base formée de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (Lobstein, 2010). Leur structure est représentée selon le système C6-C3-C6 (Emerenciano et al, 2007).

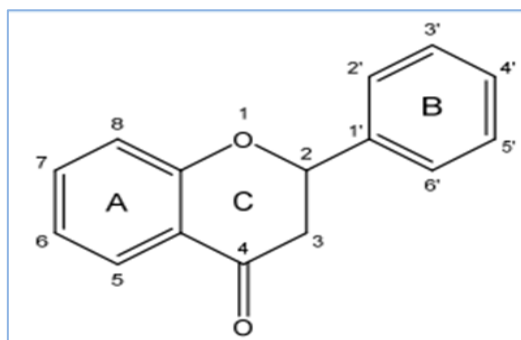


Figure 02: Squelette de base des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medic et al, 2004).

II.B.1.5.Saponines

Ce sont des hétérosides caractérisés par leurs propriétés tensioactives.

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau.

Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou à plusieurs sucres Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse **(Manach et al ,2004)**.

II.B.1.6.Quinones

Des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques, caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho quinones) **(Bruneton, 1993)**.

Les quinones peuvent être classées: Benzoquinones, naphtoquinones, isoprénoïdes quinones, anthraquinones.

II.B.1.6.Alcaloïdes

Des substances organiques azotées à propriétés basiques (Fig.3). Extraites de nombreux végétaux surtout chez les dicotylédones **(Marouf et Reynaud, 2007)**.

- **Rôle biologique des alcaloïdes**
 - ✓ Leur amertume et leur toxicité repoussent les herbivores.
 - ✓ Certains motifs chimiques utilisés par des papillons, soit pour rendre leur chair inavalable par des prédateurs, soit pour synthétiser des phéromones nécessaires à leur accouplement **(Guignard, 2000)**

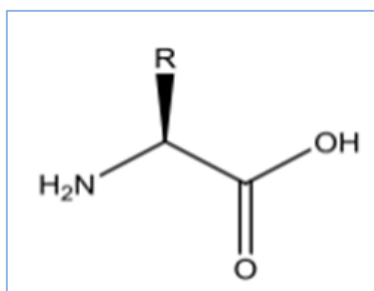


Figure 03: Structure de base des alcaloïdes

II.B.1.8.Les stérols

Ce sont des graisses végétales. Jouer un rôle important dans le fonctionnement du système immunitaire. Certains stérols se seraient montrés prometteurs dans le cadre

d'études sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate (**Eberhard et al, 2005**). Le plus représentatif est le cholestérol (Fig. 4).

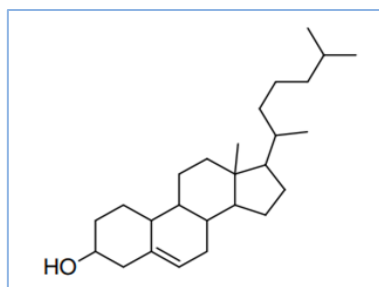


Figure 04 : Cholestérol.

II.B.1.9. Stéroïdes et terpènes

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique. Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones et des stérols (**Hopkins, 2003**).

Les térpenoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux et constituent le principe odoriférant des végétaux (**Bruneton, 1999**).

II.B.2. Activité biologiques des polyphénols

- **Chez les végétaux**

Les polyphénols représentent un système de défense pour les plantes contre les micro-organismes pathogènes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les polyphénols donnent la capacité à une espèce végétale de résister à l'attaque des insectes et des microorganismes avec la teneur en composés phénoliques (**Thomas, 1988**). Ils sont responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux (couleur, qualités nutritionnelles...).

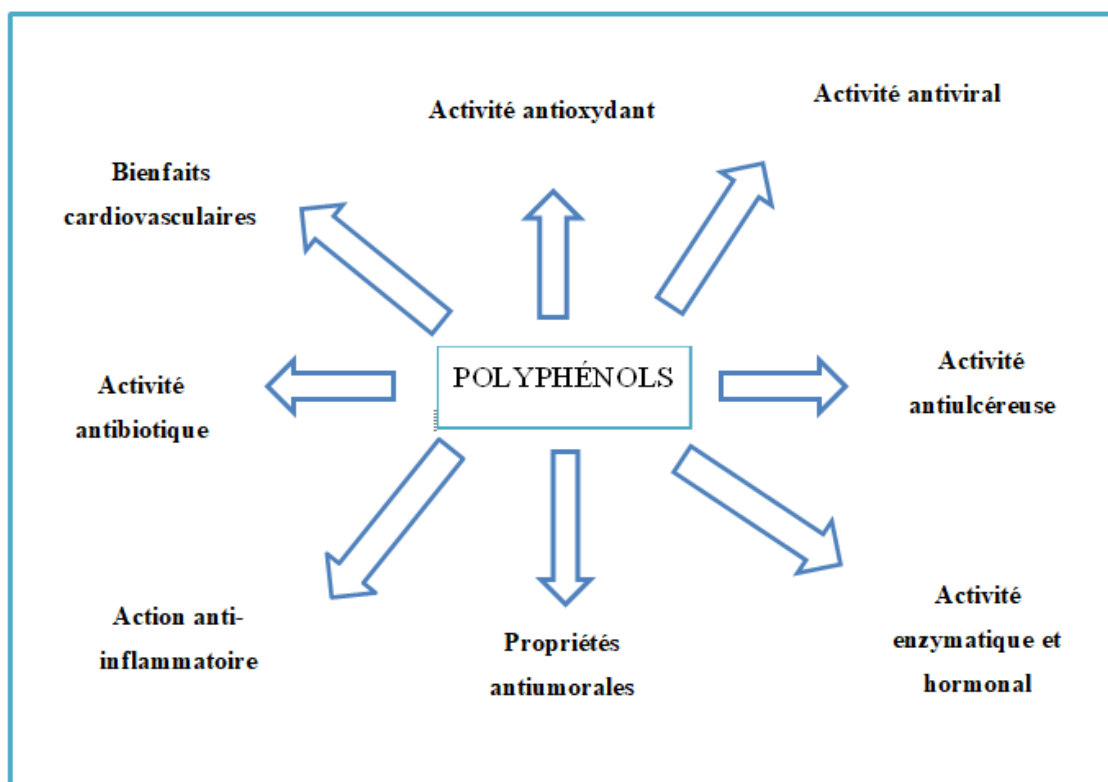


Figure 05 : Effet biologique des polyphénols (Bahorun, 1997).

CHAPITRE-III-
LES ACTIVITES
BIOLOGIQUES

III. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

III.1. Activité antioxydante

L'oxydation est l'une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur **(Djemoui, 2012)**.

Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène, des enzymes des ions métalliques et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres.

Suite à l'exposition successive à des facteurs externes (exposition prolongée aux UV, pollution, pesticides, infection), et aux mauvaises habitudes (tabac, alcool, alimentation déséquilibrée, sport intense, stress, fatigue), et enfin ; une déficience nutritionnelle en un ou plusieurs antioxydants comme les vitamines et les oligoéléments. Ce qui donne naissance à la formation de ce qu'on appelle « le stress oxydatif ». Ces facteurs vont favoriser la formation de radicaux libres dans nos cellules **(Boyd et al, 2003)**.

III.1.1. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une entité chimique (atome ou molécule), possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court **(Koechlin et Ramonatxo, 2006)**.

Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique **(Dacosta, 2003)**.

Les radicaux libres sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout en faible quantité dans les mitochondries.

III.1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydants de l'organisme (**Haleng et al, 2007**).

III.1.3. Les espèces réactives oxygénées

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé 'espèces réactives de l'oxygène' (ERO).

Parmi les espèces réactives oxygénées les plus intéressantes on se trouve les espèces réactives radicalaires qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$), monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante: l'oxygène singulet (1O_2), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (**Favier, 2003**).

III.1.4. L'antioxydant

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres. (**Shahidi, 1997**).

Ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**).

Et parmi leur propriété on peut dire qu'ils peuvent réduire les radicaux si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé (**Harrar, 2012**).

Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine en deux types : les antioxydants endogènes ou enzymatiques et les antioxydants exogènes ou non enzymatiques.

III.1.4.1. Antioxydants endogènes

Sont des enzymes impliquées dans la défense antioxydante. Ce système de défense est constitué de trois enzymes antioxydantes majeures sont les superoxydes

dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx) et la catalase (CAT) (**Chetibi et Diab, 2016**). Ces enzymes antioxydants permettent l'élimination des radicaux libres primaires (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

III.1.4.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. (**Miller et al., 1996**).

On trouve dans cette catégorie : les caroténoïdes et l'ubiquinol, la vitamine E, la vitamine C, le glutathion (GSH), l'acide urique, l'acide alphasalicylique...etc (**Delattre et al., 2005**).

III.1.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, un antioxydant peut agir contre un radical libre par différentes manières, Leur mécanismes d'action sont divers :

- ✓ le captage de l'oxygène singulier
- ✓ la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente
- ✓ la réduction de radicaux ou de peroxydes.
- ✓ la chélation des métaux de transition ce qui a pour effet de ralentir les réactions de Fenton (**Ekoumou et Coene, 2003. Prior et al, 2005**).

III.1.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests *in vitro* chimiques, pour analyser les extraits des plantes et de fruits sont la méthode ABTS et la méthode DPPH.

Les résultats de l'activité antioxydante sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connue sous le nom de Trolox qui est un analogue hydrosoluble de la vitamine E et la vitamine C. (**Zakkad, 2016**).

III.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule présente au sein d'un végétal qui a une très faible concentration, inhibe ou tue totalement le développement d'une bactérie. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien (**Nicola et Daniel., 1998**)

III.2.1. Les principales substances antibactériennes

III.2.1.1 Les bactéries

Les bactéries sont définies comme des micro-organismes vivants unicellulaires (formé d'une seule cellule). visible au microscope (de 0,5 μm à 1 μm de largeur et de 0,5 à 0,8 μm de longueur) et appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal. (**Nicklin et al, 2000**).

Pour se développer, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physico- chimiques favorables nécessaires, ainsi que des aliments qui répondent à leurs besoins énergétiques fondamentaux et spécifiques. Sur le plan pratique, le milieu de culture conçu par l'homme pour l'étude des bactéries répond à ces besoins, on l'appelle donc milieu de culture (**Mogode, 2005**).

III.2.1.2. Les antibiotiques

Un antibiotique possède les caractéristiques suivantes :

- ✓ Toxicité sélective pour les bactéries ou les mycoses.
- ✓ Mécanisme d'action précis avec une cible spécifique dont il bloque la fonction physiologique.
- ✓ Actif en milieu organique et capable de diffuser.

Les antibiotiques sont divisés selon le mécanisme d'action en deux parties :

- Antibiotiques qui inhibent la croissance des bactéries comme : Sulfonamide.
- Antibiotiques bactéricides comme : Pénicilline (**Monsieur, 2005**).

III.2.3. Micro-organismes utilisés

A. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à gram négatif (**Steven, 2004**), appartenant à la famille des *Entérobactérie*, souvent mobiles, mais parfois immobiles, isolées pour la première fois par Thomas Escherich en 1855. C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube

digestif. De forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

B. *Pseudomonas aeruginosa*

Un certain nombre de bacilles à Gram négatif de l'environnement se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales.

Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. Une des plus redoutables est *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 6) (Philippon, 1995)



Figure 06 : Vue sous le microscope électronique de bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Elmeskini, 2011).

C. Les Streptococcus

Les streptocoques sont définis comme des cocci à Gram positif, le plus souvent en chaînettes qui ont un métabolisme anaérobie, cependant la plupart des souches tolèrent l'oxygène et peuvent être cultivées in vitro en atmosphère aérobie, qui sont exigeants en nombreux facteurs de croissance: le sang ajouté aux géloses permet leur multiplication in vitro. Cette multiplication peut être favorisée par l'apport de CO_2 ou par une atmosphère anaérobie.

III.2.2. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne

➤L'aromatogramme

Une technique utilisée en bactériologie médicale, a été réalisée pour étudier l'activité antibactérienne appelée antibiogramme (ATB) ou méthode par diffusion en milieu

gélifié ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes (**Pibiri, 2006**).

Nombreuses méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro*, ils sont capables de donner des résultats différents selon les conditions adoptées par chaque manipulateur. Deux techniques peuvent être utilisées :

- ✓ **Méthode de diffusion.**
- ✓ **Méthode de dilution.**

CHAPITRE- IV-

PRÉSENTATION
SUR LES ESPÈCES
ETUDIÉES

IV.1. BETA VULGARIS L.

La betterave rouge (Fig. 7) est une plante originaire des bords de la méditerranée. Son origine étymologique provient de « bette », dont elle est cousine même si elles ne se ressemblent guère, et de « rave » : plante cultivée pour sa racine comestible,

Elle est une plante bisannuelle :

Première année : phase végétative : développement des feuilles et constitution de la racine charnue, accumulation de réserves en sucre.

Deuxième année : montaison et production de graines (pour les producteurs multiplicateurs de semences) (Medkour et Gasmi, 2017).



Figure 07: Aspect morphologique de *Beta vulgaris* L. (Photo Personnel, 2021).

IV.1.1. Étude botanique

Nom scientifique : *Beta vulgaris* L.

Noms vernaculaires :

- Beetroot, leaf beet, Garden beet, Swiss chard, spinach beet, (Anglais).
- Betterave potagère, betterave rouge, bette-épinard, poirée à couper, poirée à carde, bette à carde, côte de blette (Français)
- شمندر, البنجر الأحمر (Arabe)
- Betravou (Bambara)

IV.1.2. Systématique

Tableau 1 : Etude systématique de *Beta vulgaris* L. (Guindo, 2019)

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Spermatophyta (Spermatophytes)</i>
Sous Embranchement	<i>Angiospermophyta (Angiospermes)</i>
Classe	<i>Eudicotyledoneae (Eudicotylédones)</i>
Ordre	<i>Caryophyllales (Caryophyllales)</i>
Famille	<i>Amaranthaceae (Amaranthacées)</i>
Genre	<i>Beta</i>
Espèce	<i>Beta vulgaris</i> L.

IV.1.3.Synonymes

Plus de 70 synonymes, dont : (Grubben,2004).

- *Beta alba* DC. ;
- *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*.
- *Beta hortensis* Mill
- *Beta altissima* Steud.
- *Beta bengalensis* Roxb.
- *Beta rapa* Dumort
- *Beta stricta* K.Koch
- *Beta marina* Crantz

IV.1.4.Description génétique

Nombre de chromosomes: $2n = 18$ (Compagnon, 2018)

IV.1.5. Description botanique (Compagnon, 2018).

La betterave est une plante herbacée habituellement bisannuelle, robuste, et érigée ; dont la racine principale est longue, trapue, et conique, les racines latérales forment un système racinaire dense et étendu dans les 25 premiers centimètres du sol. Chez la betterave potagère (betterave rouge), l'hypocotyle et la partie supérieure de la racine principale forment un organe spectaculairement renflé, globuleux, aplati, cylindrique ou conique, les racines adventives se présentent sur deux lignes opposées dans la partie inférieure. La racine renflée est formée de couches alternées de tissu conducteur en général fortement coloré et de tissu de réserve légèrement coloré.

Les Feuilles: Les Feuilles de la rosette basale ont un long pétiole, les caulinaires alternes et à pétioles courts, souvent ovales et cordées, de 20 – 40 cm de long, aux bords ondulés sauf dans la betterave-épinard. Les tissus des feuilles sont cloqués entre les veines, presque glabre, vert, vert foncé ou rouge, et souvent brillant.

L'inflorescence: est un épi branchu, long et paniculé, atteignant 150 cm de long. Elles sont verdâtres, sous-tendues par de minuscules bractées. On compte 5 étamines ; un ovaire 1-loculaire, entouré par un disque, avec 2–3 stigmates.

Le Fruit: est une nucule, enfermée dans les parties basales du périgone épaissies et liégeuses, de 3–7 mm de diamètre, 1–6 fruits adhérents en glomérules. La graine est réniforme, brune, de 1,5–3 mm de diamètre.

IV.1.6. Utilisations

❖ Comme plante médicinale

Les racines et les feuilles de *Beta vulgaris* L. sont parfois utilisées comme médicaments anti-infectieux et anti-tumoraux, et aussi utilisée comme agent hypoglycémiant pour les diabétiques (Stintzing et Carle, 2004).

❖ Comme colorant

Actuellement, la bétanine, une bétalaïne appartenant à la sous-classe des bétacyanines, entre dans la composition (en tant que colorant) de nombreux produits alimentaires, cosmétiques ou même pharmaceutiques. Parmi les colorants autorisés pour une utilisation dans la formulation des médicaments. Comme médicament colorer avec de la bétanine (rouge de betterave, E162) peuvent être cités (Guindo, 2019) :

- ✚ SUPRADYN BOOST (comprimés effervescents)
- ✚ BEROCCA SANS SUCRE (comprimés effervescents).

IV.1.7. Les principaux colorants du *Beta Vulgaris* L. :

La coloration rouge caractéristique de BV est due à la présence de bétalaïnes, ce sont des dérivés de l'acide bétalamique, que l'on retrouve sous forme de sels internes dans les vacuoles des cellules végétales (**Damodaran, 2007**).

La bétalaïne est un colorant qui n'a montré aucune réaction allergique (**Kuramoto et al, 1996**). Leur utilisation est particulièrement convenue dans les produits alimentaires acides comme les produits laitiers, où la coloration avec les anthocyanines n'est pas stable (**Stintzing et Carle, 2004**).

On distingue deux sous-groupes de bétalaïnes (**Hibiscus, 2019**):

- Des bétacyanines essentiellement constitué de pigments de couleur rouge à violet, tel que la bétanine ou l'isobétanine.
- Des bétaxanthines, comprenant des pigments de couleur jaune à orange dont l'indicaxanthine (un des principaux pigments colorés de la betterave).

IV.2. DAUCUS CAROTA L.

La carotte, *Daucus carota* L. (Fig. 8) est le principal légume-racine cultivé dans le monde après la pomme de terre (Villeneuve et al, 1992). C'est une plante bisannuelle des climats tempérés appartenant à la famille des *Apiacées*, anciennement appelée ombellifères (Downie et Katz-Downie, 1996).



Figure 08: Aspect morphologique de carotte (Photo Personnel, 2021)

IV.2.1. Étude botanique

Nom scientifique: *Daucus carota*

Noms vernaculaires:

Carotte (Français)

Carrot (Anglais)

Zaroudia, جزر, سنارية, زرودية (Arabe)

Carotii (Bambara)

IV.2.2. Systématique

Tableau 2: Etude systématique de *Daucus carota* L. (Botineau, 2010).

Empire	<i>Eukaryota</i>
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Viridaplantae</i>

Embranchement	<i>Tracheophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Euphyllophytina</i>
Infra-embranchement	<i>Radiatopses</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Cornidae</i>
Superordre	<i>Aralianae</i>
Ordre	<i>Araliales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Sous famille	<i>Apioideae</i>
Tribu	<i>Caucalideae</i>
Genre	<i>Daucus</i>
Espèce	<i>Daucus carota L</i>

IV.2.3. Synonymes

- *Daucus sativus*.
- *Daucus azoricus*.

IV.2.4. Description morphologique

Le Plante: DC est une plante de taille moyenne (0,6 à 2 m au moment de la floraison). Nous la connaissons pour sa racine pivotante développée en organe de réserve charnue, cassante, pigmentée (rarement blanche), agréable au goût et non ramifiée (en sol meuble, sans obstacle) (**Reduron, 2007**).

Les feuilles: Les feuilles sont minces, souvent mates, avec un pourtour triangulaire. Elles sont très divisées-pennées, à divisions écartées très allongées, étroites, linéaires ou lancéolées-linéaires (**Reduron, 2007**).

Les fleurs (Fig. 9): Les inflorescences sont constituées de grandes ombelles composées de fleurs blanches jaunâtres, allogames et protandres, regroupées en ombellules. Chaque fleur est constituée de cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines et deux carpelles (Tirilly et Bourgeois, 1999).



Figure 09: Les fleurs de *Daucus carota* L. (Bach *et al.*, 1979)

Les graines (Fig. 10) : Le fruit (communément appelé graine de façon abusive) est un diakène albuminé de forme elliptique (Tirilly et Bourgeois, 1999)



Figure 10: les graines de *Daucus carota* L. (Latreche et Chaabane, 2020)

IV.2.5. Description génétique

C'est une plante diploïde et possède $2n = 18$ chromosomes (Chaux et Foury, 1994). Son génome a une taille de 473Bp (génome haploïde) (Arumuganathan et Earle, 1991).

IV.2.6. Utilisations

❖ Comme plante médicinale

En raison de ses propriétés hypolipémique, antinoceptive et anti-inflammatoire, antioxydants, les carottes sont utilisées en médecine traditionnelle analgésique :

- Plusieurs études épidémiologiques ont montré une corrélation négative entre la consommation de carotte et l'apparition de certains cancers, certaines maladies cardiovasculaires et les maladies liées au vieillissement comme la cataracte (**Cao et al, 1998 ; Koca et al, 2007**).
- Renforce l'action du foie, la sécrétion d'urines. La vitamine A contenue améliore la vision. La racine est un traitement des oxyures chez l'enfant. Les feuilles sont un bon diurétique, sont utilisées contre les cystites, soignent les troubles digestifs et atténuent les flatulences. Les graines stimulent les règles, les flatulences et soignent les troubles digestifs (**Chevallier, 1996**).
- Les caroténoïdes contenus dans la plante de carotte participent dans la lutte contre le cancer des poumons, du sein et de la prostate, des tumeurs de l'estomac, de l'intestin ou de l'œsophage (**De Groot, 1998**).
- La consommation de la carotte augmentait la capacité antioxydante et le taux de la vitamine E dans le sang (**Nicolle et al, 2003**).
- La carotte est vivement recommandée durant la grossesse pour sa richesse en caroténoïdes car les besoins sont accrus durant cette période.
- Le carotène et Les oléorésines sont des extraits de *Daucus carota* L pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques (**Doré et Varoquaux, 2006**).

IV.2.7. Les principaux colorants:

Les pigments présents dans les carottes sont appelés caroténoïdes.

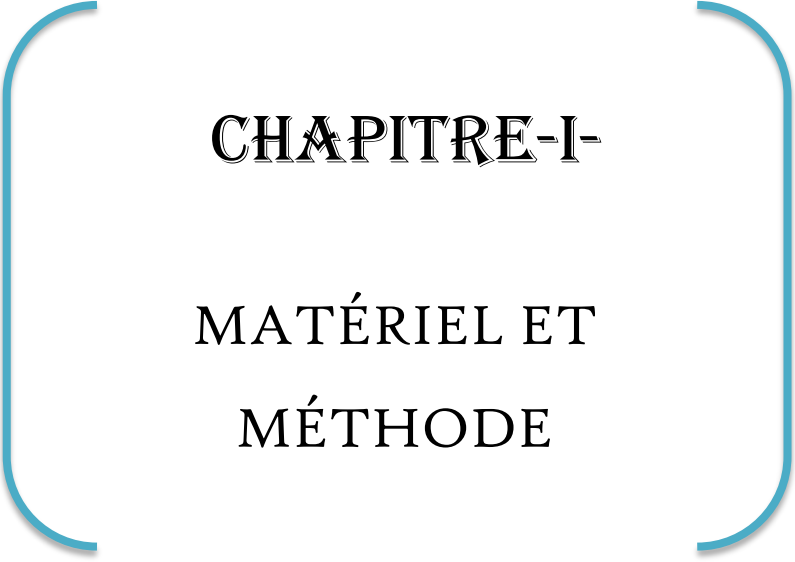
α carotène : ce pigment jaune orangé constitue environ 15% des hydrocarbures des carottes.

β carotène : ce pigment jaune orangé constitue environ 85% des hydrocarbures des carottes. Qualifié de provitamine A, c'est une molécule dite "anti-radicaux" qui aurait un rôle dans la prévention des cancers et des maladies cardio-vasculaires.

γ carotène : ce pigment jaune orangé constitue environ 0,1% des hydrocarbures des carottes (**Aurore, 2008**).

**DÈUXIÈME
PARTIE**

PARTIE
EXPÉRIMENTALE



CHAPITRE-I-

**MATÉRIEL ET
MÉTHODE**

I. MATÉRIELS ET MÉTODES

❖ Cadre de la zone d'étude

Les travaux que nous avons menés, ont été effectués au sein des laboratoires de l'Institut des sciences et de la technologie centre universitaires Abdelhafid Boussof-Mila, et aussi le laboratoire des analyses médicales MIROUH à Ferdjioua.

L'objectif de notre travail est porté sur l'étude phytochimique de deux plantes utilisées comme colorants naturels et la comparaison de leurs activités biologiques (antioxydante, et antibactérienne) avec ceux de quatre colorants synthétiques azoïques.

❖ Type et période d'étude

Nous avons effectué une étude qui s'est déroulée du 21 avril au 6 juillet 2021

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre étude est : *Daucus carota* L. et *Beta vulgaris* L. (**Fig. 11**), la partie souterraine a fait l'objet de notre investigation.



Figure 11: Le matériel végétal utilisé (Photo personnelle, 2021)

Les deux plantes sont coupées finement et séchées à une température ambiante dans l'étuve (annexe I) pendant 24 heures, Après séchage les organes sont broyés et mise en poudre à l'aide d'un moulin à café électrique, La poudre obtenue à partir de

chaque espèce est stockée dans des bocaux fermés et bien conservée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation pour éviter la perte des substances actives (Fig. 12).



Figure 12 : Préparation du matériel végétal (broyage et tamissage) (photo personnelle, 2021).

I.2. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique est une technique qui permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'un certain nombre de groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

I.2.1. Préparation des extraits végétaux :

A. Préparation de l'extrait éthanolique

50g de la poudre de chaque espèce (*Beta vulgaris* L., *Daucus carota* L.) a été macéré dans 250 ml d'éthanol (80%) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 3 jours, le produit obtenu est filtré par papier filtre de type Whatman, et après, le filtrat obtenu est conservé dans un flacon en verre fermé hermétiquement et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

B. Préparation de l'extrait chloroformique

Une quantité de 1g du matériel végétale a été mélangée avec 10 ml de chloroforme. Suivi par le chauffage au bain marie pendant 3 min puis une filtration à chaud et ajustement du volume à 10 ml.

I.2.2. Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait éthanolique

- **Recherche des flavonoïdes**

Ajouter à 5 ml de l'extrait à tester, quelques gouttes d'HCl et quelques copeaux de magnésium. L'apparition de rose, de rouge ou de jaune prouve la présence de flavonoïdes (**Trease et Evans, 1987**).

- **Recherche des alcaloïdes**

Le test est réalisé par la réaction de précipitation avec le réactif de Wagner. Ajouter 20 ml de l'extrait à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10 %) et chauffer dans un bain marie, ajouter la solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) jusqu'à obtenir un milieu à $PH = 9$ puis extraire à l'éther.

Utilisez ensuite un appareil « évaporateur rotatif » (annexe I) pour concentrer l'extrait obtenu, Dissoudre le résidu dans 5 ml HCl (2%) et utiliser quelques gouttes de Wagner l'apparition d'un précipité brun, indique la présence d'alcaloïdes (**Memelink et al., 2001**).

- **Recherche des stérols**

Dans un bécher, ajouter 5 ml d'extrait à analyser ; 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml Chloroforme; utiliser une pipette et ajouter 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré au fond du bécher sans remuer, laissé reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols (**Trease et Evans, 1987**).

- **Recherche des coumarines**

Faire tremper 20 g de la poudre dans 40 ml d'éthanol pendant 2 à 3 heures. Après macération Filtrer et ajouter 5 ml de KOH (10 %) et 5 ml de HCl (10 %) aux 5 ml de filtrat. Des précipitations brun-rouge indiquent la présence de coumarine (**Trease et Evans, 1987**).

- **Recherche des glycosides**

Pour détecter ces molécules, mélangez 1 ml d'extrait brut avec 2 ml d'eau. Après distillation, prélever 20 gouttes de liqueur de Fehling et le chauffer à 70°C au bain-marie. La formation d'un précipité rouge brique indique la positivité du test (**Trease et Evans, 1987**).

- **Recherche des anthocyanes**

À 5 ml d'extrait aqueux on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) puis 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (**Mibindzou Mouellet, 2004**).

- **Recherche des tanins**

1 ml de l'extrait d'alcool a été ajouté à 2 ml d'eau distillée suivi par l'addition de 2-3 gouttes de la solution de $FeCl_3$ 1 %. L'apparition d'une couleur verte ou bleu-vert indique la présence de tanins. L'apparition d'une couleur verte indique tanins catéchiques et bleue noirâtre indique tanins gallique. (**Trease et al., 1987 ; Douhou et al., 2003**).

- **Recherche des stéroïdes**

Dans un bécher, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (**Harborne, 1998**).

I.2.3. Identification des groupes chimiques à partir de chloroforme :

- **Recherche des Anthraquinones libres**

On introduit dans un tube à essai 1 ml d'extrait chloroformique et 1 ml de NH_4OH dilué. La coloration plus ou moins rouge après agitation de la solution indique la présence d'anthraquinones libres (**Diallo, 2000**).

- **Recherche des quinones**

2g de la poudre humectés par 2 ml de HCl + 20 ml de chloroforme pendant 3 Heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque. Une coloration rouge indique la présence des quinones (Afaq et Malik, 2005).

I.2.4. Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait méthanolique :

- **Recherche des terpénoïdes**

Ajouté à 2,5ml de l'extrait méthanolique, 0,4ml de chloroforme et 0,6ml de l'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase, indique la présence des terpénoïdes (Trease et Evans, 1987).

- **Recherche des saponosides**

2g de la poudre a été macéré dans 80 ml d'eau distillé pendant quelques minutes, après filtration et agitation, l'apparition d'une mousse persistante dans le milieu prouve la présence des saponosides (saponines) (Kalla, 2012).

I.3. Etude de l'activité anti-oxydante :

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits (Extrait méthanolique, extrait aqueux, colorants synthétiques) est réalisée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

❖ Test de DPPH

☞ Principe

Le DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrayl), un radical libre de couleur violette, est réduit en présence de composés anti-radicalaires (Molyneux, 2004).

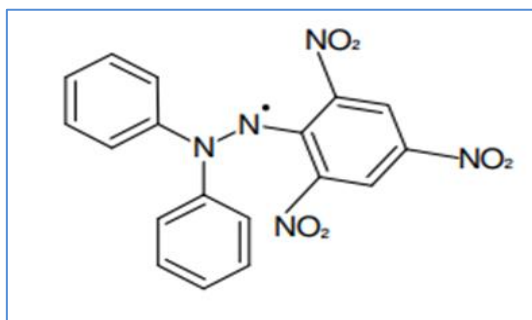


Figure13: Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl- Hydrazyle)

I.3.1. Préparation de l'extrait méthanolique des deux plantes étudiées

10g de la poudre sont ajoutés à une solution de 100 ml de méthanol 70 % (70 ml méthanol + 30 ml eau) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 2 jours, ensuite le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre.

Le filtrat est soumis à une évaporation par le rota vapeur. Le produit obtenu est ensuite conservé dans une boîte de pétri en verre jusqu'à utilisation.

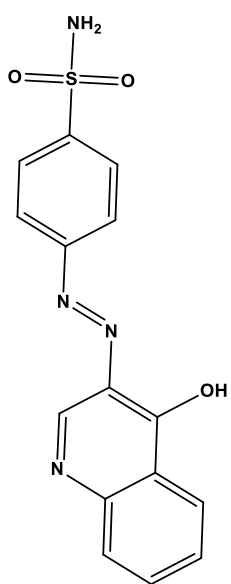
I.3.2. Préparation de l'extrait aqueux des deux plantes étudiées

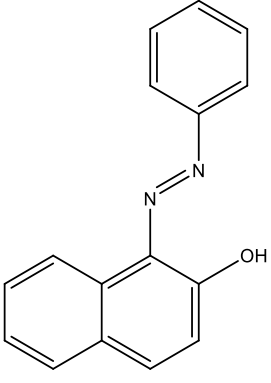
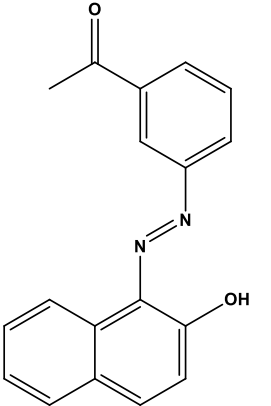
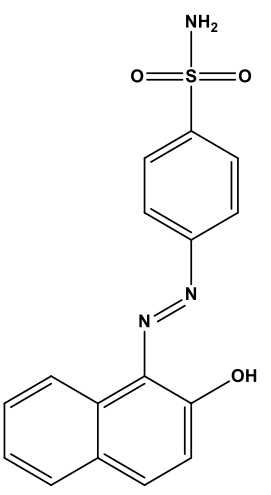
10g de la poudre est macéré dans 100 ml d'eau distillé, sous une agitation mécanique pendant 24 heures, à l'aide d'un papier filtre de type Whatman on fait la filtration.

I.3.3. Préparation des solutions méthanoliques des colorants synthétiques:

Dans cette étude on a utilisé quatre colorants qui sont présentés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Code, nomenclature, formule et structure chimique des deux colorants synthétiques (Bougueria H et al, 2013).

Colorants	Code	Nomenclature	Structure chimique
CLR 1	$\text{NH}_2\text{SO}_2 + \text{NOH}$	(E)-4-(3-quinolin-4-olazo) benzenesulfonamide	
CLR2	$\text{NH}_2 + \beta$	(E)-1-(phenylazo)-2-naphtol	

			
CLR3	3COCH ₃	(E)-1-(3-acetophenylazo)-2-naphtol	
CLR 4	NH ₂ SO ₂ +β	(E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide	

❖ **Mode opératoire**

Prendre une quantité (Fig.14) de chaque colorant, ajouter 50µl de méthanol et compléter le volume par le même solvant jusqu'à 5 ml. Puis prendre 50µl de cette solution mère et compléter le volume jusqu'à 5ml par le méthanol.

L'absorbance des quatre colorants est ensuite lue à 510 nm par un spectrophotomètre UV/visible (Bougueria H et al, 2013).

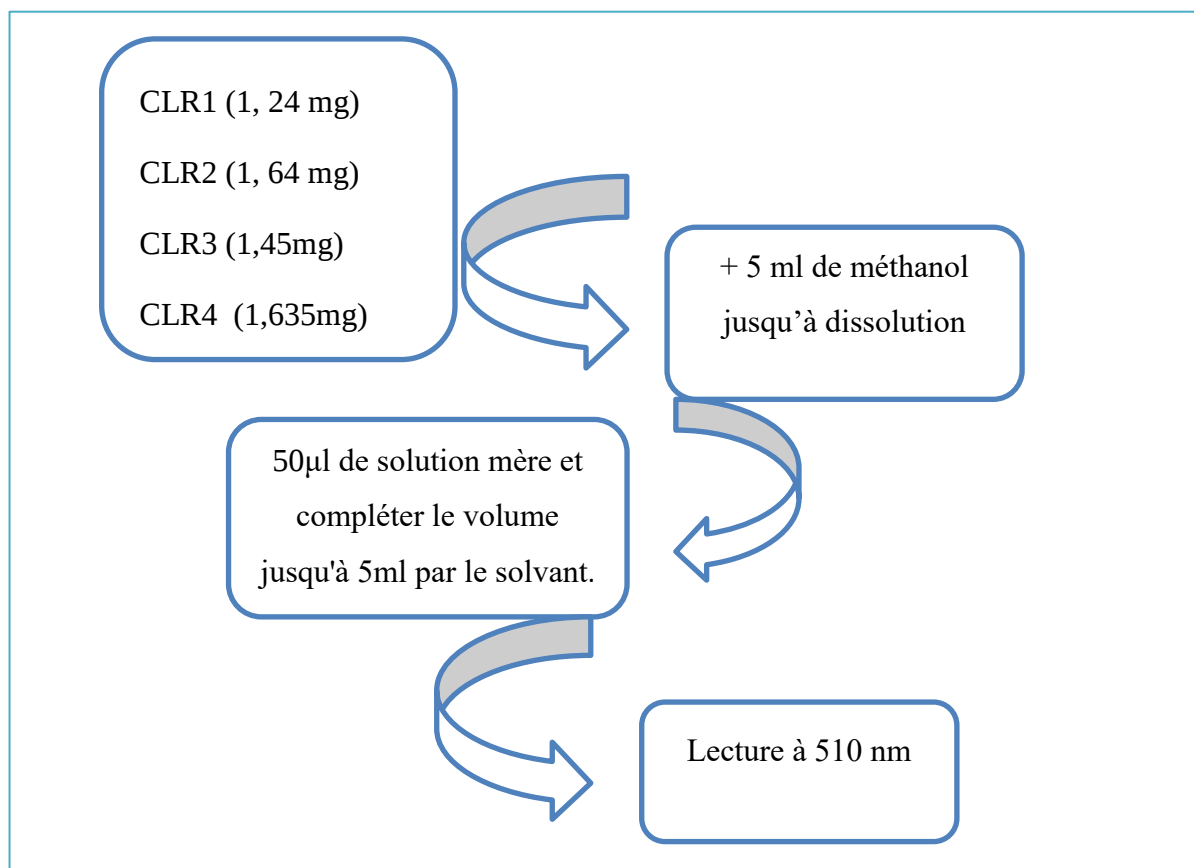


Figure 14 : Protocole de dilution des colorants (Bougueria H et al, 2013).

I.3.4. Préparation de la solution DPPH

0.004g de DPPH a été dissous dans 75 ml de la solution méthanolique (52,5 ml méthanol + 22,5ml eau distillé), La solution a été incubée à l'obscurité pendant 24h sous agitation mécanique (Fig. 15).



Figure 15: Préparation de la solution DPPH (Photo personnelle, 2021)

I.3.5. L'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux

❖ Mode opératoire

L'activité antioxydante des deux extraits : méthanolique et aqueux du *Beta vulgaris* L. et *Daucus carota* L. et les colorants synthétiques (Fig.16), ainsi que du standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évalué à l'aide d'un spectrophotomètre (annexe I).

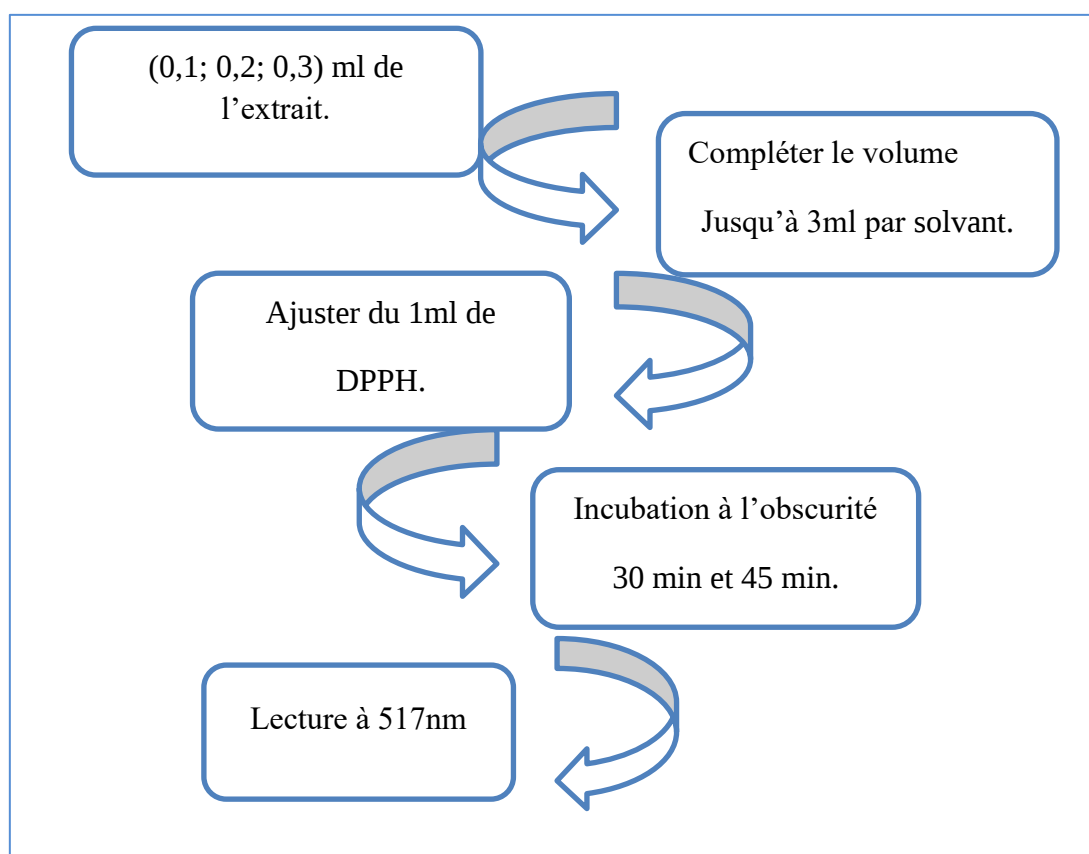


Figure 16 : Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante (Ammar et al, 2009).

I.3.6. Expression des résultats

La capacité de piégeage du radical libre est calculée à travers le pourcentage d'inhibition :

$$\left\{ \text{Le pourcentage d'inhibition} = \left\{ \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}}{\text{Abs contrôle}} \right\} \times 100 \right\}$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs contrôle: Absorbance de la solution DPPH.

Abs test : Absorbance de l'extrait.

I.3.7. Calcul des IC_{50} (EC_{50})

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC_{50} qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH.

Les IC_{50} sont calculées à partir de l'équation des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé et le standard utilisé dans l'étude ($y = ax + b$) (Bouras et Houchi, 2013), Tels que :

$y = 50\%$ (pourcentage de réduction de DPPH).

$x = IC_{50}$ (la concentration inhibitrice en extrait et de l'acide ascorbique).

Il faut rappeler que plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.

I.3.8. Méthodes d'analyses statistiques :

On a réalisé des analyses statistiques descriptives, multidimensionnelles et décisionnelles avec logiciel **SPSS** version 21 (Statistical Package for the Social Sciences) Pour chacun des paramètres étudiés (moyenne, EcartType..).

Pour tester l'effet de ces paramètres sur l'activité antioxydant des deux extraits étudiés (méthanolique et aqueux), on a procédé à une analyse de variance à deux facteurs; le seuil de signification retenu est $P < 0,05$, la comparaison des moyennes a été effectuée par le test **LSD**.

I.4. Etude de l'activité antibactérienne :

L'étude de l'activité antibactérienne in vitro a été effectuée au laboratoire des analyses médicales Dr MIROUH- Ferdjioua dans des conditions d'asepsie rigoureuses.

I.4.1. Méthode utilisée

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boîte de Pétri. L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Parekh et Chanda, 2007 ; Duraffourd et Lapraz, 2002).

I.4.2. Microorganismes utilisées

Trois souches bactériennes ont été testées : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*, ce sont des souches cliniques ramenées du laboratoire microbiologie de Dr. MIROUH.

I.4.3. Stérilisation du matériel

Le matériel (les pinces, les embouts, les tubes, les disques en papier wathman enrobés dans du papier aluminium), les solutions, et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

I.4.4. Préparation de l'inoculum bactérien

Chaque souche a été repiquée par la méthode des stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées, Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 h pour obtenir une culture jeune, on a choisi des colonies bien isolées avec une anse de platine et les transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm qui est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

I.4.5. milieux de cultures

Nous avons utilisé les milieux de cultures suivants (Annexe I) :

- Mueller Hinton (MH)
- Gélose Nutritive (GN)
- L'eau physiologique

I.4.6. Préparation des dilutions des extraits

L'extrait méthanolique de *Béta vulgaris* L. et *Daucus carota* L. et aussi les quatre colorants synthétiques sont dilués avec le diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans des tubes eppendorfs. Les concentrations des extraits sont réalisées selon les méthodes suivantes :

- Solution mère SM : 100 mg de l'extrait méthanolique /Colorants synthétiques dans 1ml de DMSO (100%)
- S_{1/2}: 0,5ml d'extrait de SM avec 0.5ml de DMSO (50%).

- $S_{1/4}$: 0.5ml d'extrait de $S_{1/2}$ avec 0.5ml de DMSO (25%).
- $S_{1/8}$: 0.5ml d'extrait de $S_{1/4}$ avec 0.5ml de DMSO (12.5%).
- $S_{1/16}$: 0.5ml d'extrait de $S_{1/8}$ avec 0.5ml de DMSO (6.25%).

I.4.7. Ensemencement et dépôt des disques

➤ Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, ensuite on a trempé un écouvillon dans la suspension bactérienne, Après l'ajustement de DO, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube, et on frotte l'écouvillon sur la surface gélosée entière à trois répétition et en tournant la boîte à 60°C après chaque application pour bien distribuer l'inoculum. Recharger l'écouvillon à chaque fois qu'on ensemence avec la même souche plusieurs boîtes. Enfin, on a écouvillonné la zone périphérique de la gélose.

Toutes les boîtes sont incubées à l'étuve à température de 37°C pendant 18-24 heures.

➤ Dépôt des disques

Des disques de papier Whatman stériles (3 mm de diamètre) stériles imprégnés de concentrations croissantes d'extraits repris avec le DMSO (10µl par disque à l'aide d'une micro pipette) ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose.

I.4.8. Lecture

La lecture des résultats a été faite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle, autour des disques.

CHAPITRE-I-
RESULTATS
ET
DISCUSSION

I. RESULTATS ET DISCUSSION

I.1. Screening Phytochimique

Les Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les deux espèces est dans le tableau suivant :

Tableau 4: Screening phytochimique de la partie aérienne des espèces étudiées.

Espèces Test chimique	<i>Daucus carota</i> L.	<i>Beta vulgaris</i> L.
Flavonoïdes	+++	++
Alcaloïde	-	+
Quinone	+++	-
Tannins	+++	-
Stérols	+++	++
Saponine	++	+++
Terpénoïdes	+++	++
Stéroïde	-	-
Anthraquinone	-	-
Glycoside	+++	-
Coumarine	-	-
Anthocyane	-	-

+++ : Forte abondant ; ++ : Présence; - : Non détecté

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur les différents extraits : aqueux, et méthanolique de *Beta vulgaris* L. ont montré la présence de plusieurs composés bioactifs : alcaloïdes, flavonoïdes, stérols, saponines, terpénoïdes alors que les Anthraquinones, glycosides et les tannins sont absents, Ces résultats s'accordent avec ceux de **Nilesh k, et abhay k (2012)** et de **Sidra Rehman et al (2020)** ; **Nidhal K. Maraie et al (2014)** ; **Lembong E(2019)**.

Concernant la plante *Daucus carota* . Les résultats du criblage phytochimique montrent une forte présence des :

Flavonoïdes, terpénoïdes, stérols, glycosides, quinones, tannins, et une présence en quantité minime, des saponines.

La présence des anthocyanes, les anthraquinones libres, coumarines, stéroïdes ne sont pas observés.

Notons enfin, l'absence totale des alcaloïdes dans cette espèce. On s'aperçoit que la présence des flavonoïdes, stéroïde, terpénoïdes, tannins, saponines, quinones, et l'absence des alcaloïdes, anthraquinone libres sont accordé avec **Ayeni EA et al (2018)**.

Contrairement à ce qui obtenu par **Almaimoune Maiga (2014)**, qui a noté une présence des alcaloïdes, et absence des saponines.

I.2. Etude de l'activité anti-oxydante :

La capacité antioxydant de l'extrait méthanolique et aqueux de *Beta vulgaris* L. et *Daucus carota* L. les quatre colorants : ((E)-1-(phenylazo)-2-naphtol)), ((E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide),((E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol), (E)-4-(2-naphtolazo)benzenesulfonamide), et le standard (acide ascorbique) testé vis-à-vis du radical DPPH a été déterminée à partir de l'IC₅₀ dans deux temps différents et avec trois dilutions.

➤ Calcul des IC₅₀

C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical de DPPH, en comparaison avec le résultat de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique. Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour les différents extraits testés sont représentées dans l'annexe II.

I.2.1.Résultats:**I.2.1.1. Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'IC₅₀**

Afin d'évaluer l'effet d'extrait et du temps sur la variable mesurée (IC₅₀), les résultats des analyses sont exposés à une analyse de variance à un facteur étudié. Les carrés moyens des écarts des paramètres mesurés sont représentés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Carrés moyens des écarts des moyens des paramètres mesurés sur IC₅₀

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	26,054 ^a	15	1,737	9,435	0,000 ^{**}
Ordonnée à l'origine	111,090	1	111,090	603,444	0,000 ^{**}
Extrait	22,328	7	3,190	17,327	0,000 ^{**}
Temps	1,293	1	1,293	7,026	0,012 [*]
Extrait * Temps	2,433	7	0,348	1,888	0,104 ^{ns}
Erreur	5,891	32	0,184		
Total	143,035	48			
Total corrigé	31,945	47			

a. R deux = 0,816 (R deux ajusté = 0,729)

^{**} La corrélation est hautement significative à $p \leq 0,01$,

^{*} La corrélation est significative à $p < 0,05$

^{ns} La corrélation est non significative à $p \geq 0,05$

À la lumière des résultats présentés dans le tableau on enregistre un effet extrait très hautement significatif à $p \leq 0,01$ sur la concentration nécessaire en extrait pour réduire 50% du radical DPPH et un effet non significatives à $p \geq 0,05$ pour les deux autres paramètres (Extrait * Temps). et un effet significatives à $p < 0,05$ pour le paramètre (Temps).

I.2.1.2. Effet extrait sur l'IC₅₀

Les résultats liés à ce paramètre montrent que les valeurs d'IC₅₀ se différencient d'un extrait à l'autre. La comparaison des moyennes basée sur le test LSD indique que l'extrait méthanolique et aqueux de *Beta vulgaris* L. le colorant 2 et le colorant 4 forment un groupe très similaire, qui se caractérise par une activité antioxydante moyenne avec une valeur d'IC₅₀ de 1.64mg/ml et 1.63mg/ml 1.74mg/ml respectivement.

Le colorant 1 et le colorant 4 ainsi que l'extrait méthanolique et aqueux de *Beta vulgaris* L. forment un groupe similaire avec une valeur d'IC₅₀ de 0.88 mg/ml, 1.74 mg/ml, 1.64mg/ml et 1.63mg/ml respectivement.

L'extrait méthanolique de *Daucus carota* L. et le colorant 3 forment un groupe similaire qui se caractérise par la plus faible activité antioxydante avec une valeur moyenne d'IC₅₀ 2.22mg/ml et 2.48 mg/ml respectivement.

Alors que l'ASC marque la valeur la plus petite d'IC₅₀ enregistrant ainsi une moyenne de 0,002 mg/ml (**Tableau 6**) ce qui traduit une importante activité antioxydante.

Tableau 6 : Effet extrait sur IC₅₀.

		IC ₅₀			
		Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
Extrait	EXM BV	1,64 ^a	0,38	2,13	1,20
	EXA BV	1,40 ^a	0,56	2,10	0,66
	EXM DC	2,22 ^b	0,69	3,01	1,44
	EXA DC	0,18 ^e	0,10	0,34	0,06
	CLR1	0,88 ^d	0,35	1,39	0,56
	CLR2	1,63 ^a	0,64	2,40	0,78
	CLR3	2,48 ^b	0,61	3,53	1,82
	CLR4	1,74 ^a	0,29	2,19	1,34
	ASC	0.002 ^e	0.002	0.002	0.002

CLR1: (E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide , **CLR2:** (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol, **CLR3:** (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol, **CLR4:** (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide.

I.2.1.3. Effet temps sur l'AAO

La concentration inhibitrice la plus élevée est enregistrée dans le temps 30 min avec une valeur moyenne de 1,69 et la plus faible valeur d'IC₅₀ est enregistrée dans le temps 45min avec une valeur moyenne de 1,36. (Tableau 7) :

Tableau 7 : Effet Temps sur IC₅₀

		IC ₅₀			
		Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
Temps	30min	1,69	0,96	3,53	0,12
	45min	1,36	0,65	2,54	0,06

I.2.1.4. Effet interaction extrait /temps sur IC₅₀ (Tableau 8)

Tableau 8 : Effet interaction extrait /temps sur IC₅₀

				IC ₅₀			
				Moyenn e	Ecart- type	Maximu m	Minimum
Temps	30min	Extrait	EXM BV	1,67 ^a	0,44	2,13	1,26
			EXA BV	1,49 ^a	0,74	2,10	0,66
			EXM DC	2,57 ^b	0,69	3,01	1,78
			EXA DC	0,21 ^c	0,11	0,34	0,12
			CLR 1	0,61 ^c	0,07	0,69	0,56
			CLR 2	2,04	0,32	2,40	1,77
			CLR 3	2,93 ^b	0,52	3,53	2,62
			CLR 4	1,96 ^d	0,20	2,19	1,81
	45min	Extrait	EXM BV	1,60	0,40	2,00	1,20
			EXA BV	1,32	0,45	1,83	1,00
			EXM DC	1,87	0,59	2,54	1,44
			EXA DC	0,14	0,10	0,26	0,06
			CLR 1	1,15	0,27	1,39	0,85
			CLR 2	1,22	0,64	1,95	0,78

			CLR 3	2,04 ^d	0,25	2,31	1,82
			CLR 4	1,53	0,16	1,62	1,34

- Dans le temps 30 min :

L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de *Beta vulgaris* L. englobe un groupe moins importants avec des valeurs moyenne de 1,67 mg/ml et 1,49 mg/ml respectivement par rapport au standard ASC (acide ascorbique).

L'extrait aqueux du *Daucus carota* L. et le colorant 1 présentent un groupe important avec des valeurs 0,21 mg/ml et 0.61 mg/ml.

Le colorant 2 et 4 englobe un groupe moins important avec des valeurs de 2,04 mg/ml et 1,96 mg/ml respectivement, suivi par un groupe faible qui rassemble le colorant 3 et l'extrait méthanolique de *Daucus carota* L. avec des valeurs de 2,93mg /ml et 2,57 mg/ml. (Tableau 8).

I.2.1.Discussion

La valeur d'IC₅₀ est liée à la capacité antioxydant d'un composé, plus l'IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydant d'un composé est élevée (Villaño et al, 2007).

L'extrait méthanolique de *Daucus carota* L. possède une faible capacité antioxydants avec une valeur moyenne d'IC₅₀ (2,22 mg/ml). Contrairement à l'extrait aqueux qui a une forte AAO avec une valeur d'IC₅₀ (0.18 mg/ml).

Les résultats de l'effet de différent paramètre étudiés sur le pouvoir antioxydant des extraits étudiés, montrent que *Daucus carota* L. présente une AAO faible à celle de l'ASC qui démontre une IC₅₀% de 0,002mg/ml.

Laterche et chababne, (2020) ont trouvés que l'extrait aqueux de *D.carota* L. a une capacité antioxydant très importante. Ces résultats sont en accord avec nos résultats de l'extrait aqueux.

Ayeni EA et al, (2018) ont trouvent une forte activité de l'extrait méthanoliques, Ces résultats peuvent être considérés comme très élève comparativement à celui que nous avons obtenu.

Pour les résultats de l'activité antioxydant de *Beta vulgaris* L. obtenu, l'extrait aqueux et méthanolique a une faible AAO avec une valeur d'IC₅₀ (1.40 mg/ml ; 1.64mg/ml,) respectivement.

Edziri.H et al, (2019) ; montre que l'extrait méthanolique de *BV* a une forte activité.

Sheila J et al, (2017) ont trouvé que L'extrait méthanolique de betterave (*Beta vulgaris* L), a montré une puissante activité de piégeage des radicaux libres.

Une étude de **Saani M et al, (2017)** ont trouvé que l'EXM BV a une forte AAO de IC₅₀ de 0.128mg/ml.

Les pigments bétalaïne ont récemment été classés comme une classe d'antioxydants. De nombreuses études de recherche publiées montrent que la forte propriété antioxydant de la betterave, attribuées à ses composés phénoliques. (**Kapur et al., 2012**)

Dans une autre étude in vitro, un extrait éthanolique de *B. vulgaris* L. a été testé pour sa capacité antioxydante en utilisant la méthode de piégeage des radicaux DPPH avec les résultats comparés à l'acide ascorbique comme standard de référence. Les résultats ont révélé la plus haute capacité antioxydante (90,9%) à des concentrations de 500 et 1000 µg/ml (**El Gamal et al, 2014**).

Pour les quatre colorants synthétiques étudiés dans ce travail nos résultats de l'activité antioxydante proche a qui se trouve par (**BOUKERIA S et al**), (**BOUGEURIA H.et al**).

I.3. Etude de l'activité antibactérienne

Nous avons testé l'action des extraits méthanolique de deux espèces : *Beta vulgaris* L. *Daucus carota* L. et de quatre colorants synthétiques : ((E)-1-(phenylazo)-2-naphtol)), ((E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide)) ,((E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol), (E)-4-(2-naphtolazo)benzenesulfonamide), vis-à-vis de trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*.

I.3.1. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits des deux espèces

L'extrait méthanolique de chacune de deux espèces n'a aucun effet à l'encontre des souches bactériennes testées. On remarque aussi l'absence de pouvoir inhibiteur du témoin négative (DMSO).

Les résultats de l'activité antibactérienne d'extraits issus de la plante *Daucus carota* L. et la plantes *Beta vulgaris* L. sont représentés successivement dans le tableau(9).

Tableau 9: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique en utilisant la méthode de diffusion du disque.

		Concentration de plante pour l'extrait méthanolique en (mg/ml)					
Extrait méthanolique	Souche bactérienne	Diamètres d'inhibition en mm	50	25	12.5	6.25	DMSO
<i>Daucus carota</i>	<i>E. coli</i>		—	—	—	—	—
	<i>P. aeruginosa</i>		—	—	—	—	—
	<i>Streptococcus</i>		—	—	—	—	—
<i>Beta vulgaris</i>	<i>E. coli</i>		—	—	—	—	—
	<i>P. aeruginosa</i>		—	—	—	—	—
	<i>Streptococcus</i>		—	—	—	—	—

Légende : (-) Non sensible (+) Sensible (++) Très sensible

Les résultats de l'AAB de l'extrait méthanolique pour les deux plantes montrent qu'il n'y a aucune zone d'inhibition autour des disques des souches testées avec toutes les concentrations préparées (Fig. 17) et (Fig. 18).

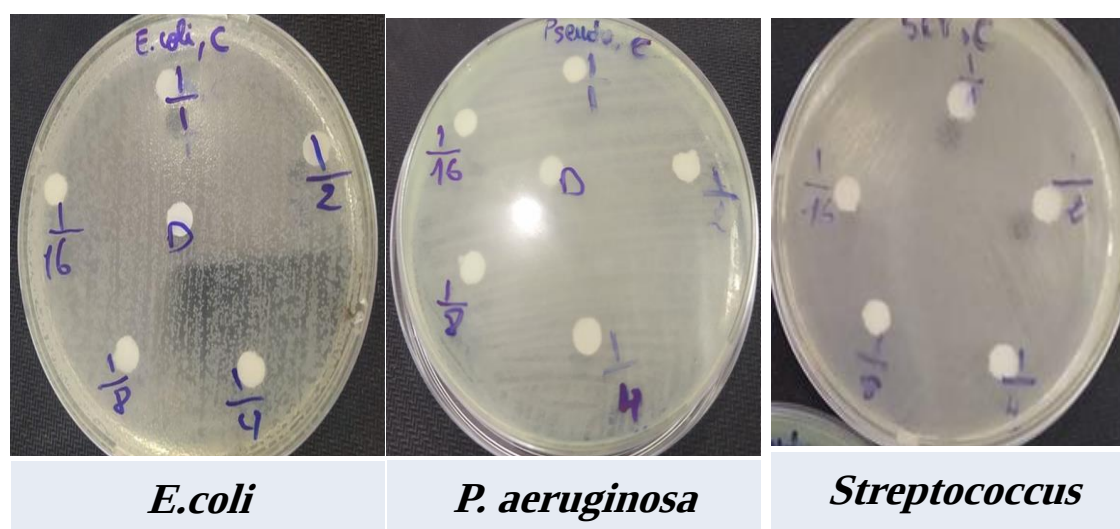


Figure 17 : Effet de l'extrait méthanolique de *Daucus carota* L. sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

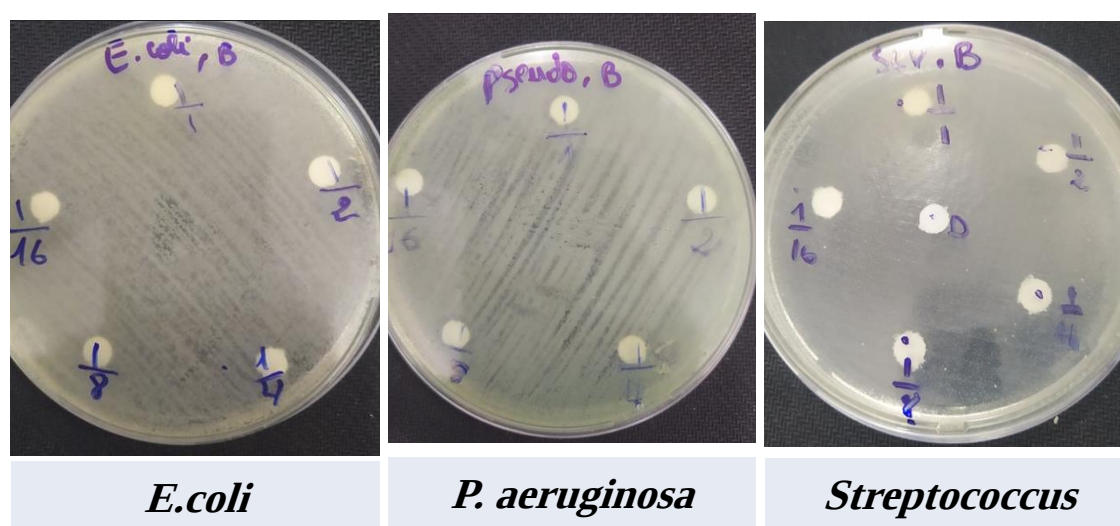


Figure 18 : Effet de l'extrait méthanolique de *Beta vulgaris* L. sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

I.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne des colorants synthétique (azoïques)

L'effet des différentes dilutions de l'extrait des quatre colorants synthétiques vis-à-vis les souches testées est représenté dans le tableau (10).

Tableau 10: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de 04 colorants en utilisant la méthode de diffusion de disque :

	CLR1				CLR2				CLR3				CLR4			
Bactéries	50	25	12.5	6.25	50	25	12.5	6.25	50	25	12.5	6.25	50	25	12.5	6.25
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CLR1: (E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide, **CLR2 :** (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol, **CLR3:** (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol, **CLR4:** (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide.

Selon les résultats enregistrés (Tableau 10), nous ne soulignons que les colorants :

CLR1 (Fig.19) ; CLR2 (Fig.20); et le CLR 4 (Fig.22) ne présentent aucun effet sur les bactéries testées.

On observe une activité sur *E. coli* du CLR 3 dans la concentration 25 (mg/ml), avec un diamètre de zone d'inhibition de 12mm (Fig.21).

➤ **Colorant (E)-4-(3-quinolin-4 olazo) benzenesulfonamide**

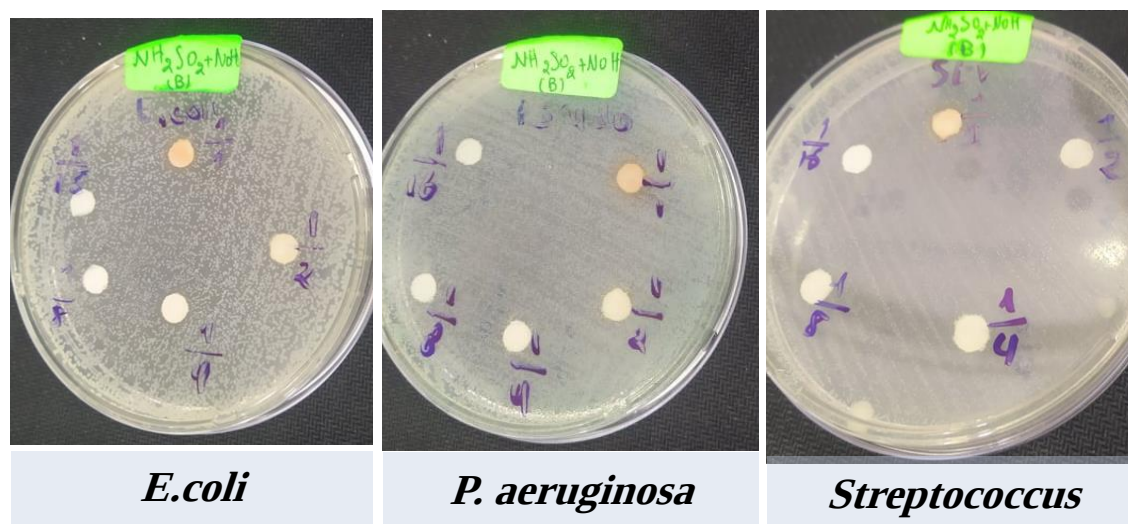


Figure19: Effet de l'extrait de CLR1 sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

➤ Colorant (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol

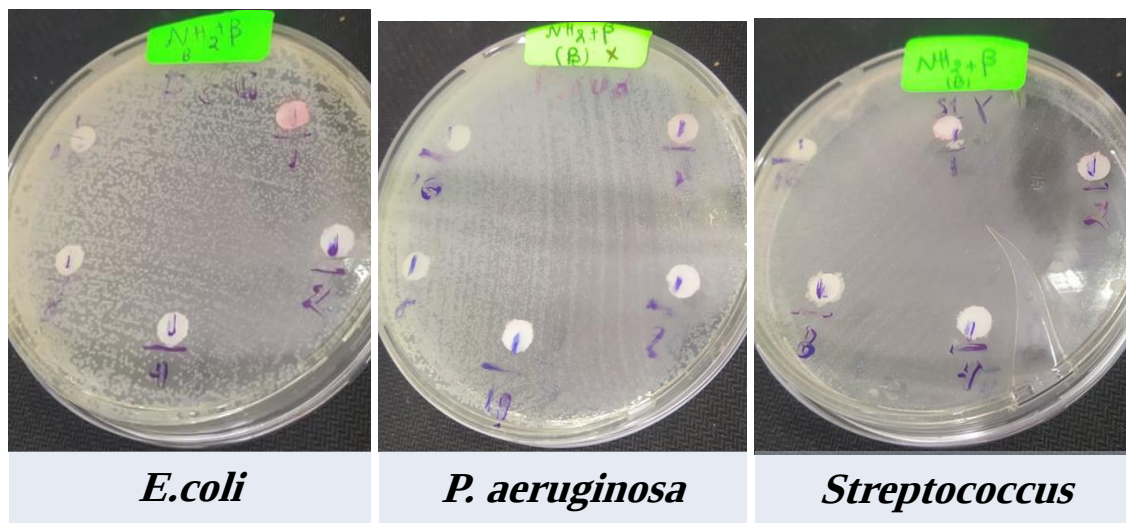


Figure 20: Effet de l'extrait de CLR2 sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

➤ Colorant (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol

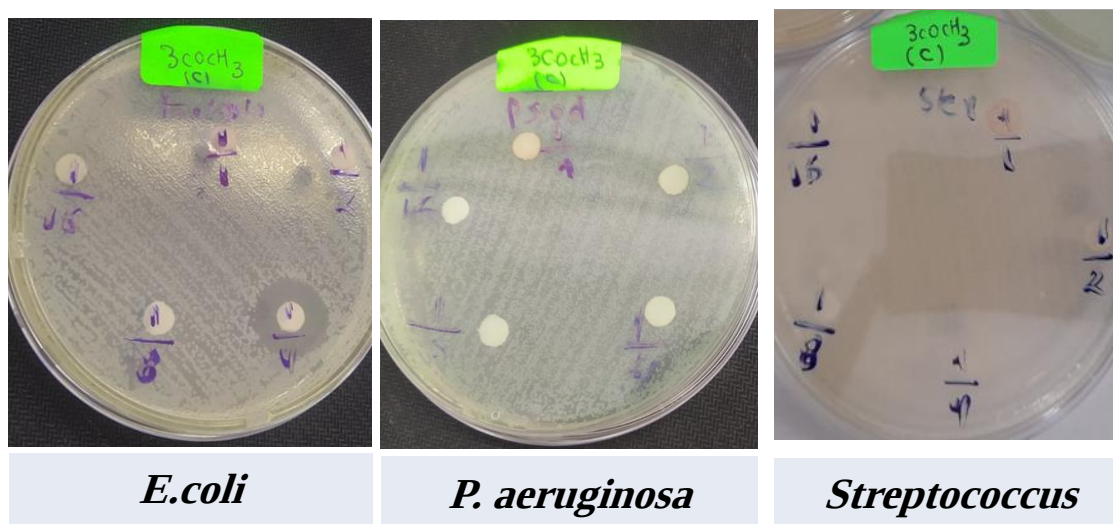


Figure21 : Effet de l'extrait de CLR3 sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

➤ Colorant (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide

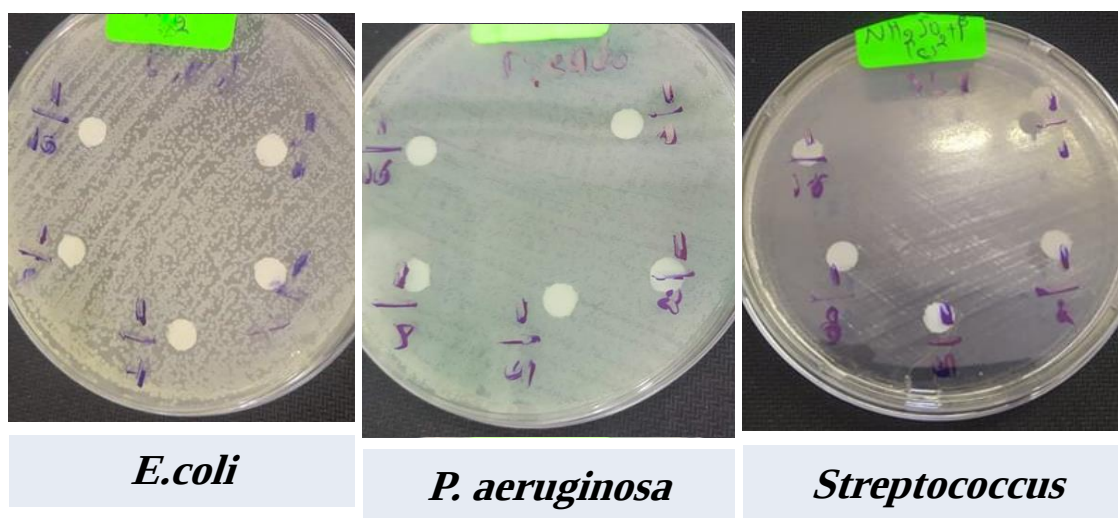


Figure22: Effet de l'extrait de CLR4 sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2021).

I.3.3. Discussion:

L'activité antibactérienne de *Daucus carota* L. montre que l'extrait méthanolique n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,). Ces résultats se corroborent avec ceux de (Ayachi, 2014) et (Latreche et Chaabane, 2020).

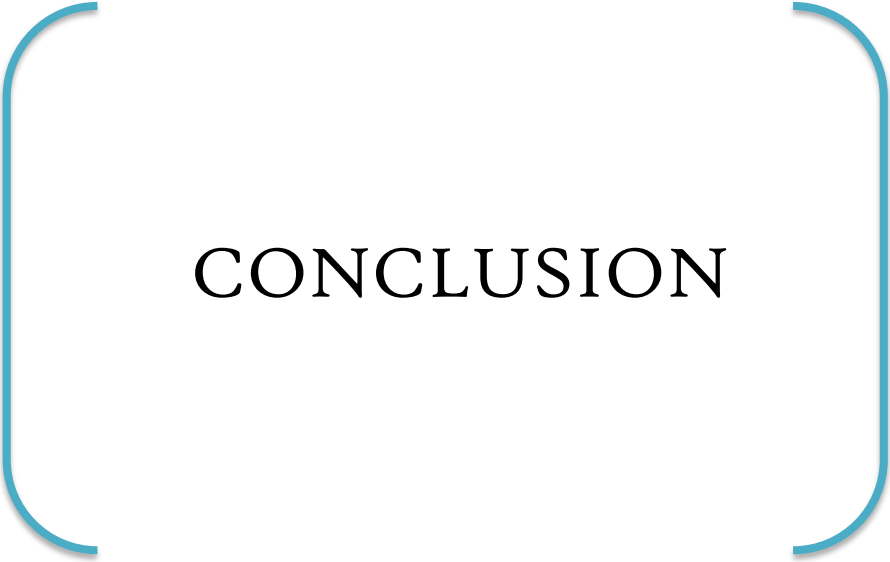
Pour l'espèce *Beta vulgaris* L. Rauha et al, (2000) ont testés l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoliques de *B. vulgaris* L. Et ils n'ont observés qu'une faible activité à l'encontre de l'*Escherichia coli*.

Koochak et al(2010) ont testés l'AAB de l'extrait éthanolique de *B. vulgaris* L. et ils ont rapportés que l'extrait ne possédait pas d'activité inhibitrice.

Sheila J et al, (2017) ont trouvés un effet inhibiteur maximale dans l'extrait méthanolique se qui trouve très controversé à nos résultats.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'absence des principes actifs doués d'une activité antibactérienne. La membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries à gram négatif constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (Kebili, 2016), l'utilisation des souches cliniques (résistantes) ou encore les condition de travail.

Pour les quatre colorants synthétiques étudiés dans ce travail nos résultats sont considérés comme premières de ce genre, parce que l'étude de l'activité antibactérienne de ces quatre colorants n'a jamais fait l'objet d'une publication.



CONCLUSION

CONCLUSION

Ce travail est réalisé au Laboratoire de centre universitaire Abdelhafid Boussof-Mila, et laboratoire d'Analyse DR.Mirouh dans le cadre de la valorisation des substances naturelles.

L'objectif principal a porté sur l'étude phytochimique de deux espèces *Beta vulgaris* L. et *Daucus carotta* L.

Sachant que l'étude bibliographique réalisée a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique ou biologique sur ces espèces.

Dans une première partie, le screening phytochimique effectué, nous a permis de mettre en évidence que :

- Ces plantes sont riches en flavonoïdes, saponosides, stéroles et terpénoides.
- Elles sont dépourvues de stéroïde, anthraquinone libres, coumarines, et anthocyanes.

Ces substances généralement responsables de certains Activités biologique des extraits des plantes.

Dans une deuxième partie, l'évaluation de la capacité antioxydant a été déterminée en utilisant le DPPH.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antibactérienne, en utilisant la méthode de diffusion du disque indiquent que l'extrait méthanolique de deux espèces et les colorants synthétiques ne possèdent pas une activité antibactérienne sauf le colorant (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol qui a une activité sur *Escherichia coli* dans la concentration 25 (mg/ml), avec un diamètre de zone d'inhibition de 12mm.

Cette étude confirme bien la concordance entre l'activité antibactérienne et l'activité antioxydant. Sur l'ensemble des résultats obtenus, on pourrait conclure que ces plantes peuvent être des sources naturelles de composés antioxydants et antibactérienne.

Pour la suite, Il est souhaitable de mener une étude plus approfondie pour isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces différentes propriétés et afin d'évaluer d'autres activités biologiques in vitro et in vivo de chacun de ces composés pris séparément.

A pair of large, light blue, rounded square brackets framing the text.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abderrazak, M., Joël, R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177
- **Abou-chaar, C.I., Shamlan, S. N. (1980).** A chromatographic study of the anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction, Isolation and Identification of the Aglycones. *Pharm. Biol.*, 18: 49-55.
- **Abouzaid A., (2001).** Etude de différents traitements des effluents de l'industrie textile. Thèse de Doctorat, Université Chouaib Doukkali, Maroc, p52-62.
- **Afaq, F. et Malik, A. (2005).** Pomegranate Fruit Extract Modulates UV-B-mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal Human Epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*, 81 (1): 38-45.
- **Ahmad H, Afzal M , Saleem M, S.M., (1995).** Hassany, *Adsorp. Sci. Technol.* 12-139-149.
- **Almaïmoune MAÏGA, M.(2014).** Etude de la chimie et des activités biologiques de six (6) plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète : *Allium cepa*; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena*, Thèse de doctorat de USTTB, 07 mars 2014.
- **Ammar R. B, Bhouri W, Sghaier M. B, Boubaker J, Skandrani I, Neffati A, Bouhlel L, Kilani S, Mariotte A. M, Chekir-Ghedira L, Dijoux-Franca M. G. D. And Ghedira K., (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chem*; 116: 258-264
- **Arumuganathan K, Earle E. (1991):** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218 pp.
- **Aurore Antmann (2008),** Comment extraire un colorant d'un aliment, Atelier Sciences et Cuisine, sciences physiques, Fiche n°2.
- **Ayachi A.N.B., (2014).** Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus* (*D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota* ssp *hispanicus*) de la région de

Tlemcen. Thèse de Doctorat en Sciences en Chimie organique appliquée. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen, p: 262.

- **Ayeni EA, Ahmed A, Ibrahim G, Vallada A, Muhammad Z. (2018).** Phytochemical, nutraceutical and antioxidant studies of the aerial parts of *Daucus carota* L. (Apiaceae). *J Herbmec Pharmacol*.7 (2):68-73. doi: 10.15171/jhp.2018.12

B

- **Bach D., Mascre M., Deysson G., (1979).** Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris, pp : 529
- **Bahorun, T., (1997).** Substances Naturelles actives : La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food. Agr. Res. Coun, Réduit. Mauritius*, p 83.
- **Bamforth, C.W. (2000).** Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew.*, 106: 229-38
- **Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *comments on toxicology*. 9 : 5-21.
- **Batra N., DEVI J. (2015).** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 7; 2; 183.
- **Batzias F A, Sidiras D.K., (2007).** Dye adsorption by prehydrolysed beech sawdust in Batch and fixed-bed systems. *Bioresour. Technol*, 98-1208-1217.
- **Bayoud, B. Mémoire de magister. (2005).** Etude phytochimique et extraction améliorée des alcaloïdes tropaniques du *Datura stramonium* L. Solanaceae. UBMA.
- **Botineau M. (2010) :** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc, Paris, 13-35 pp
- **Bouguer H, Benosmane A, Benaouida M A, A Bouchoul and S Bouaoud., (2013).** Organic compounds. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports* ISSN 1600-5368.p1
- **Bouguer H. ,(2007).** mémoire de magister en chimie université Mentouri Constantine.

- **Bouras F., Houchi A. (2013).** Etude de l'activité antioxydant de la plante *Rumex Vesicarius* L. Mémoire master académique, 28p
- **Bouvet .A .**Centre National de Référence des Streptocoques, Hôtel Dieu, Université Paris VI.
- **Bouvier, F., Rahier, A. et al. (2005).**Biogenesis, molecular regulation and function of plant Isoprenoids. Prog. *Lipid Res.*, 44, 357-429
- **Boyd B. et al, Ford C. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. Glycoscience & Nutrition, Vol.4, p. 7.
- **Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie: phytochimie-plantes médicinales, 2°.éd. tec. Et doc. Lavoisier, Paris, 491p.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3eme édition, Tec et Doc. Paris, p : 227-310-311-366.
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie: phytochimie. plantes médicinales. 4ème édition. Tech. Et Doc Lavoisier, Paris. Calixto, J.B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *J. of Ethnophar.*, 100: 131-134.

C

- **Cao G., Sofic E. et Prior R. L., (1998).** Antioxidant capacity of tea and common vegetables. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 44 : 3426-3431.
- **Chaux C, Foury C. (1994).** Productions légumières - Tome 2 : Légumes feuilles, tiges, fleurs, racines, bulbes. Éditions Tec & Doc, Paris, 639 p.
- **Chetibi Ch ,Diab S,** Etude de l'activité biologique in vitro et in vivo des extraits Méthanolique et Aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus*, Biochimie Moléculaire et Santé, 2016
- **Chevallier A., (1996).** The Engcyclopedia of medicinal plants; New Yourk. Dk., P: 336. Collin, S & Crouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à

l'agroalimentaire. Paris, France : Lavoisier Tec&Doc.

- **Compagnon P.** La betterave [Internet]. La Gazette Bio. 2018 [cité 17 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.lagazettebio.fr/la-betterave/>
- **Cuendet, M. (1999).** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) *Campanula barbata* (Campanulaceae). Université de Lausanne. Thèse de doctorat, p 24

D

- **Dacosta, Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs, Ed Yves Dacosta, Paris, 317 p.
- **Damodaran S, Parkin KL, (2007).** Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition. Taylor & Francis. 1160 p.
- **De Groot H., (1998).** Comment les caroténoïdes protègent du cancer. Tabula. 3:10-11.
- **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.
- **Desoille H., Scherrer J., Truhauter R., (1987).** Précis de médecine du travail, 5ème Edition Masson, p838-845.
- **Diallo D., (2000).** Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Azooceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Minosaceae), *Trichilia emetic* (Meliaceae). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse.
- **Djemoui Dj.,(2012).** Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- **Doré C. et Varoquaux F., (2006) :** Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Éditions Quae, pp: 185.

- **Downie S. R., et Katz-Downie D. S., (1996).** A Molecular Phylogeny of Apiaceae Subfamily Apioideae: Evidence from Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *American Journal of Botany* 83: 234-251
- **Duraffourd, C., Lapraz. (2002).** Traité de phytothérapie clinique. Endobiogénie et médecine. Edition Masson, Paris.

E

- **Eberhard T, Robert A, Annelise L., (2005).** Plantes aromatique, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- **Ekoumou, Coene., (2003)** .Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite. Thèse, Pharmacie, FMPOS, Bamako, n° 14, 145 p.
- **Elmeskini, M. Kamal. (2011).** Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat Université Mohammed V – Rabat, P : 4.
- **Emerenciano, V. P., Barbosa, K.O., Scotti, M.T., Ferriro, M.J.P. (2007).** Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *J. of braz. Chem. Soci.*, 18 (5): 891-899.
- **El Gamal, A.A., Al Said, M.S., Raish, M., Al-Sohaibani, M., Al-Massarani, S.M., Ahmad, A., Hefnawy, M., Al-Yahya, M.A., Basoudan, O., Rafatullah, S., (2014).** Beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–12.
- **Edziri H, Jaziri R , Haddad O , Anthonissen R, Aouni M, Mastouri , Vershaeve L (2019),** Phytochemical analysis, antioxidant, anticoagulant and in vitro toxicity and genotoxicity testing of methanolic and juice extracts of *Beta vulgaris* L. *South African Journal of Botany* 126 (2019) 170–175.

F

- **Favier A., (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique*. 108-117.

G

- **Gonzalez, A.G., Estevez-Braun, A. (1997).** Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : 465-475.
- **Griffiths J.,(1984).** Developments in the light absorption properties of dyes—color and photochemical reaction. In: *Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes*. Society of Chemistry Industry, Oxford, pp 1-30.
- **Grubben GJH.** Légumes. PROTA; 2004. 739 p
- **Guignard, J.L. (1996).** Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson, Paris, 160 p.
- **Guignard, J.L.(2000)** .Biochimie Végétale, Dunod, Paris, 2émeédition, Pp: 171-172- 173-174-203-204
- **Guindo M., (2019)** Contribution à la détermination des éléments de contrôle de qualité botanique et phytochimique de quatre plantes du Mali, sources de colorants utilisés dans les formulations médicamenteuses, Thèse de doctorats, p1 ; 50-55
- **Gurib-Fakim, A. (2006).** Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine. Med. Plan.*, 27:1-93.

H

- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007).** Stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62: 10: 628-638.

- **Harborne .J.B, (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- **Harborne, J.B. (1997).** Recent advances in chemical ecology. Nat Prod Rep, 14: 83-98.
- **Harrar A.,(2012).** Mémoire de magister, SETIF.
- **Hemingway, R.W. (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
- **Hibiscus sabdariffa,(2019).** Plant Use Français [Internet]. [Cité 20 juin 2019]. Disponible sur: [https://uses.plantnetproject.org/fr/Hibiscus_sabdariffa_\(PROTA\)](https://uses.plantnetproject.org/fr/Hibiscus_sabdariffa_(PROTA)).
- **Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris, Pp: 138-139-140 -267- 278-514.

K

- **Kanoun Kha., (2011).**Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Thèse Magister. Tlemcen: Université Abou bekr Belkaid118 p.
- **Kebili Z., (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Biologie. Université des KASDI MERBAH .Ouargla, p: 116.
- **Kening, Y., Vincenzo, D.L., Normand, B. (1995).** Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the subsceptibility of potato to *Phytophthora infestans*.The plant. cell., 7:1787-1799.
- **Koca N, Burdurlu H. S, Karadeniz F., (2007).** Kinetics of colour changes in dehydrated carrots. Journal of Food Engineering 78: 449-455.
- **Koechlin-Ramonatxo, C. ,(2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant

supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutr. Clin. Et Métab., 20, 165-177.

- **Koockak H, Seyyednejad SM, Motamedi H.,(2010).** Preliminary study on the anti-microbial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). Asian Pac. J. Trop. Med. ; 3:180-184.
- **Kuramoto, Y., Yamada, K., Tsuruta, O. et Sugano, M. 1996.** Effect of natural food colorings on immunoglobulin production in vitro by rat spleen lymphocytes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:1712-1713.
- **Kapur, A.N., Sati, S.A., Ranjan, A.S., Gupta, P.R., (2012).** Screening methanolic extracts of beta vulgaris roots for photoprotective activity. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 4, 124–127.

L

- **Latreche O ,Chaabane N,(2020).** Etude in vitro de l'activité biologique de *Daucus carota* L. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED,p 68.
- **Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O. et al (2001)** .Stress oxydant et pathologies humaines. Press Med. 30 : 1076-1081.
- **Lembong E et al ,2019 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 306 01201**
- **Lobstein, A. (2010).** Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
- **Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta. Biol. Szegedensis, 1-4: 119-125.
- **Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G. (2002).** Botanique 3ème Ed. Technique et documentation.Lavoisier Paris. 211.

M

- **Macheix , J.J., Fleuriet , A., Jay-Allemand , C. (2005).** Phenolic Compounds plants: An example of secondary metabolites of economic

- importance. Ed. Polytechnic and university romandes presses, Lausanne, Italie, 192 P.
- **Macheix J J, Fleurit A, Allemand Ch. (2005).** Les composés phénolique des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechnique et universitaire romandes, CH-Lausanne, Italie, p1.
 - **Male Éev, D.É., Kuntiç, V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72:921-939.
 - **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy, C., Jiménez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79(5), 727 – 747.
 - **Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides, thèse de doctorat, Limoges
 - **Marouf, A., Reynaud, J. (2007).** La botanique de A à Z .DUNOD, paris, p : 9-20-176- 177.
 - **Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51: 304-315.
 - **Medic M.S., Ivona J., Asja S.B. ,Mornar A., (2004).** Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *CroaticaChemica Acta* 77:361-366.
 - **Medkour M et Gasmi k, (2017).** Investigation autour d'une chaîne logistique agroalimentaire cas de la betterave. Université Abou-Bekr Belkaïd ,Tlemcen. P20-21.
 - **Memelink J., Verpoort R., et Kigine J. W., (2001).** Organisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism
 - **Mibindzou Mouellet A., (2004).** Screening photochimique de deux espèces de plantes *Crotalaria retusa* L (papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegr. (rubiceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali, 58 p.
 - **Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A. (1996.)** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*,

384(3): 240-242

- **Mogode D, (2005).** « Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad » .Université de Bamako.
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211.
- **Monsieur B., (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex : (*Combretaceae*). Mémoire Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat). Université de Bamako. Mali. P: 141.
 - **Memelink J., Verpoort R., et Kigine J. W., (2001).** Organisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

N

- **Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2000).** The influence of natural products, upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep*, 17: 215-234.
- **Nicklin, J., Graeme-cook, K., Paget, T., Killington, R. (2000).** L'essentiel en Microbiologie, Paris, Berti édition.
- **Nicola M., et Daniel C. (1998).** Activité technologiques en microbiologie- Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine - Bordeaux, 152p
- **Nicolle C., Cardinault N., Aprikian O., Busserolles J., Grolier P., Rock E., Demigné C., Mazur A., Scalbert A., Amouroux P. et Rémésy C., (2003).** Effect of carrot intake on cholesterol metabolism and on antioxidant status in cholesterol-fed rat. *European Journal of Nutrition*. 42 (5): 254-261.
- **Nidhal K. Maraie, Thukaa Z. Abdul-Jalil, Anas T. Alhamdany, Hassan A. Janabi, (2014).** phytochemical study of the iraqi *Beta vulgaris* Leaves and its clinical applications for the Treatment of different dermatological diseases, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 3, Issue 8.
- **Nilesh K. Jain , Abhay K. Singhai ,(2012).** Department of Pharmaceutical Sciences, Dr. Hari Singh Gour Vishwavidyalaya, Sagar 470003, M.P., India,

Vol. 69 No. 5 pp. 945-950.

- **Norseth T., (1981).** The carcinogenicity of chromium, Environ. Health prespect, Vol 15,p 255-270.

O

- **Ozenda, P., (1991).** Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris.

P

- **Parekh J, Chanda V.(2008).** Antibacterial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of 34 Indian Medicinal Plants against Some *Staphylococcus* Species. Turk. J. Biol. ; 32:63-71.
- **Parekh, J., Chanda, S.V. (2007).** In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant, Turk. J. Biol., 31(1), 53- 58.
- **Pelletier, E., Campbell, P. G. C., Denizeau, F. (2004).** Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Edition PUQ, p 182.
- **Percival SL, (2004).** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.
- **Philippon A. (1995) .**Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* **10** : 619-630.
- **Pibiri M., (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de Lausanne, p: 161.
- **Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod., 63, (7), 1035-42.
- **Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. of Agric. and Food Chem.*, 53(10): 4290-430.

R

- **Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala, T. et al.(2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extract containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J.Food Microbiol. 56: 3-12.
- **Reduron J.-P. (2007)** : Ombellifères de France - tome 2 (Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest, 27). Société Botanique du Centre-Ouest, 564 pp
- **Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, (2009).** Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical. 888 p.

S

- **Sandrine L., (2004).** Lyon ; Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de Légumineuses. Thèse de doctorat.
- **Shahidi F. (1997).** Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications, Ed aocs mission statement. 174-197.
- **Sheila John, Sarah Jane Monica, Priyadarshini S, Sivaraj C, Arumugam P,(2017).**Antioxidant and Antibacterial Activities of *Beta vulgaris* L. Peel Extracts. Int J Pharma Res Health Sci. 2017; 5 (6): 1974-79
- **Sidra Rehman , Shifa Shah , Azeem Mehmood Butt , Shahid Masood Shah , Zahra Jabeen , Amjad Nadeem, (2020).** Biochemical Profiling and Elucidation of Biological Activities of Beta vulgaris L. Leaves and Roots Extracts, Saudi Journal of Biological Sciences 28 (2021) 592–602
- **Simont G. (1982).** Guide des techniques de l'ennoblissement textile. Chapitre 11, édition industrie textile.
- **Steven, P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp: 71-132

- **Stintzing FC, Carle R. (2004).** Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Technol.* 15(1):19–38.
- **Šuleková M, Smrčová M, Hudák A, Heželová M, Fedorová M.,(2017).**Organic colouring agents in the pharmaceutical industry. *Folia Vet.* 61(3):32–46.
- **Saani M, Lawrence R, Lawrence k (2018)** .Evaluation of pigments from methanolic extract of *Tagetes erecta* and *Beta vulgaris* as antioxidant and antibacterial agent, *Natural Product Research*, 32:10, 1208-1211, DOI: 10.1080/14786419.2017.1326037.

T

- **Thomas, D.W. (1988).** The influence of aggressive ants on fruit removal in the tropical tree, *Ficus capensis* (Moraceae). *Biotropica*, 20: 49-53.
- **Tirilly Y., Bourgeois C.M. (1999)** : Technologie des légumes. Éditions Tec & Doc, 558 pp.
- **Toudert.N, thèse de doctorat. (2011).** Etude phytochimique et évaluation de quelques activités biologiques de *Ampelodesma mauritanica*. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **Trease E. et Evans W.C., (1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th ed.

V

- **Vermeris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry. Springer. Dordrecht. ISBN-1001- 4020-5163-8 (HB).
- **Villeneuve F, Le Cam B, Rouxel F.,** Analyse de la ore fongique de la carotte conservée au froid : prépondérance de *Mycocentrospora acerina*.

W

- **Willmott N.J, Guthrie J.T, Nelson G.,(1998).**The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. JSDC, 114, p: 38-41
- **World Health Organisation. (1999).** Monograaphs on selected medicinal plants.Vol.1, Genève, Suisse.

Z

- **Zakkad F, (2016).** Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés biologiques de trois espèces de l'*Euphorbia*, Universite Badji Mokhtar. Annaba, p47-52.



ANNEXE I

1. L'appareillage

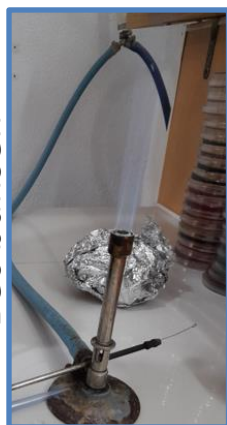
Spectrophotomètre



Densitchek



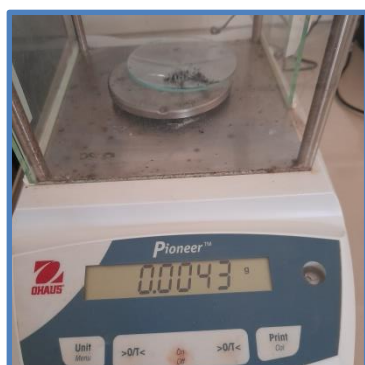
Bec bunsen



Etuve



Balance



Rota Vapeur



2. Les produits chimique

Méthanol	Chloroforme
Ethanol	Anhydride acétique
Acide chlorhydrique (HCl)	Hydroxyde de potassium(KOH)
Copeaux de magnésium	Liqueur de Fehling
Iodure de potassium	Ether de pétrole
Eau distillé	Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)
Chlorure ferrique (FeCl ₃)	Acide ascorbique DPPH
Ammoniaque (NH ₄ OH)	L'eau physiologie
Acide Sulfurique (H ₂ SO ₄)	DMSO
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Muller-Hinton.

3. Les Verreries

Flacons	verres à montre
Bécher	micros pipettes
Erlenmeyer	boites de pétri en verre
Entonnoi	tube à essai
papier filtre	tubes secs à bouchons
barreau magnétique	pince
spatule	boite de pétri.
pipettes	portoirs

4. Préparation des solutions pour l'analyse biochimique

+ Ethanol 70%

Ethanol.....70 ml
Eau distillé.....30ml

+ Méthanol 80%

Méthanol80 ml
Eau distillé.....20ml

+ Carbonate de sodium

Carbonate de sodium7,5g
Eau distillé.....100ml

+ DPPH

DPPH..... 0,004g
Méthanol52,5 ml
Eau distillé.....22,5 ml

5. Composition des principaux Milieux de culture utilisés

+ Milieux liquides

Eau physiologique stérile

Chlorure de sodium (NaCL)..... 0,9g
Eau distillée..... 100ml

+ Milieux solides

Gélose Muller Hinton (MH)

Gélose Mueller Hinton poudre..... 38g
Eau distillée..... 1L

6. Réactifs utilisés pour le screening phytochimique :

➤ Réactif de Wagner

Iodure de potassium.....2 g
Iode.....1 ,27 g
Eau distillée.....100 ml.

➤ **HCL (10%)**

10ml HCl	➡	90ml d'eau distillé.
0,5ml HCl	➡	4,5ml d'eau distillé.

➤ **HCl (1%)**

1ml HCl	➡	99ml d'eau distillé.
0,1 ml HCl	➡	9,9ml d'eau distillé.

➤ **KOH (10%)**

10g KOH	➡	100ml d'eau distillé.
0,5g KOH	➡	5ml d'eau distillé

➤ **FeCl₃ (1%)**

1g FeCl ₃	➡	100ml d'eau distillé.
0,5 g FeCl ₃	➡	50ml d'eau distillé.

➤ **NaOH (1%)**

1g NaOH	➡	100ml d'eau distillé.
0,5g NaOH	➡	50ml d'eau distillé.

➤ **NH₄OH (10%)**

10ml NH ₄ OH	➡	90ml d'eau distillé.
0,5ml NH ₄ OH	➡	4,5ml d'eau distillé

Annexe II : AAO

➤ Extrait méthanolique du *Beta vulgaris* L

Tableau 1 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ d'extrait méthanolique du *Beta vulgaris* L dans les temps (30, 45).

Beta vulgaris L							
Temps	Répétition	Concentration (mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECART TYPE
30 min	1 ^{ère}	0,1	0.111	87.66	1.258	1.674333	0,358004035
		0,2	0.150	83.33			
		0,3	0.169	81.22			
	2 ^{ème}	0,1	0.119	86.77	1.633		
		0,2	0.146	83.77			
		0,3	0.162	82			
	3 ^{ème}	0,1	0.133	85.22	2.132		
		0,2	0.153	83			
		0,3	0.164	81.77			
45 min	1 ^{ère}	0,1	0.070	92.22	1.995	1,598	0,324149143
		0,2	0.091	89.88			
		0,3	0.110	87.77			
	2 ^{ème}	0,1	0.073	91.88	1.598		
		0,2	0.084	90.66			
		0,3	0.124	86.22			
	3 ^{ème}	0,1	0.0696	92.26	1.201		
		0,2	0.099	89			
		0,3	0.139	84.55			

➤ Extrait aqueux du *Beta vulgaris* L

Tableau 2 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ d'extrait aqueux du *Beta vulgaris* L dans les temps (30, 45).

Beta vulgaris L								
Temps	Répétition	Concentration (mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECARTYPE	
30 min	1 ^{ère}	0,1	0.170	81.11	2.095	1.485	0.605240999	
		0,2	0.186	79.33				
		0,3	0.198	78				
	2 ^{ème}	0,1	0.168	81.33	1.70			
		0,2	0.187	79.22				
		0,3	0.203	77.44				
	3 ^{ème}	0,1	0.190	78.88	0.66			
		0,2	0.250	72.22				
		0,3	0.280	68.88				
45 min	1 ^{ère}	0,1	0.192	78.66	1.00	1.318	0.368141277	
		0,2	0.212	76.44				
		0,3	0.250	72.22				
	2 ^{ème}	0,1	0.201	77.66	1.12			
		0,2	0.220	75.55				
		0,3	0.251	72.22				
	3 ^{ème}	0,1	0.217	75.88	1.834			
		0,2	0.218	74.77				
		0,3	0.244	74				

➤ **Extrait méthanolique du *Daucus carota L***

Tableau 01 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ d'extrait méthanolique du *Daucus carota L* dans les temps (30, 45).

Daucus carota L							
Temps	Repetition	Concentration (mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECARTYPE
30 min	1ère	0,1	0.070	92.22	2.93	2,572333333	0,563333136
		0,2	0.075	91.66			
		0,3	0.097	89.22			
	2ème	0,1	0.056	93.77	3.01		
		0,2	0.071	92.11			

		0,3	0.083	90.77	1.777		
	3ème	0,1	0.075	91.66			
		0,2	0.090	90			
		0,3	0.120	86.66			
45 min	1ère	0,1	0.092	89.77	1.44	1,867333333	0,482687845
		0,2	0.1 14	87.33			
		0,3	0.145	83.88			
	2ème	0,1	0.081	91	1.62		
		0,2	0.1 12	87.55			
		0,3	0.129	85.66			
	3ème	0,1	0.131	85.44	2.542		
		0,2	0.148	83.55			
		0,3	0.157	82.55			

➤ **Extrait aqueux du *Daucus carota* L**

Tableau 02 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ d'extrait aqueux du *Daucus carota* L dans les temps (30, 45).

Daucus carota							
Temps	Répétition	Concentration (mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECARTYPE
30 min	1ère	0,1	0.303	66.33	0.337	0,214	0,090932209
		0,2	0.317	64.77			
		0,3	0.442	50.88			
	2ème	0,1	0.419	53.44	0.185		
		0,2	0.456	49.33			
		0,3	0.491	45.44			
	3ème	0,1	0.431	52.11	0.120		
		0,2	0.516	42.66			
		0,3	0.579	35.66			
45 min	1ère	0,1	0.385	57.22	0.259		
		0,2	0.387	57			
		0,3	0.487	45.88			
	2ème	0,1	0.447	50.33			

3ème	0,2	0.572	36.44	0.0992	0,14053333 3	0,085034006
	0,3	0.674	25.11			
	0,1	0.495	45	0.0634		
	0.2	0.533	40.77			
	0,3	0.660	26.66			

➤ **Colorant NH₂SO₂+NOH**

Tableau 03 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ de Colorant NH₂SO₂+NOH dans les temps (30, 45).

CLR1- NH ₂ SO ₂ +NOH							
Temps	Répétition	Concentration(mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECARTYPE
30	1 ^{ère}	0,1	0.356	60.44	0.690	0,609	0,058177888
		0,2	0.370	58.88			
		0,3	0.388	56.88			
	2 ^{ème}	0,1	0.358	60.22	0.556		
		0,2	0.393	56.33			
		0,3	0.396	56			
	3 ^{ème}	0,1	0.361	59.88	0.581		
		0,2	0.386	57.11			
		0,3	0.397	55.88			
45 Min	1 ^{ère}	0,1	0.225	75.33	1.216	1,150333 333	0,2232940 26
		0,2	0.239	73.44			
		0,3	0.263	70.77			
	2 ^{ème}	0,1	0.209	76.77	1.385		
		0,2	0.237	73.66			
		0,3	0.244	72.88			
	3 ^{ème}	0,1	0.210	76.66	0.850		
		0,2	0.241	73.22			
		0,3	0.274	69.55			

➤ Colorant NH₂+β

Tableau 04 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ de Colorant NH₂+β dans les temps (30, 45).

CLR2 - NH2+β							
Temp s	Répétitio n	Concentrati on (mg/ml)	Absorbanc es	Inhibiti on%	IC ₅₀ %	MOYENN E	ECARTY PE
30 min	1 ^{ère}	0,1	0.159	82.33	1.960	2,043	0,26340969 4
		0,2	0.181	79.88			
		0,3	0.190	78.88			
	2 ^{ème}	0,1	0.148	83.55	1.770		
		0,2	0.170	81.11			
		0,3	0.184	79.55			
	3 ^{ème}	0,1	0.140	84.44	2.399		
		0,2	0.162	83.11			
		0,3	0.177	81.44			
45 min	1 ^{ère}	0,1	0.158	82.44	1.949	1,215	0,52224387 7
		0,2	0.169	81.22			
		0,3	0.190	78.88			
	2 ^{ème}	0,1	0.150	83.33	0.91 9		
		0,2	0.201	77.66			
		0,3	0.222	75.33			
	3 ^{ème}	0,1	0.137	84.77	0.777		
		0,2	0.159	82.33			
		0,3	0.2321	74.22			

➤ Colorant 3COCH₃

Tableau 04 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ de Colorant 3COCH₃ dans les temps (30, 45).

CLR3 -3COCH ₃							
Temps	Répétition	Concentration (mg/ml)	Absorbances	Inhibition %	IC ₅₀ %	MOYENNE	ECARTYPE
30 min	1 ^{ère}	0,1	0.0460	94.88			

45 min		0,2	0.0574	93.62	2.624	2,926	0,4277997 97
		0,3	0.0782	91.31			
	2ème	0,1	0.0556	93.82	3.531		
		0,2	0.0597	93.36			
		0,3	0.0787	91.25			
	3ème	0,1	0.0565	93.72	2.623		
		0,2	0.0669	92.56			
		0,3	0.0878	90.24			
	1ère	0,1	0.0561	93.76	1.994	2,0426666 67	0,2013708 57
			0.0670	92.55			
			0.0981	89.1			
2ème		0,1	0.0578	93.57	1.824		
		0,2	0.0765	91.5			
		0,3	0.1035	88.5			
3ème		0,1	0.0658	92.68	2.31		
		0,2	0.0864	90.4			
		0,3	0.1005	88.83			

➤ **Colorant NH₂SO₂+β**

Tableau 04 : Absorbance, les Inhibitions et les IC₅₀ de Colorant NH₂SO₂+β dans les temps (30, 45).

CLR 4- NH ₂ SO ₂ +β							
Temp s	Répétitio n	Concentrati on (mg/ml)	Absorbanc es	Inhibitio n %	IC ₅₀ %	MOYEN NE	ECARTY PE
30 min	1ère	0,1	0.0350	96.11	2.19	1,96	0,1649868 68
		0,2	0.0466	94.82			
		0,3	0.0749	91.67			
	2ème	0,1	0.0290	96.77	1.811		
		0,2	0.0412	95.42			
		0,3	0.0787	91.25			
	3ème	0,1	0.0380	95.77	1.879		
		0,2	0.0501	94.43			

		0,3	0.0847	90.58			
45 min	1ère	0,1	0.0387	95.7	1.618	1,526	0,1322346 4
		0,2	0.0657	92.7			
		0,3	0.0928	89.68			
	2ème	0,1	0.0402	95.53	1.621		
		0,2	0.0701	92.21			
		0,3	0.0939	89.56			
	3ème	0,1	0.0441	95.1	1.339		
		0,2	0.0891	90.1			
		0,3	0.1089	87.9			

Annexe III : Les pourcentages d'inhibitions

➤ Extrait méthanolique du *Beta vulgaris* L

• 1ère répétition dans 30 min

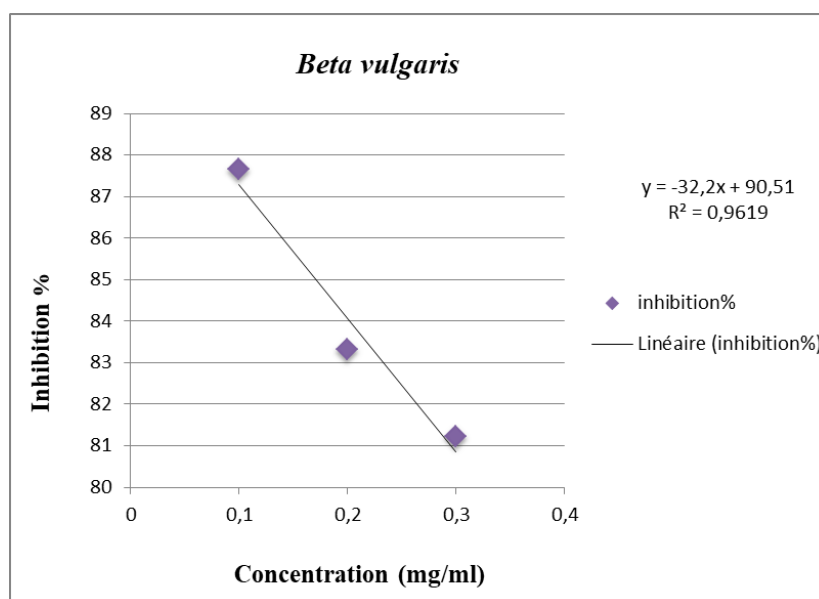


Figure 1 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du BV.

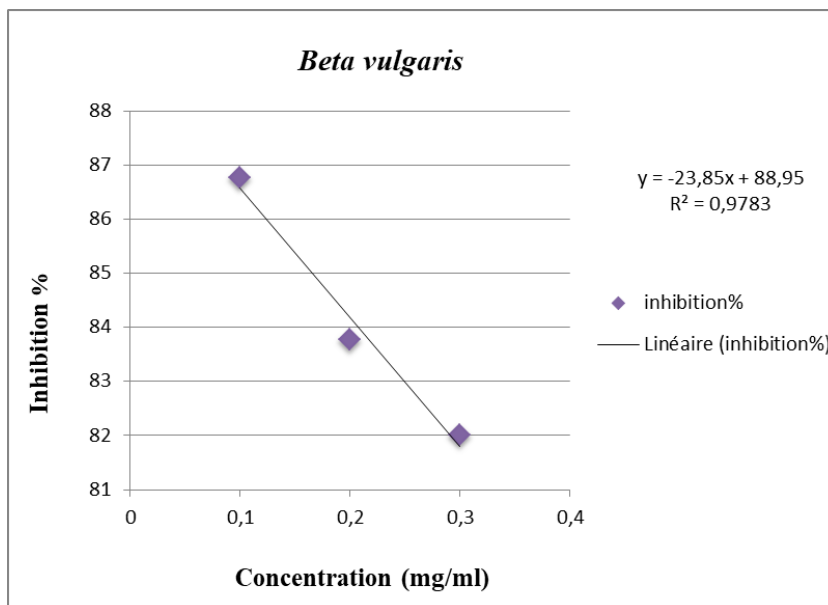


Figure 2 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du BV.

•3ème répétition dans 30 min

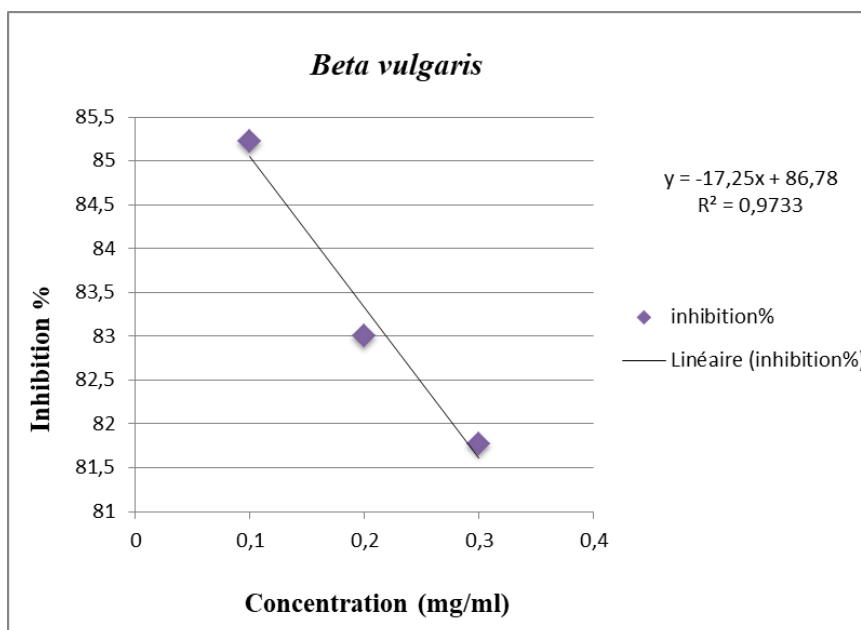


Figure 03 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du BV.

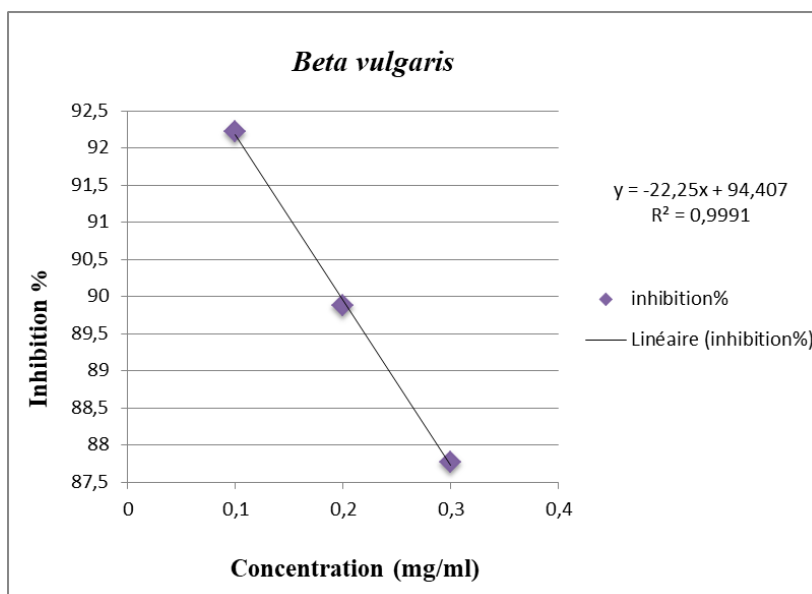
• 1ère répétition dans 45 min

Figure 04 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du BV.

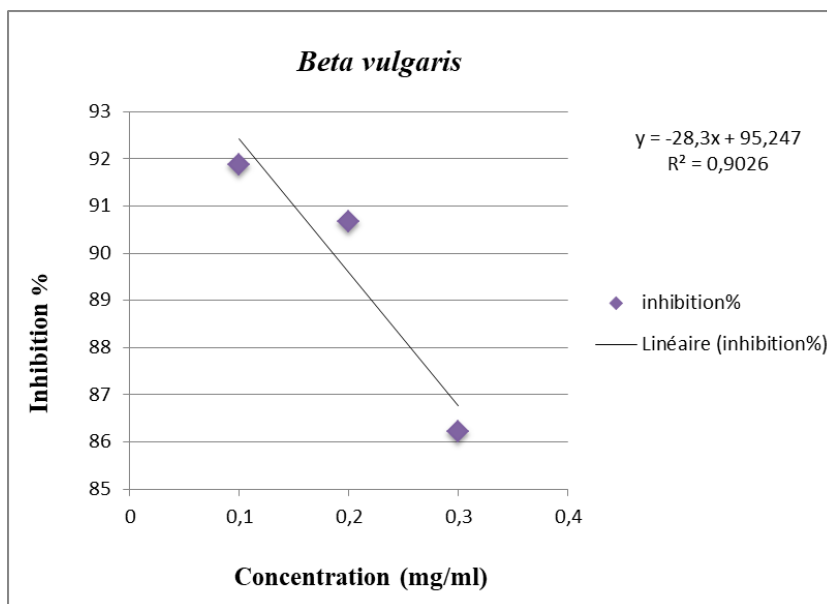
• 2ème répétition dans 45 min

Figure 06 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du BV.

- Extrait aqueux du *Beta vulgaris* L
- 1ère répétition dans 30 min

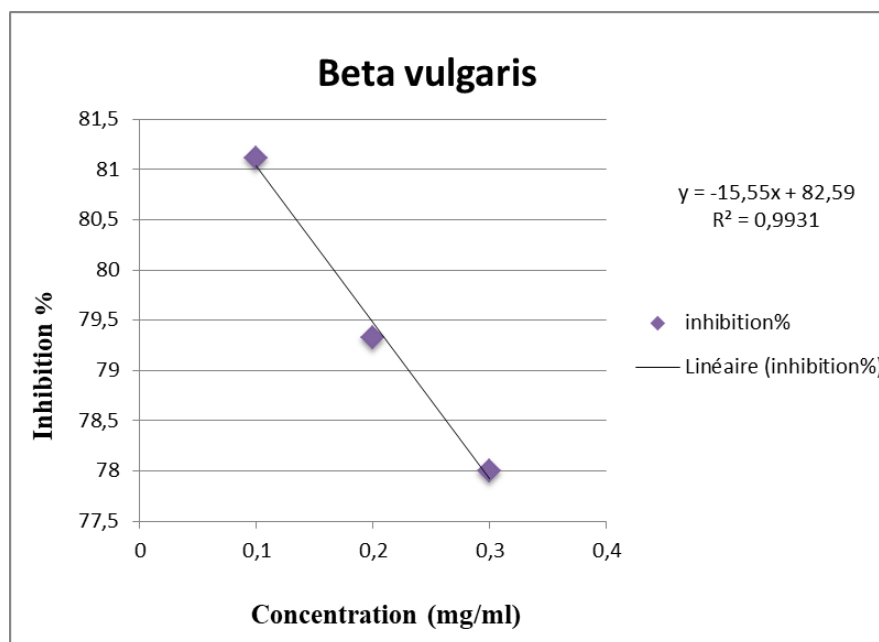


Figure 07 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du BV.

- 2ème répétition dans 30 min

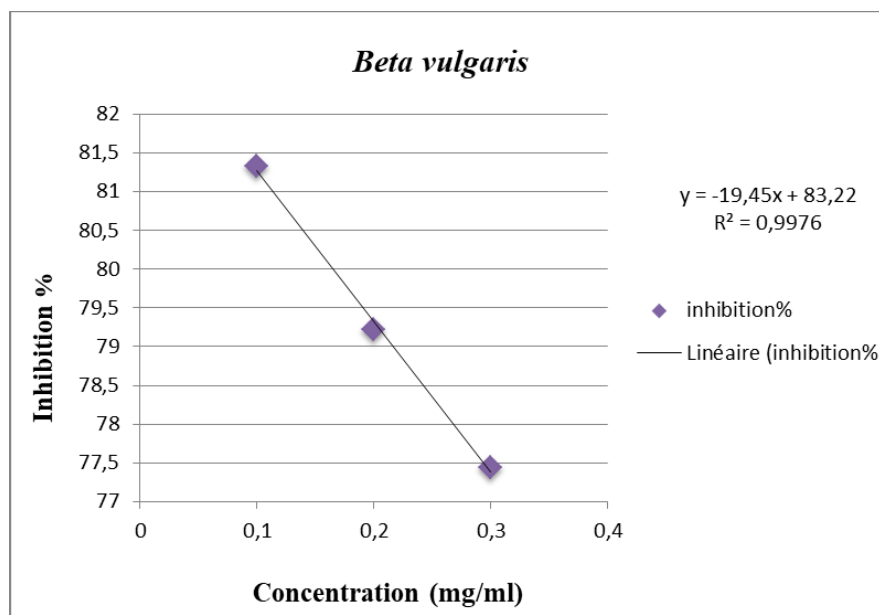


Figure 08 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du BV.

- 3ème répétition dans 30 min

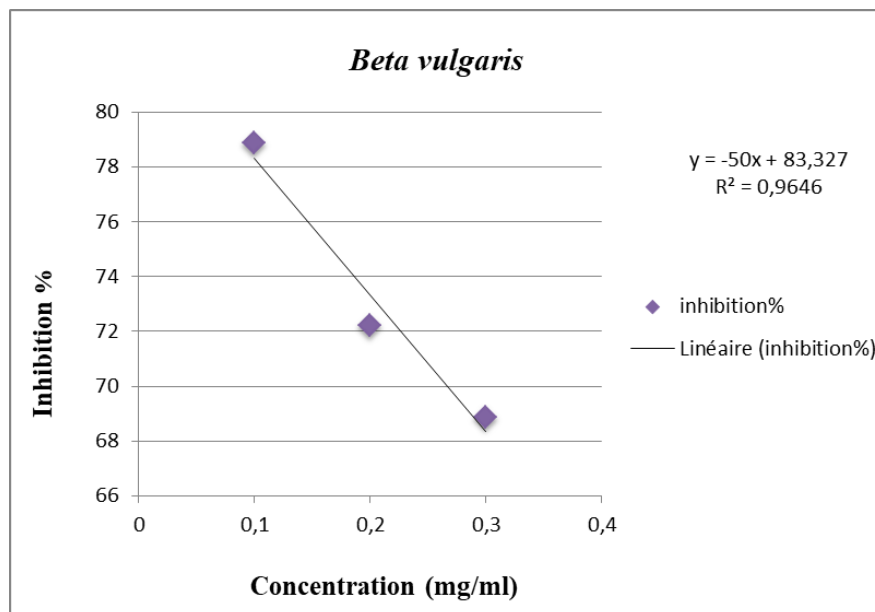


Figure 09 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du *BV*.

- 1ère répétition dans 45 min

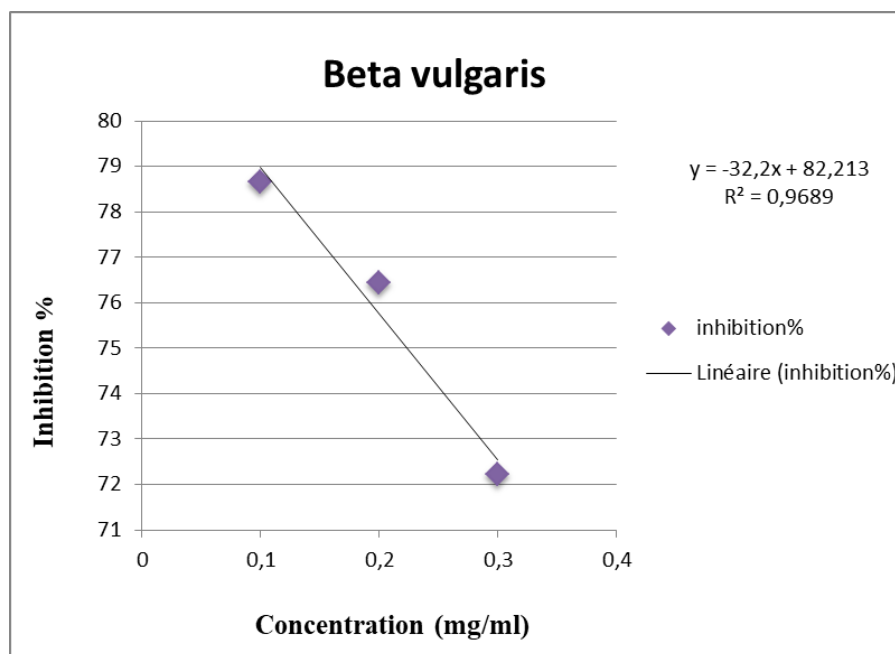


Figure 10 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du *BV*.

- 2ème répétition dans 45 min

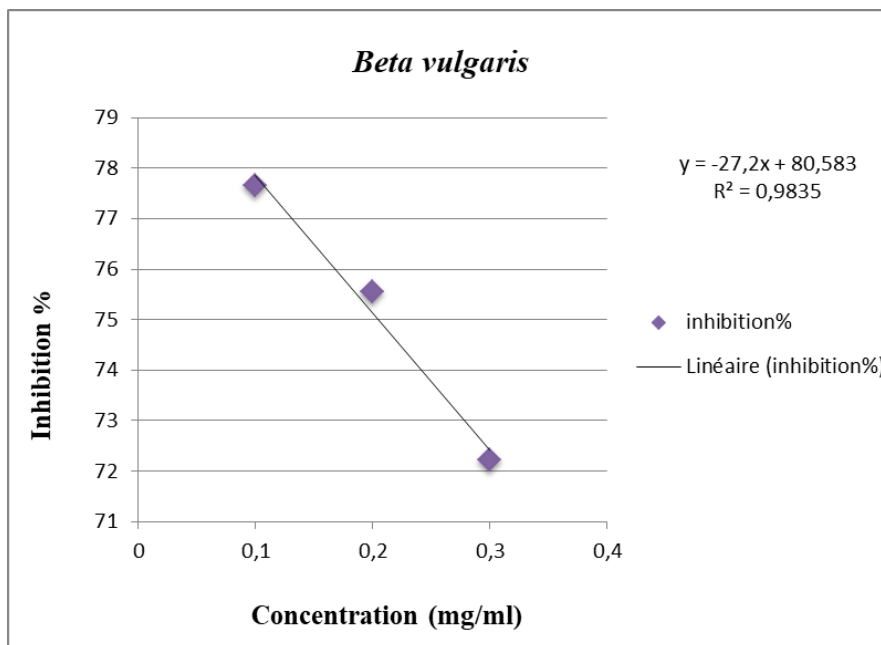


Figure 11 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du BV.

- **3ème répétition dans 45 min**

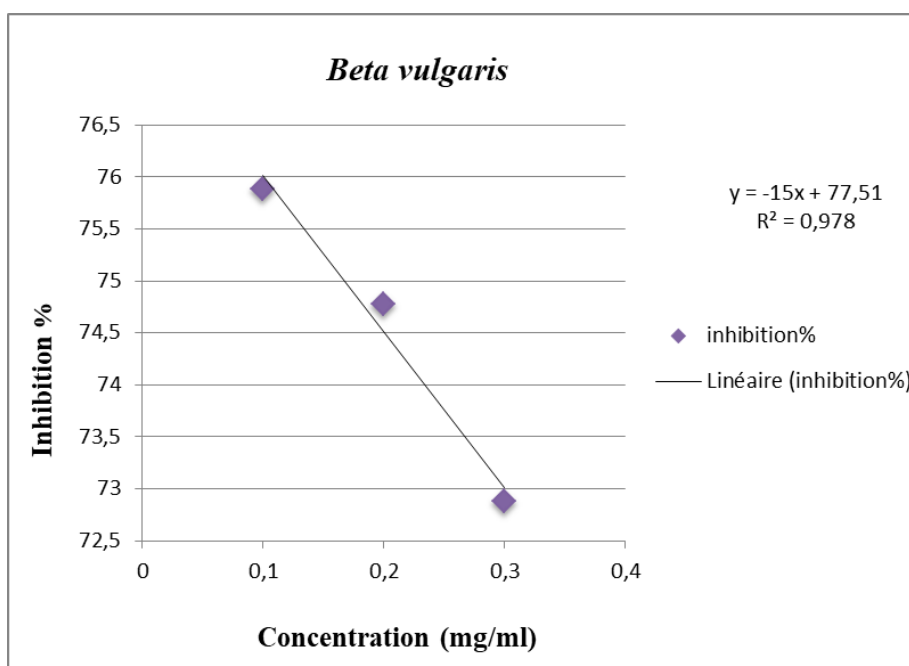


Figure 12 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du BV.

➤ **Extrait méthanolique du *Daucus carota* L**

- **1ère répétition dans 30 min**

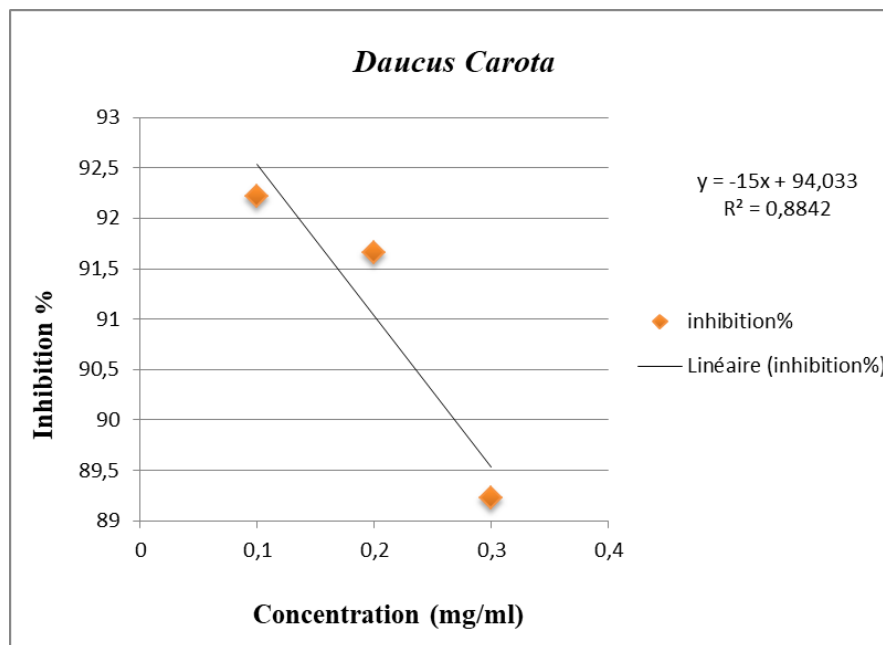


Figure 13 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

- 2ème répétition dans 30 min

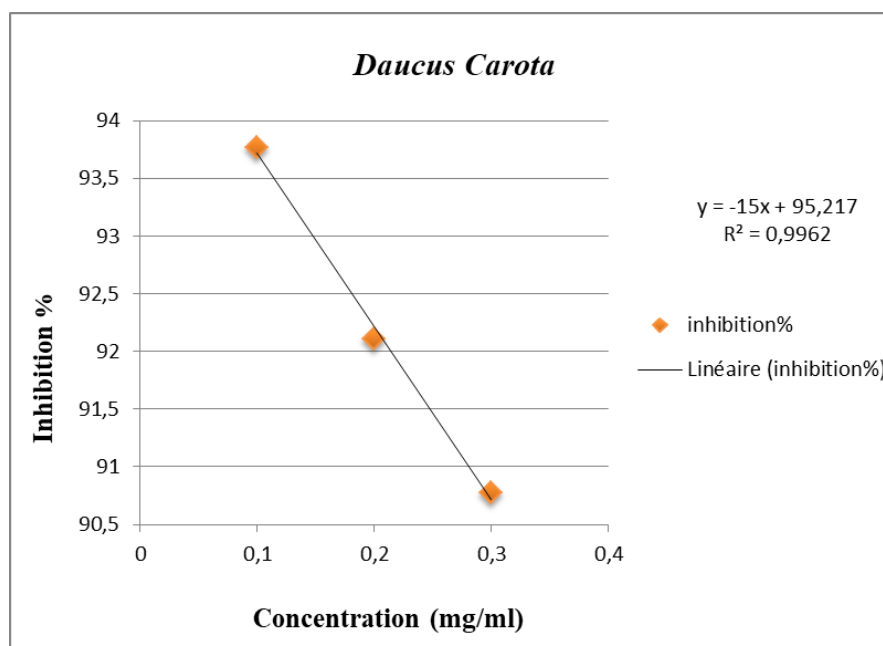


Figure 14 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

- 3ème répétition dans 30 min

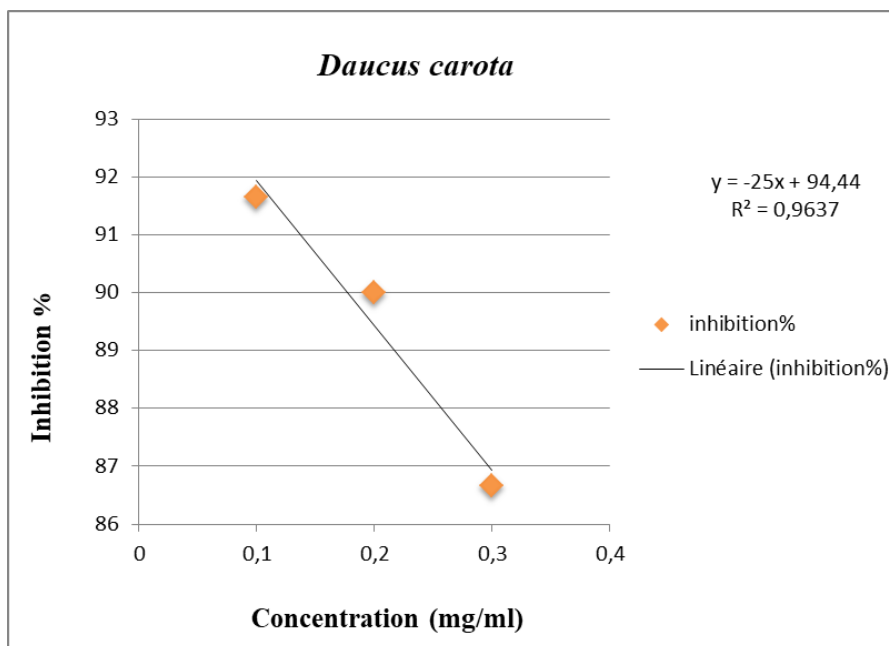


Figure 15 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

- 1ère répétition dans 45 min

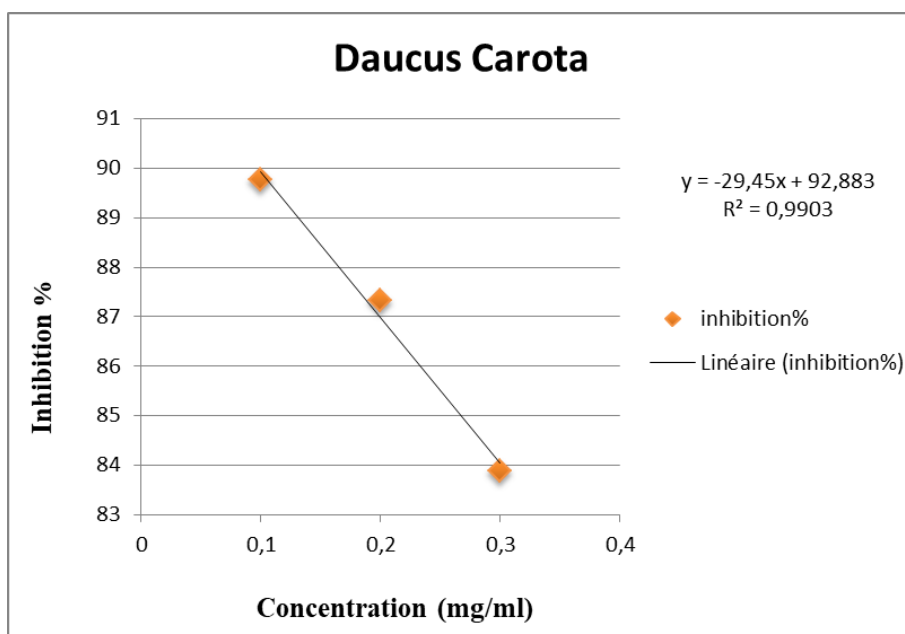


Figure 16 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

- 2ème répétition dans 45 min

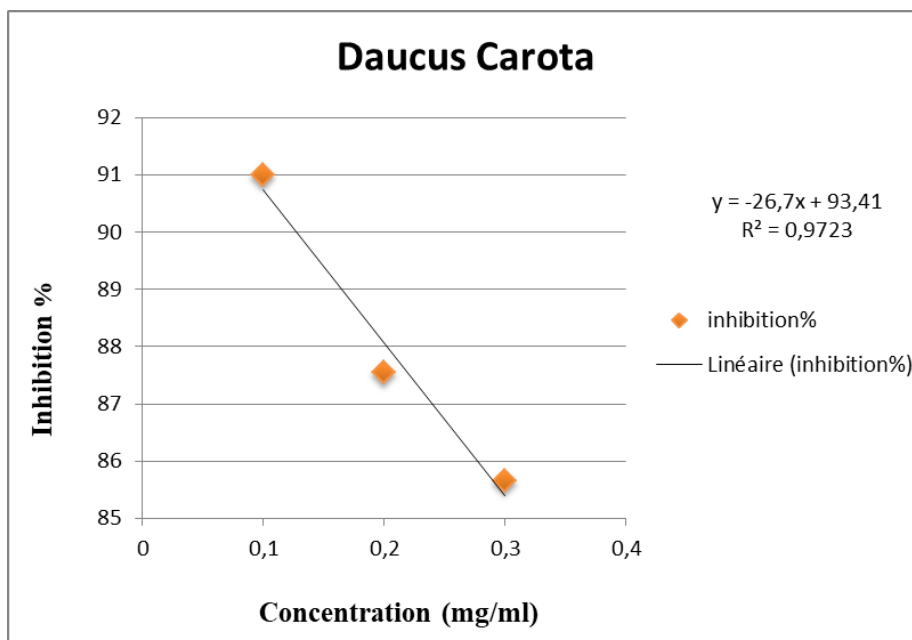


Figure 17 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

- 3ème répétition dans 45 min

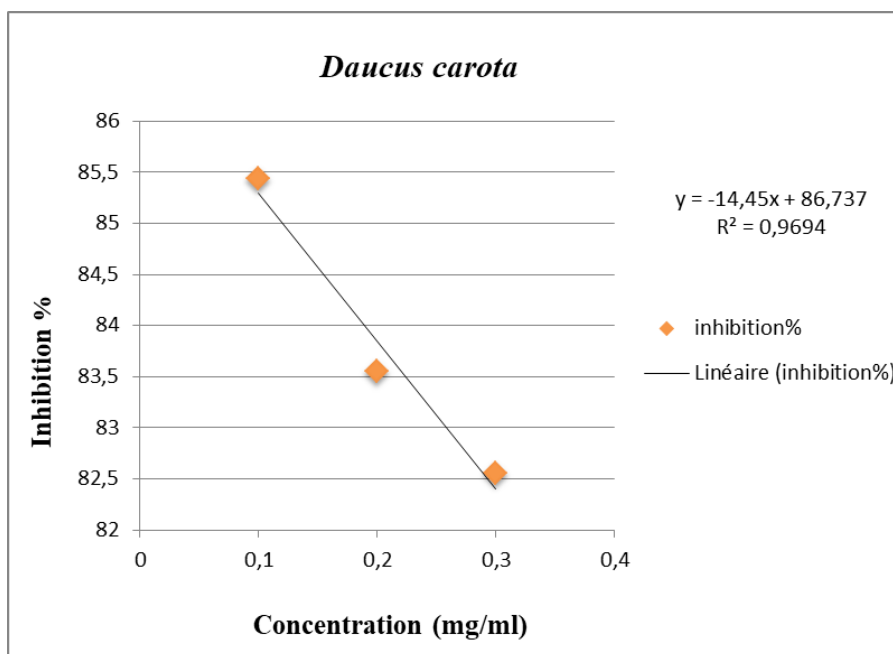


Figure 18 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique du DC.

➤ Extrait aqueux du *Daucus carota* L

• 1ère répétition dans 30 min

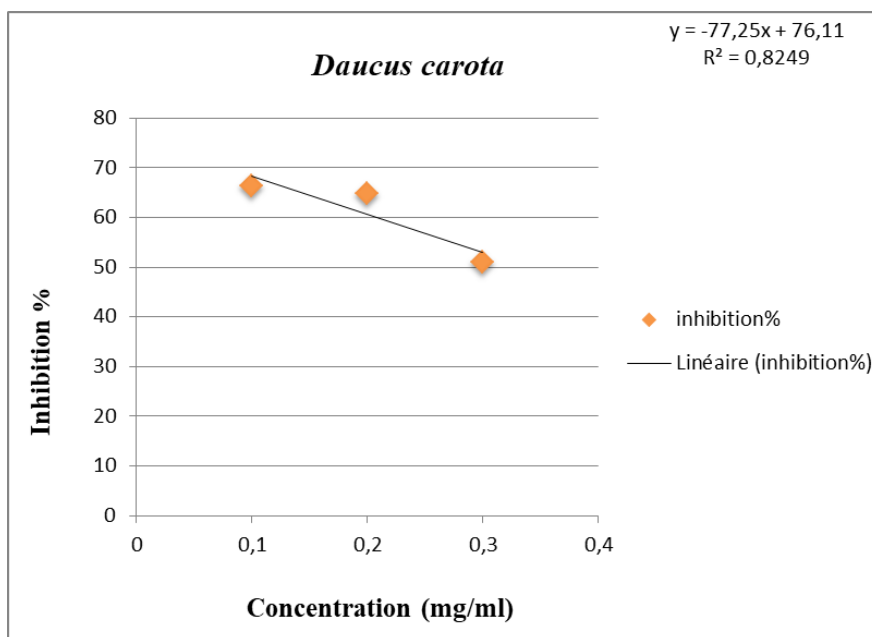


Figure 19 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

• 2ème répétition dans 30 min

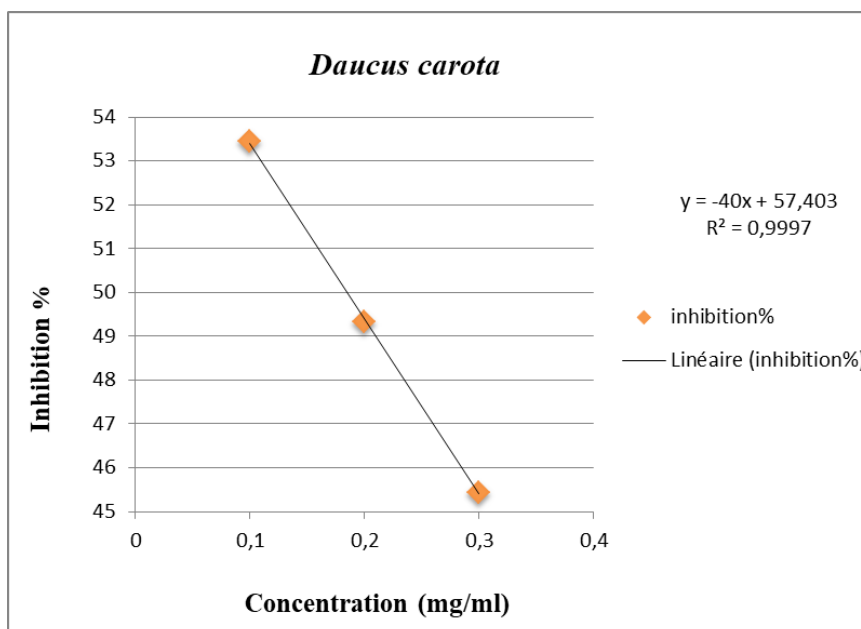


Figure 20 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

- 3ème répétition dans 30 min

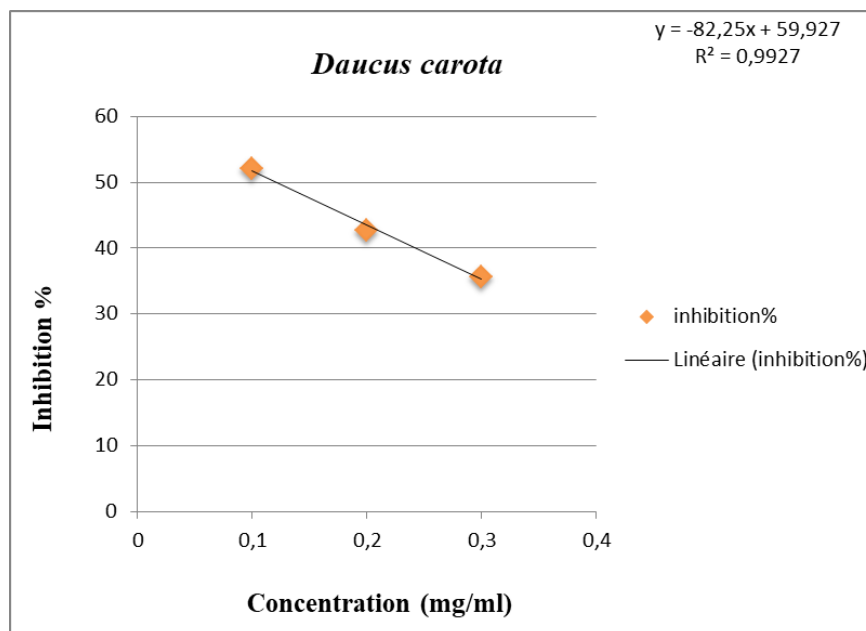


Figure 21 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

- 1ère répétition dans 45 min

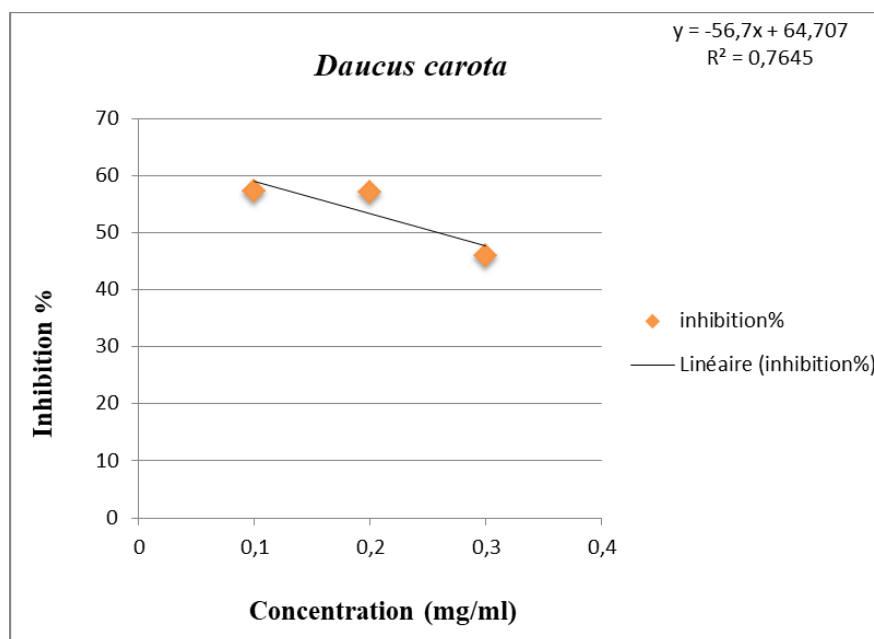


Figure 22: Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

- 2ème répétition dans 45 min

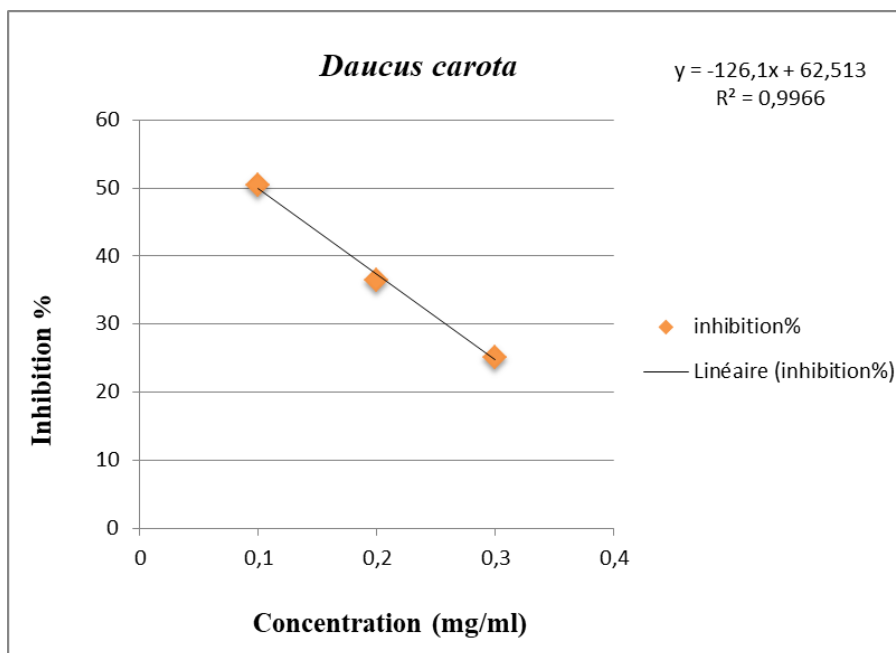


Figure 23 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

- 3ème répétition dans 45 min

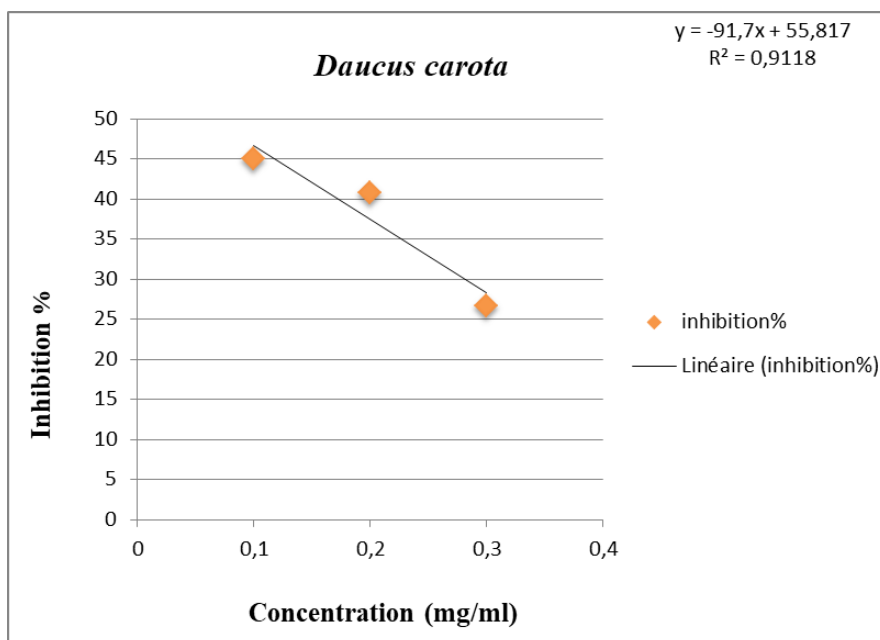


Figure 24 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux du DC.

➤ **Colorant (E)-4-(3-quinolin-4olazo) benzenesulfonamide**

• **1ère répétition dans 30 min**

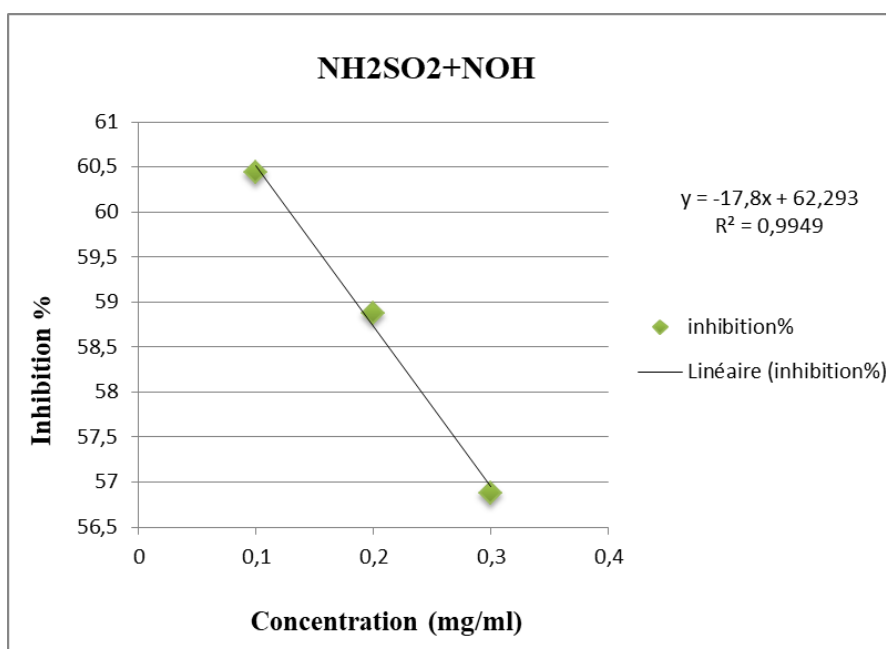


Figure 25 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR1.

• **2ème répétition dans 30 min**

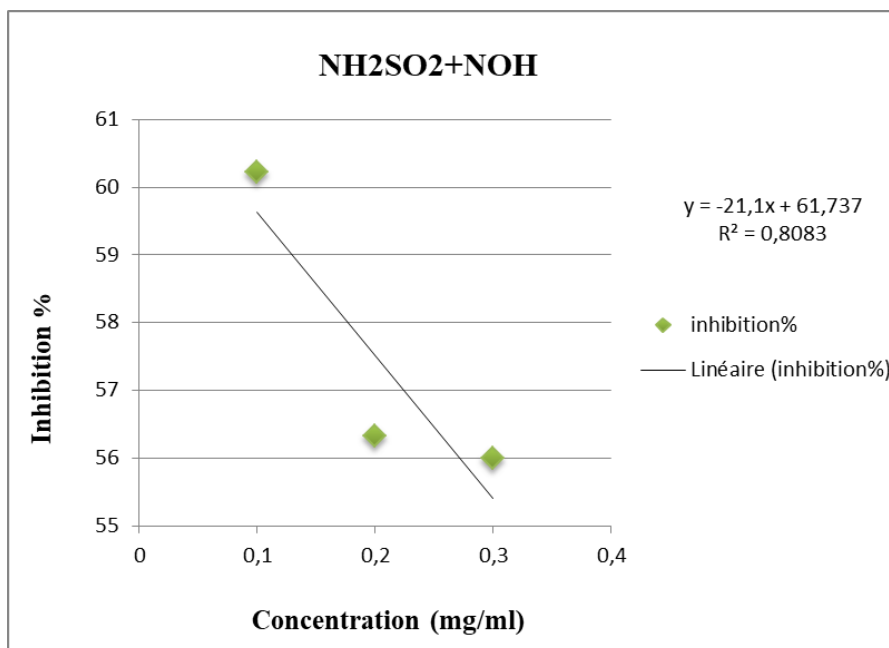


Figure 26 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de colorant CLR1.

- 3ème répétition dans 30 min

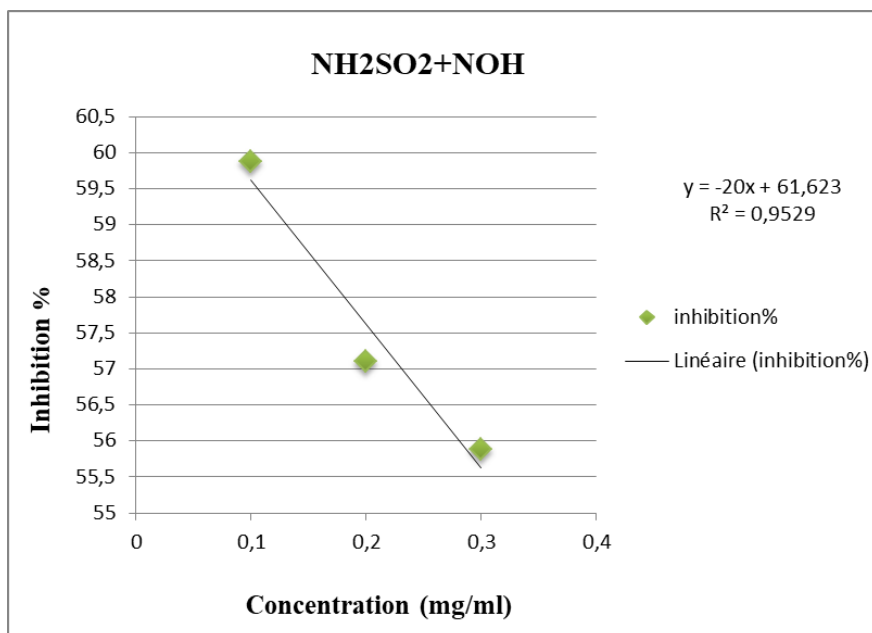


Figure 27 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR1.

- 1ère répétition dans 45 min

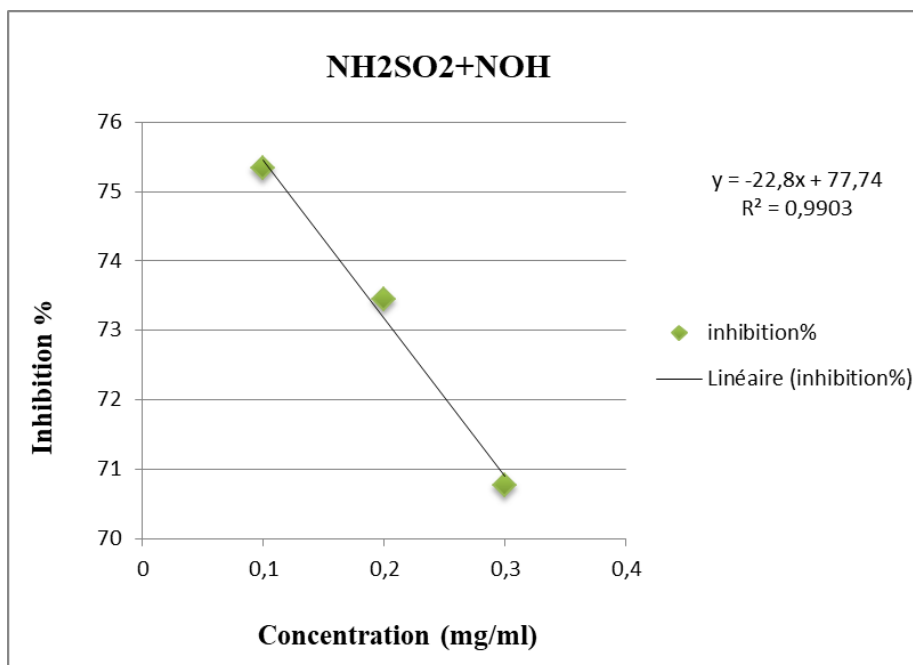


Figure 28 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR1.

- 2ème répétition dans 45 min

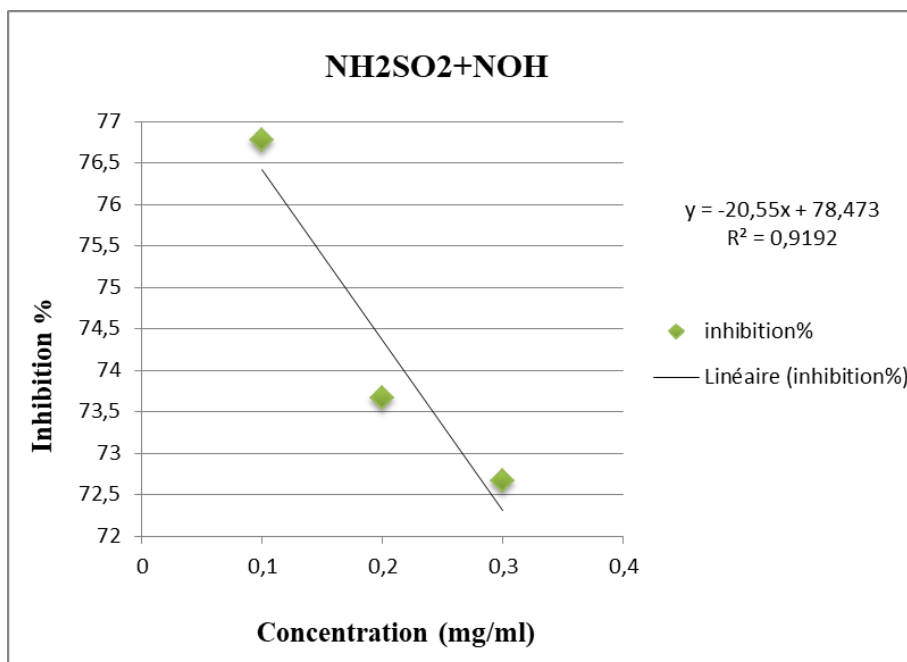


Figure 29 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR1.

- 3ème répétition dans 45 min

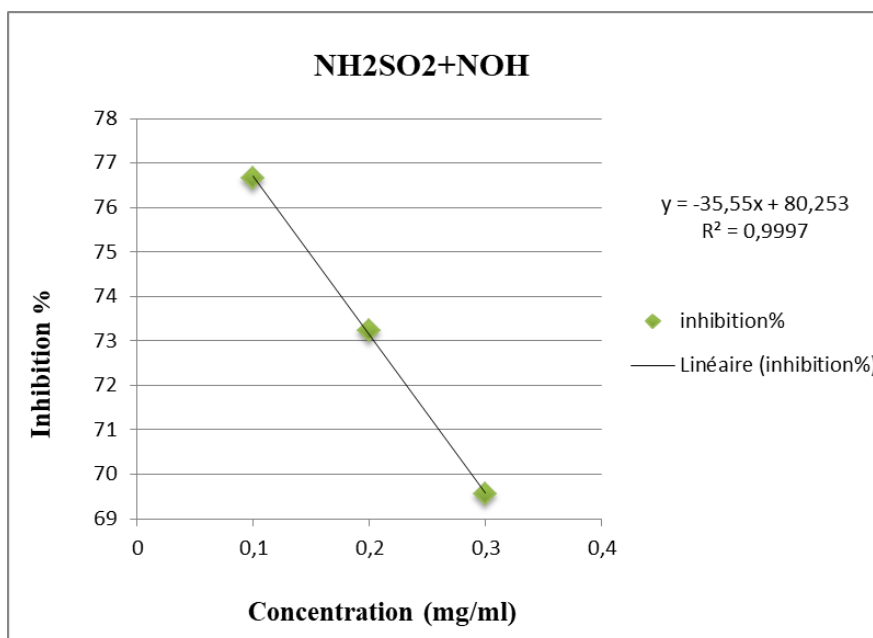


Figure 30 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR1.

➤ **Colorant : (E)-1-(phenylazo)-2-naphtol**

• **1ère répétition dans 30 min**

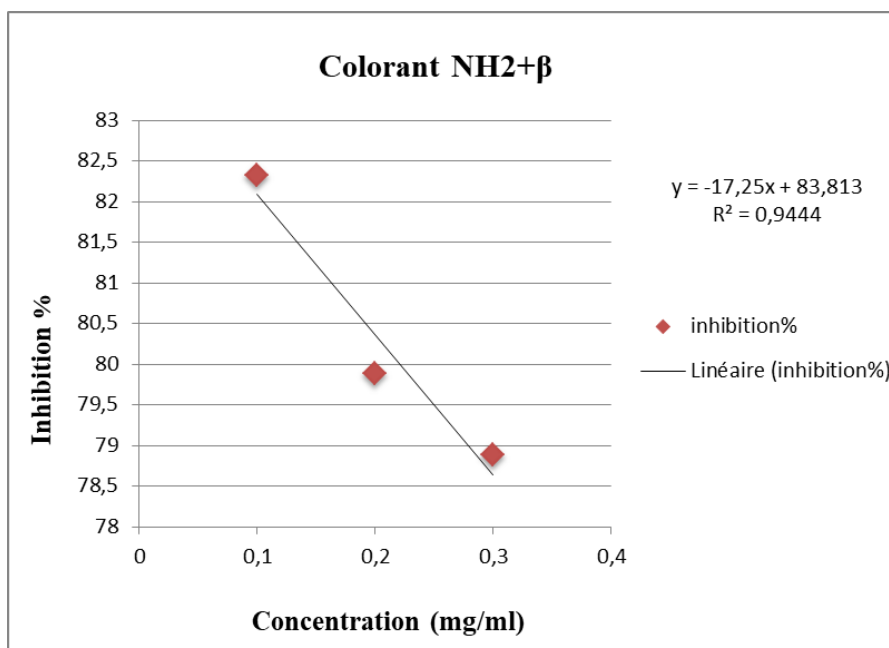


Figure 31 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

• **2ème répétition dans 30 min**

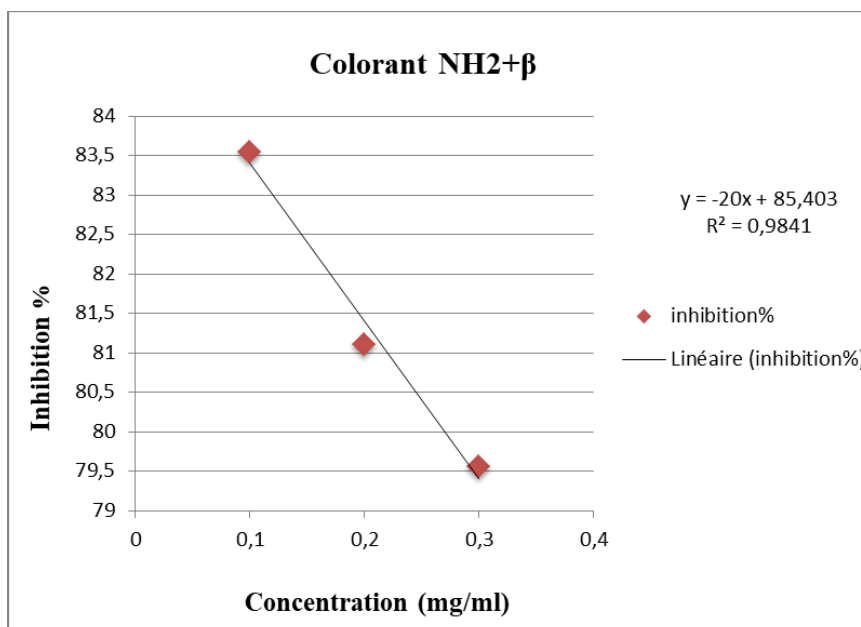


Figure 32 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

• 3ème répétition dans 30 min

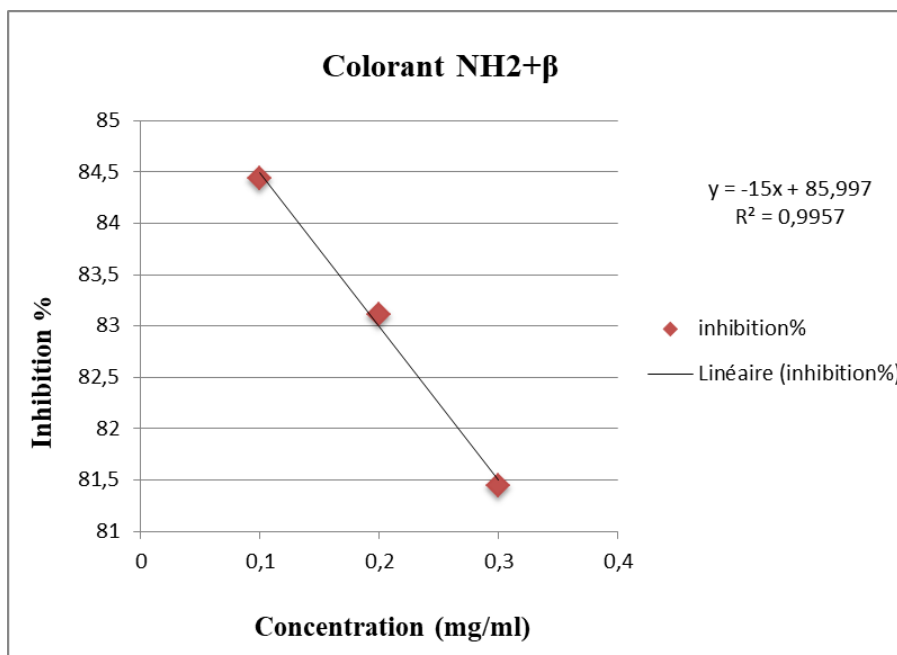


Figure 33 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

• 1ère répétition dans 45 min

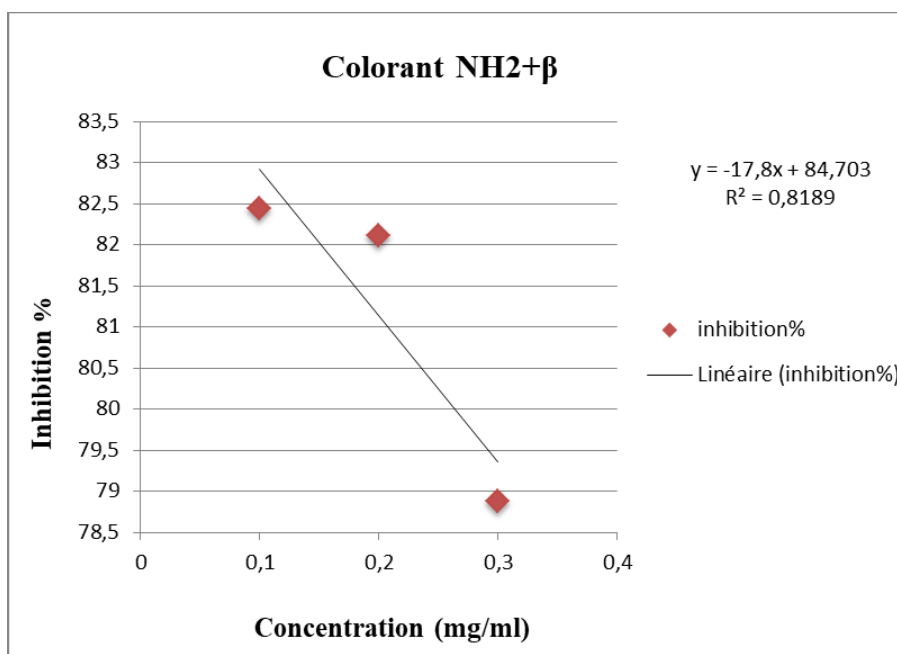


Figure 34 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

• 2ème répétition dans 45 min

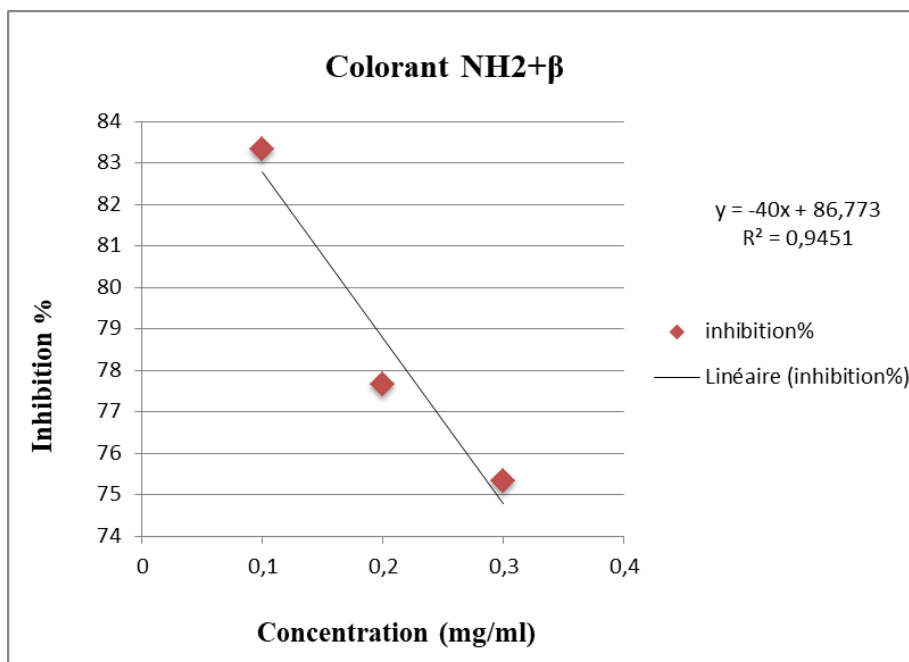


Figure 35 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

• 3ème répétition dans 45 min

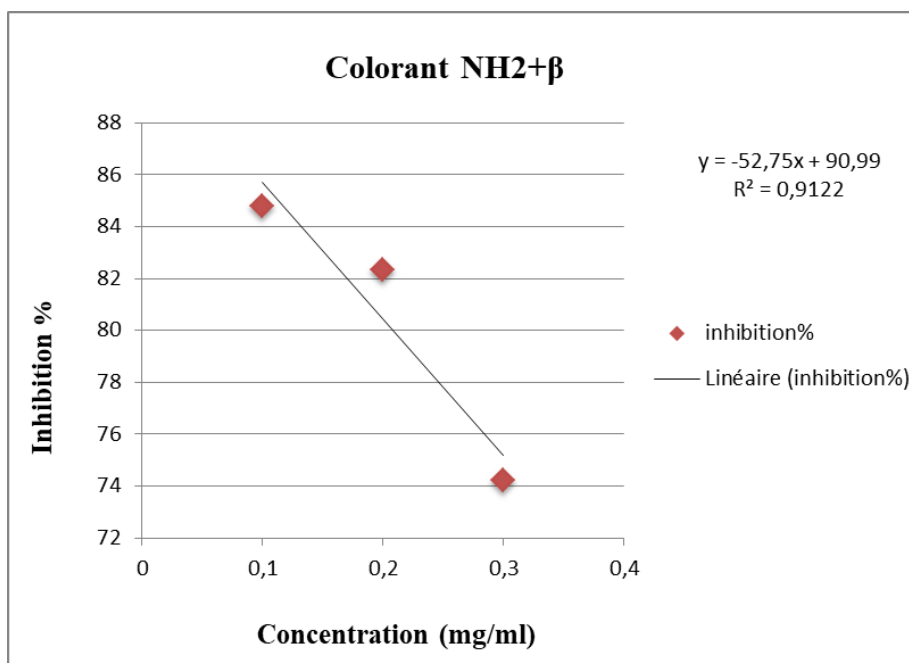


Figure 36 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR2.

➤ **Colorant (E)-1-(3-aceto phenylazo)-2-naphtol**

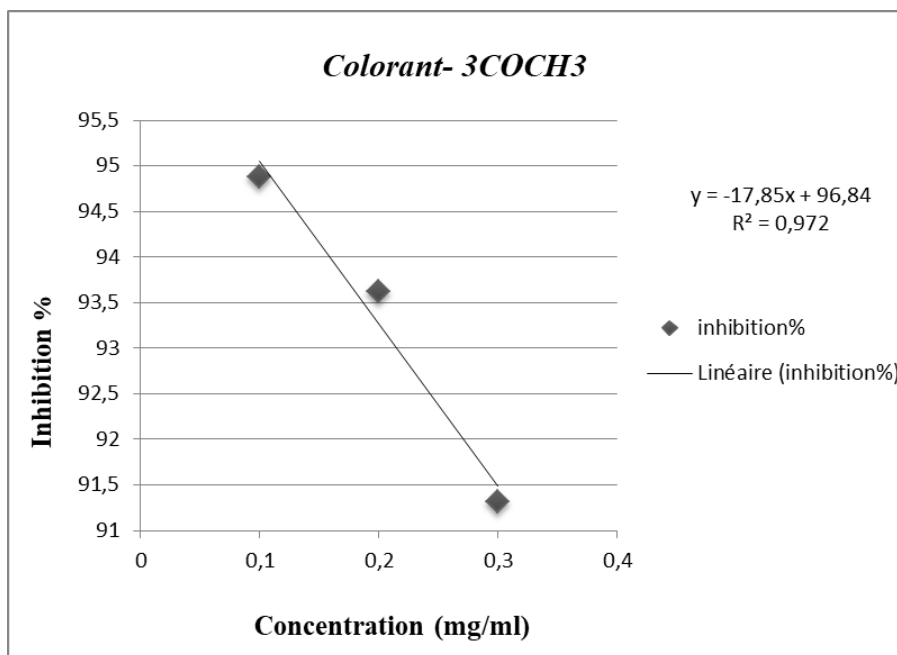
•1ère répétition dans 30 min

Figure 37 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

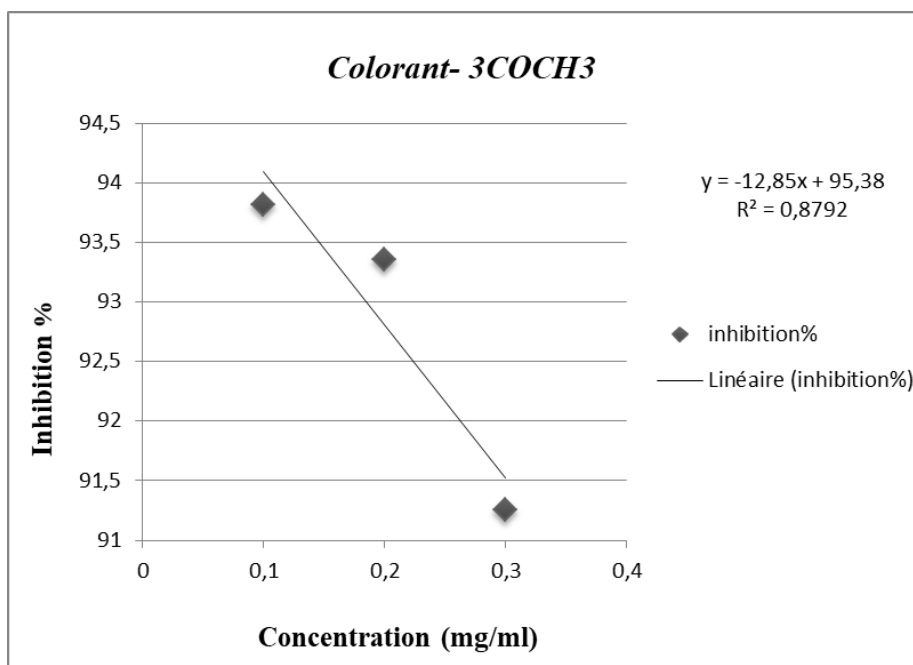
•2ème répétition dans 30 min

Figure 38 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

•3ème répétition dans 30 min

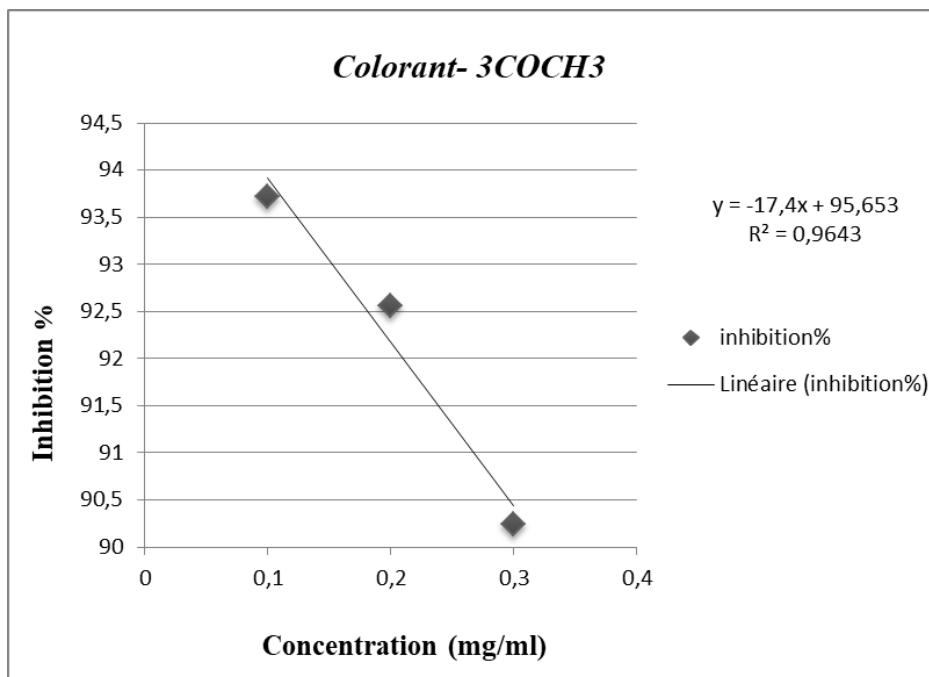


Figure 39 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

•1ère répétition dans 45 min

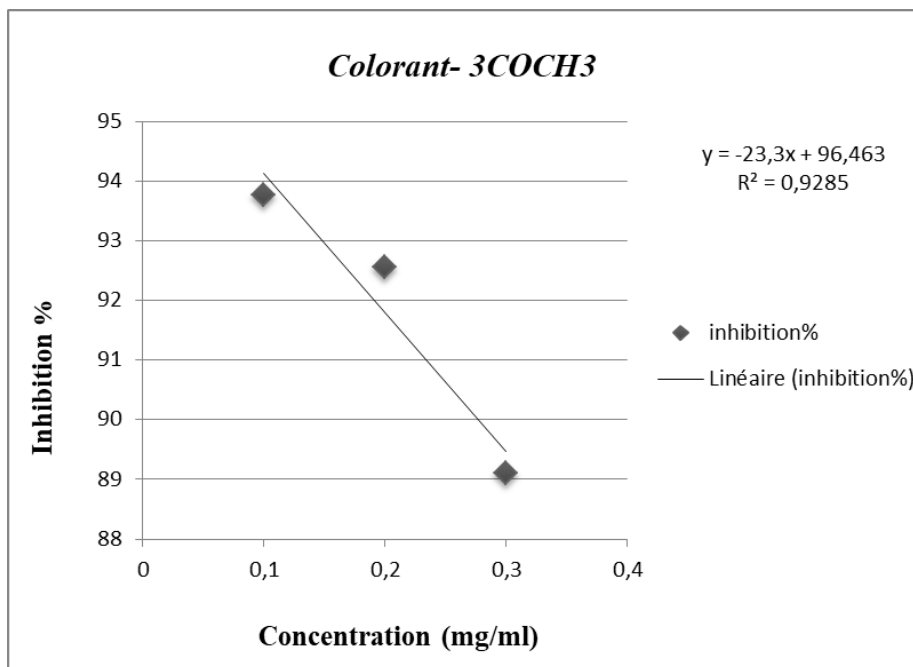


Figure 40 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

•2ème répétition dans 45 min

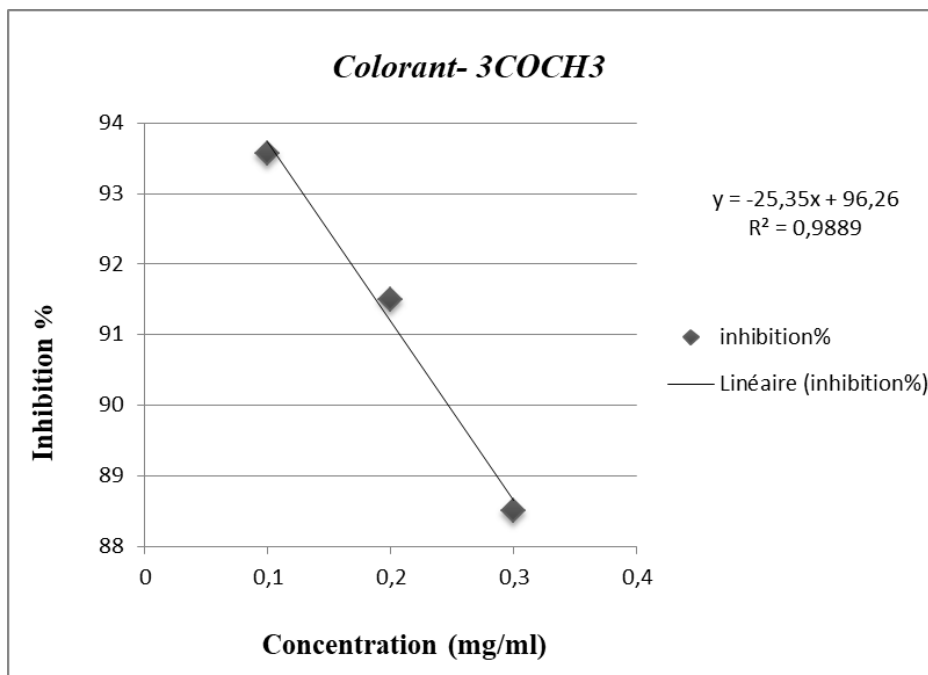


Figure 41 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

•3ème répétition dans 45 min

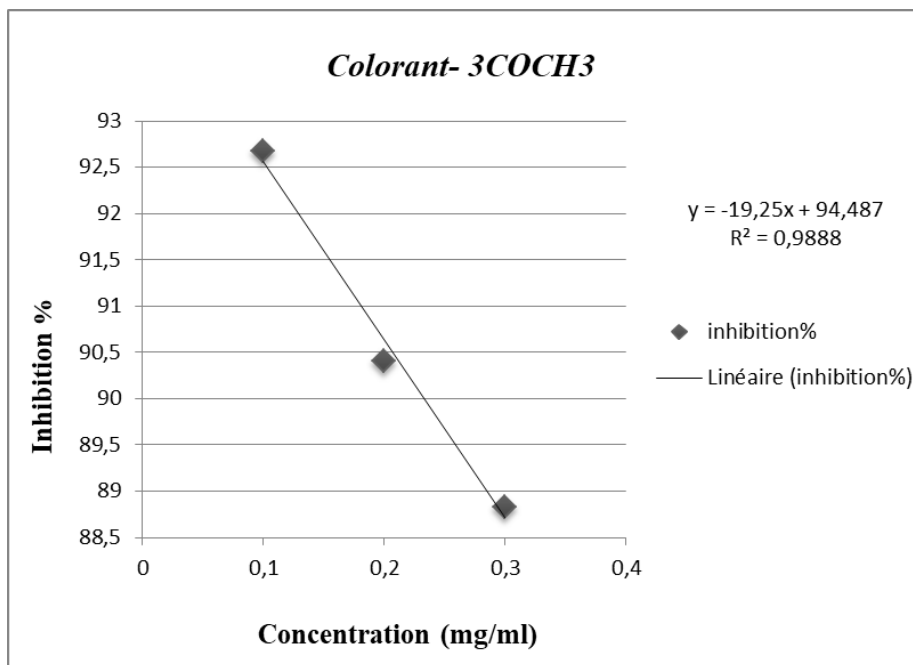


Figure 42: Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR3.

➤ **Colorant : (E)-4-(2-naphtolazo) benzenesulfonamide**

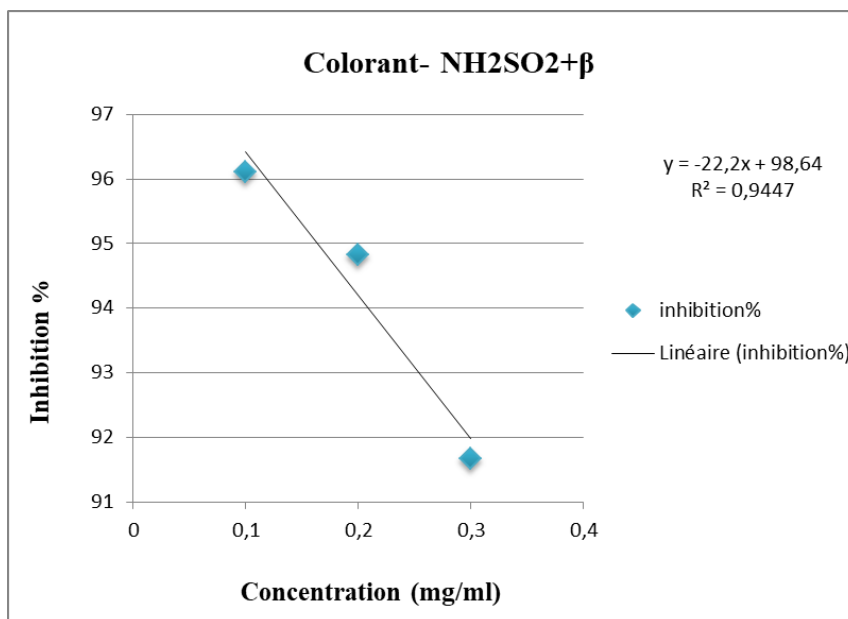
•1ère répétition dans 30 min

Figure 43 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

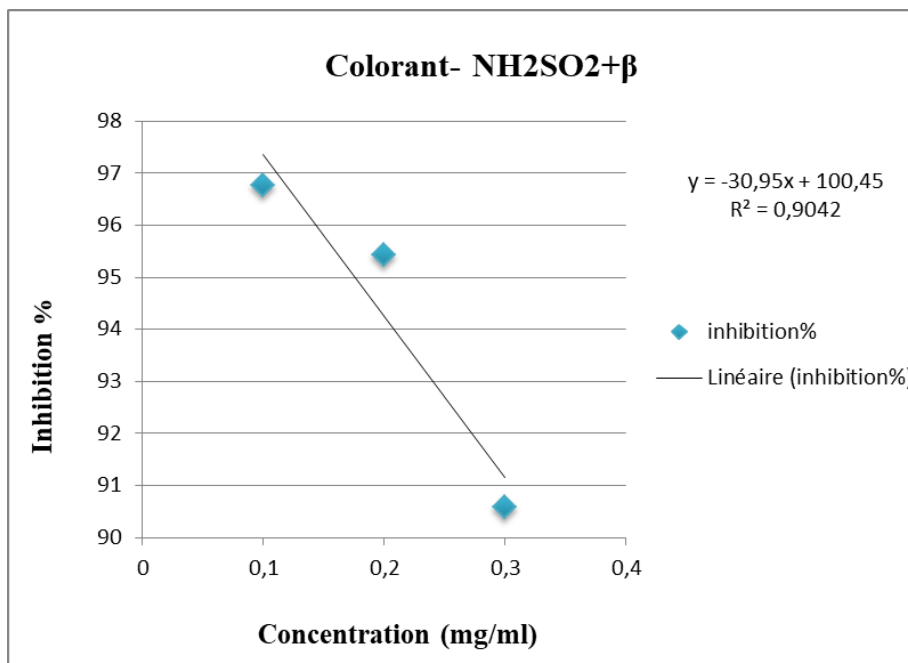
•2ème répétition dans 30 min

Figure 44 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

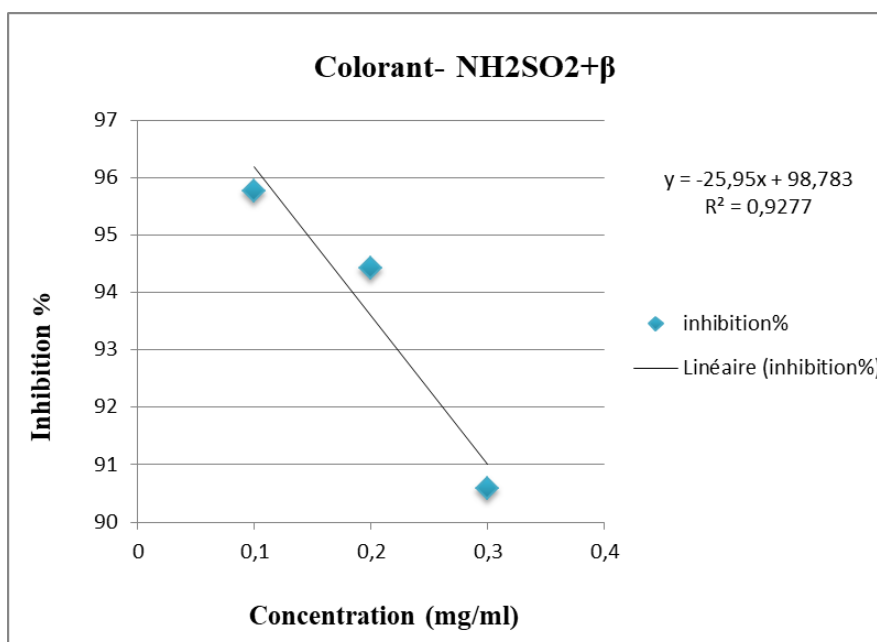
•3ème répétition dans 30 min

Figure 45 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

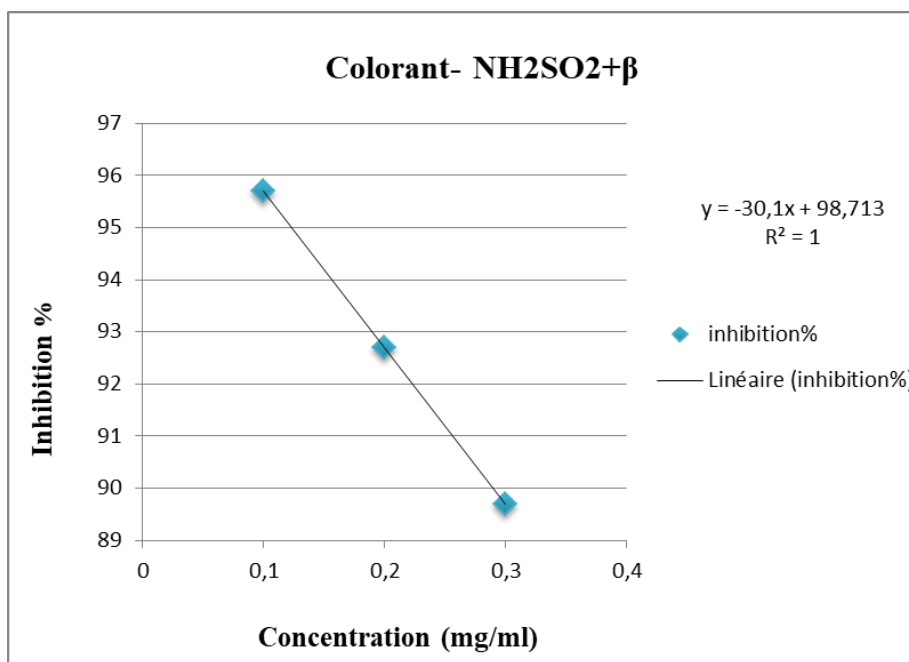
•1ère répétition dans 45 min

Figure 46 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

•2ème répétition dans 45 min

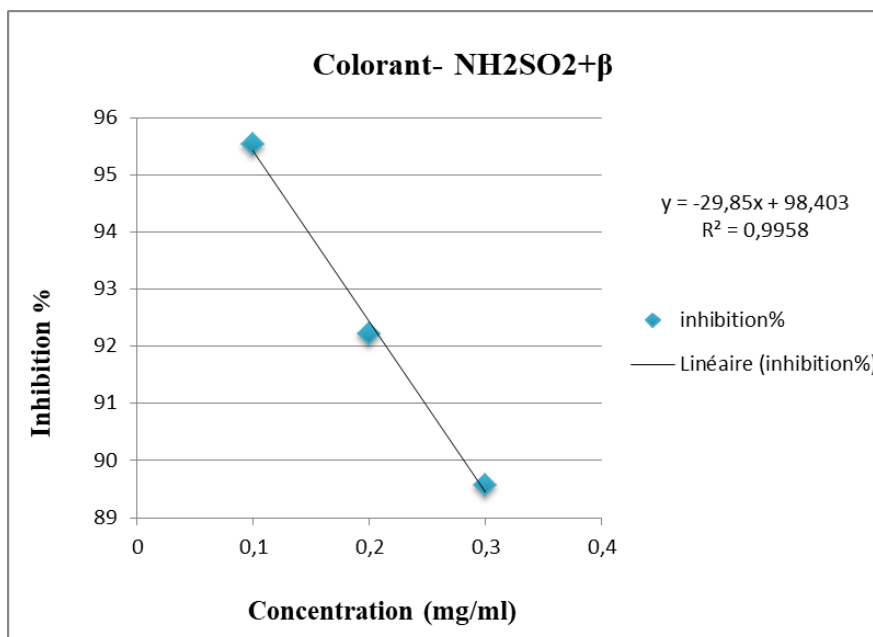


Figure 47: Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

•3ème répétition dans 45 min

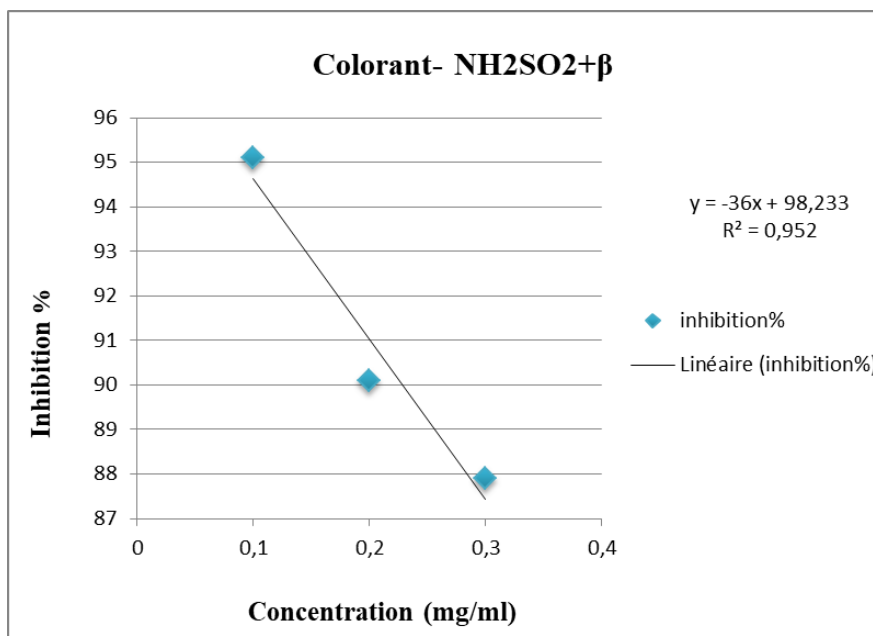


Figure 48 : Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de CLR4.

Annexe IV: Analyse statistique d'AAO

Variable dépendante: IC50

LSD

Tableau 05 : Comparaisons multiples entre les extraits.

(I) Extrait	(J) Extrait	Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95%	
					Borne inférieure	Limite supérieure
EXM BV	EXA BV	0,2347	0,24772	0,351	-0,2699	0,7393
	EXM DC	-0,5833*	0,24772	0,025	-1,0879	-0,0787
	EXA DC	1,4589*	0,24772	0,000	0,9543	1,9635
	CLR 1	0,7565*	0,24772	0,005	0,2519	1,2611
	CLR 2	0,0072	0,24772	0,977	-0,4974	0,5118
	CLR 3	-0,8482*	0,24772	0,002	-1,3528	-0,3436
	CLR 4	-0,1068	0,24772	0,669	-0,6114	0,3978
	EXM BV	-0,2347	0,24772	0,351	-0,7393	0,2699
EXA BV	EXM DC	-0,8180*	0,24772	0,002	-1,3226	-0,3134
	EXA DC	1,2242*	0,24772	0,000	0,7196	1,7288
	CLR 1	0,5218*	0,24772	0,043	0,0172	1,0264
	CLR 2	-0,2275	0,24772	0,365	-0,7321	0,2771
	CLR 3	-1,0828*	0,24772	0,000	-1,5874	-0,5782
	CLR 4	-0,3415	0,24772	0,178	-0,8461	0,1631
	EXM BV	0,5833*	0,24772	0,025	0,0787	1,0879
	EXA BV	0,8180*	0,24772	0,002	0,3134	1,3226
EXM DC	EXA DC	2,0422*	0,24772	0,000	1,5376	2,5468
	CLR 1	1,3398*	0,24772	0,000	0,8352	1,8444
	CLR 2	0,5905*	0,24772	0,023	0,0859	1,0951
	CLR 3	-0,2648	0,24772	0,293	-0,7694	0,2398
	CLR 4	0,4765	0,24772	0,063	-0,0281	0,9811
	EXM BV	-1,4589*	0,24772	0,000	-1,9635	-0,9543
	EXA BV	-1,2242*	0,24772	0,000	-1,7288	-0,7196
	EXM DC	-2,0422*	0,24772	0,000	-2,5468	-1,5376
EXA DC	CLR 1	-0,7024*	0,24772	0,008	-1,2070	-0,1978
	CLR 2	-1,4517*	0,24772	0,000	-1,9563	-0,9471
	CLR 3	-2,3071*	0,24772	0,000	-2,8117	-1,8025
	CLR 4	-1,5657*	0,24772	0,000	-2,0703	-1,0611
	EXM BV	-0,7565*	0,24772	0,005	-1,2611	-0,2519
	EXA BV	-0,5218*	0,24772	0,043	-1,0264	-0,0172
	EXM DC	-1,3398*	0,24772	0,000	-1,8444	-0,8352
	EXA DC	0,7024*	0,24772	0,008	0,1978	1,2070
CLR 1	CLR2	-0,7493*	0,24772	0,005	-1,2539	-0,2447
	CLR 3	-1,6047*	0,24772	0,000	-2,1093	-1,1001
	CLR 4	-0,8633*	0,24772	0,001	-1,3679	-0,3587

CLR 2	EXM BV	-0,0072	0,24772	0,977	-0,5118	0,4974
	EXA BV	0,2275	0,24772	0,365	-0,2771	0,7321
	EXM DC	-0,5905*	0,24772	0,023	-1,0951	-0,0859
	EXA DC	1,4517*	0,24772	0,000	0,9471	1,9563
	CLR 1	0,7493*	0,24772	0,005	0,2447	1,2539
	CLR 3	-0,8553*	0,24772	0,002	-1,3599	-0,3507
	CLR 4	-0,1140	0,24772	0,648	-0,6186	0,3906
	EXM BV	0,8482*	0,24772	0,002	0,3436	1,3528
CLR 3	EXA BV	1,0828*	0,24772	0,000	0,5782	1,5874
	EXM DC	0,2648	0,24772	0,293	-0,2398	0,7694
	EXA DC	2,3071*	0,24772	0,000	1,8025	2,8117
	CLR 1	1,6047*	0,24772	0,000	1,1001	2,1093
	CLR2	0,8553*	0,24772	0,002	0,3507	1,3599
	CLR 4	0,7413*	0,24772	0,005	0,2367	1,2459
	EXM BV	0,1068	0,24772	0,669	-0,3978	0,6114
	EXA BV	0,3415	0,24772	0,178	-0,1631	0,8461
CLR 4	EXM DC	-0,4765	0,24772	0,063	-0,9811	0,0281
	EXA DC	1,5657*	0,24772	0,000	1,0611	2,0703
	CLR 1	0,8633*	0,24772	0,001	0,3587	1,3679
	CLR2	0,1140	0,24772	0,648	-0,3906	0,6186
	CLR 3	-0,7413*	0,24772	0,005	-1,2459	-0,2367

En fonction des moyennes observées.

Le terme d'erreur est Carré moyen(Erreur) = 0,184.

*. La différence des moyennes est significative au niveau 0,05.