



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et santé*

Intitulé :

Etude phytochimique et biologique d'une plante médicinale Algérienne du Genre *Genista* (Fabaceae)

Présenté et soutenu par :

Le : 09-06-2016

✓ DJEGHIM Hanène

Jury d'évaluation :

Président du jury : Gherboudj Ouissem

MCB. UFM Constantine

Rapporteur : BOUTAGHANE Naima

MCB. UFM Constantine

Examineur : SEMRA Ilhem

MAA. UFM Constantine

Année universitaire

2015– 2016



Dédicace

Mes remerciements vont tout d'abord au bon dieu pour la volonté et la patience qu'il m'a donné durant ces longues années d'étude afin que je puisse arriver à ce stade

Du fond de mon cœur, je dédie ce présent travail :

*A celle qui est sacrifiée pour mon éducation, qui est ma source de tendresse de don et de confiance qui attendu ma réussite ma chère **mère : Fatima** qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance avec mes vœux de bonne santé et de longue vie*

*A mon cher père : **Ammar***

*A mes sœurs : **Amina, Nadia, Sabrina, et Naouel***

*A mes frères : **Chaouki, Faycal, Billel***

*A mes amies : **Dallel, Esma, Ibtissem et Hadjer** et que notre amitié dure pour toujours*

*A mes collègues : **Chaouki, Boubekour et Naouel***

*Je ne peux conclure ce mémoire sans montré ma sincère gratitude et mes grands remerciements à mon **encadreur : BOUTAGHANE Naima** pour son dévouement exemplaire et ses conseils constructifs, pour leurs modestie, leur générosité et leur encouragement*

*Enfin je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail particulièrement **Mr Mebrek Saâd***

Hanène

Remerciement

Ce travail de mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques de l'université de Constantine sous la direction du Professeur **KABOUCHE Zafia**, le laboratoire de biochimie et de microbiologie de centre de recherche en biotechnologie dirigé par le professeur **Benbouza Halima**.

La réalisation d'un mémoire est la somme d'un travail collectif où l'apport de chacun, bien que d'importance inégale, est toujours indispensable et précieux.

Bien évidemment, un grand merci au Docteur **BOUTAGHANE Naïma** qui m'a encadré pendant 5 mois. Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience pendant des intenses et rationnelles discussions qui m'ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Pour tout cela et aussi pour son aide, sa confiance et son soutien moral, je la remercie vivement.

Je tiens aussi à remercier Mme **Gherboufj Ouissem** Maître de conférence classe B à l'université de Constantine d'avoir accepté de Présider les membres du Jury.

Mes remerciements vont également à Mme **SEMRA Ilhem** Maître assistante classe A à l'université de Constantine d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

A Mr **Bensuici Cahhouki** et Mr **Salmania Abd el rahman**, Chefs de laboratoire de Biochimie et Microbiologie du CRBT, A **Esmâ et Assia** les ingénieurs de laboratoire de microbiologie du CRBT, et **Bchkrî sarah** doctorante au laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques de l'université de Constantine pour son aide opulente, et la grâce qu'ils m'ont firent en mettant au service de mon étude son savoir et sa compétence.

Un remerciement et une gratitude très spéciale au membre de ma famille.

Je remercie aussi mes "binômes non officiels": **Saâd, Ibtissem, Amina, et Esmâ** Du CRBT.

J'exprime mes vifs remerciements à **Dallel et Hadjer** mes chères amies pour leurs soutient moral.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de Master pour leur aide, et surtout pour tous les bons moments passés en leur compagnie notamment **Yacer, Linda, Kenza et Nadia**.

Merci pour tous ceux qui ont participé à la réussite de ce mémoire. J'espère bien que ce modeste travail pourra servir aux générations qui viennent et rajouter quelque chose dans le domaine de la recherche.

Hanène



Table des matières

❖ Introduction générale	1
❖ Revue Bibliographique	
Chapitre I : Aperçu bibliographique sur le Genre <i>Genista</i>	
I. L'ordre des Fabales	3
I.1. Famille des Fabaceae	3
I.1.1. Position systématique de la Famille des Fabaceae	3
I.1.2. Description botanique	4
I.1.3. Répartition géographique	4
I.1.4. Etudes chimiques antérieures	4
I.2. Présentation du Genre <i>Genista</i>	4
I.2.1. Principaux métabolites secondaires du Genre <i>Genista</i>	5
I.2.2. Quelques activités biologiques reconnues	8
I.3. Distribution et place dans la systématique du Genre <i>Genista</i>	9
Chapitre II : Les Métabolites Secondaires	
II. Les Composés phénoliques	10
II.1. Les Flavonoïdes et les isoflavonoïdes	10
II.1.1. Propriétés structurales et classification	11
II.1.2. Les Voies de biosynthèse des flavonoïdes.....	12
II.1.3. Intérêt biologique des flavonoïdes	14
III. Les Composés Terpéniques	14
III.1. Les Terpènes	14
III.1.1. Propriétés structurales et classification	15
III.1.2. Propriété Biologiques des Triterpènes	15
➤ La Cytotoxicité	16
➤ Activité Anti-Inflammatoire	16
III.2. Les Saponines	16
III.2.1. Propriétés structurales et classification	17
III.2.2. Voie de biosynthèse des Saponines	17
III.2.2.1. Génines Triterpéniques.....	17
III.2.2.2. Génines Stéroïdiques	18
III.2.2.3. Les Sucres	19
III.2.2.4. Les Acides Organiques	19
III.2.3. Propriété biologiques des saponines	19

➤ Activité Hémolytique	20
➤ Activités Cytotoxique et Antitumorale	20
➤ Activité immunomodulatrice	20
➤ Autres Activités	20

Chapitre III : Antioxydants et Activités Biologiques

III.1. Généralités	21
III.2. Le stress oxydatif	21
III.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène	22
III.2.2. Les cibles biologiques des EOA	22
III.2.2.1. Peroxydation lipidique	22
III.2.2.2. Oxydation des protéines	23
III.2.2.3. Oxydation de l'ADN	24
III.3. Les Antioxydants	24
III.3.1. Les antioxydants enzymatiques	24
III.3.2. Les antioxydants non enzymatiques	25
III.4. Mécanisme d'action des antioxydants	26
III.5. Quelques activités biologiques antioxydantes	26
III.5.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	26
III.5.2. Teste de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•	27
III.5.3. Teste de Blanchissement de la Béta-carotène	27
III.5.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	27
III.6. Autre activités biologique	28
III.6.1. L'activité antimicrobienne	28
III.6.2. La Bioautographie	28
III.6.2.1. Bioautographie de contact	28
III.6.2.2. Bioautographie directe	29
III.6.2.3. Bioautographie « agar overlay »	29
III.6.3. Test de cytotoxicité contre l'artémia	30

❖ Matériel et Méthodes

Chapitre IV : Partie Expérimentale

IV.1. Aperçu et but de travail	31
IV.2. Matériel et méthodes	31
IV.2.1. Matériel végétal	31
IV.2.1.1. Description de la zone de la récolte	31

IV.2.1.2. Récolte de la plante du Genre <i>Genista</i>	32
IV.2.2. Matériel Chromatographique	32
IV.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	32
IV.2.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	32
IV.2.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	32
IV.2.2.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	33
IV.2.3. Méthode physico-chimique	33
IV.2.3.1. Spectroscopie de RMN	33
IV.2.3.2. Spectrophotométrie UV-visible	33
IV.3. Etude d'une plante du Genre <i>Genista</i>	33
IV.3.1. Extraction des feuilles et fleurs de la plante	33
IV.4. Criblage « screening » phytochimique par réactions colorées	34
IV.4.1. Mise en évidence des alcaloïdes	35
IV.4.1.1. Révélation par le réactif de Dragendorff	35
IV.4.1.2. Révélation par le réactif de Mayer	35
IV.4.2. Mise en évidence des polyphénols	35
IV.4.2.1. Réaction de la cyanidine	35
IV.4.2.2. Révélation par le réactif de Stiasny	35
IV.4.3. Mise en évidence des saponines	36
IV.4.3.1. Indice mousse	36
IV.4.3.2. Mise en évidence des triterpènes	36
IV.5. Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique de l'espèce du Genre <i>Genista</i>	37
IV.6. Evaluation des activités biologiques de l'extrait chloroformique et méthanolique de l'espèce du Genre <i>Genista</i>	39
IV.6.1. L'activité antioxydante	39
IV.6.1.1. Les antioxydants standard	39
IV.6.1.2. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	40
IV.6.1.3. Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•.....	42
IV.6.1.4. Teste de Blanchissement de la Béta-carotène	43
IV.6.1.6. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	44
IV.6.2. L'activité anti bactérienne	45
IV.6.2.1. description et principe de la Bioautographie	45
IV.6.2.2. préparation des plaques CCM	45
IV.6.2.3. préparation des souches microbiennes	45

IV.6.2.4. préparation de l'inoculum	46
IV.6.2.5. Révélation	46
IV.6.3. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia	47
IV.6.3.1. Description de l'activité de Cytotoxicité.....	47
IV.6.3.2. Protocole	47

Chapitre V : Résultats et discussion

V. Criblage « screening » phytochimique par réactions colorées	48
V.1. Recherche des alcaloïdes	48
V.2. Recherche des flavonoïdes	48
V.3. Recherche des tanins condensés	49
V.4. Recherche des stérols et triterpènes	5
V.4. Recherche des Saponosides	50
V.5. Description des profils chromatographique de l'HPLC	52
V.6. Détermination structurale du composé GN1	53
V.7. Détermination structurale du composé GN2	57
V. 8. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	58
VI. 8.1. Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)....	59
VI. 8.2. Activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•	62
VI. 8.3. Teste de Blanchissement de la Béta-carotène	64
VI. 8.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	67
VI.9. La bioautographie	69
VI. 10. Test de cytotoxicité contre l'artémia	70
❖ Conclusion générale.....	73

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les métabolites secondaires isolé à partir des plantes de genre *Genista*.

Tableau 02 : Mécanisme d'action de quelques antioxydants.

Tableau 03 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait butanolique pour la mesure de l'indice de mousse.

Tableau 04 : Schéma d'évaporation de des fractions de la VLC.

Tableau 05 : Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait chloroformique.

Tableau 06 : Conditions de préparation des souches bactériennes.

Tableau 07 : Résultats de recherche des alcaloïdes.

Tableau 08 : Résultats de recherche des flavonoïdes.

Tableau 09 : Résultats de recherche des tanins condensés et galliques dans les 3 extraits.

Tableau 10 : Résultats de recherches des stérols et triterpènes.

Tableau 11 : Résultats de recherche des saponosides.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats.

Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du GN1 dans CD_3OD .

Tableau 14 : Gamme de dilution du standard.

Tableau 15 : Résultats de l'activité de cytotoxicité des larves de l'artémia.

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

APG : Angiosperm Phylogeny Group.

BHA : Hydroxyanisole butylé.

BHI : Brain Heart Infusion Agar.

BHT : butyl-hydroxy-toluène.

CC : Chromatographie sur colonne ouverte.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CHCl₃ : Chloroforme.

CL₅₀ : Concentration létale 50.

CLHP : Chromatographie liquide haute performance.

CUPRAC : Cupric Réducing Antioxidant Capacity.

DL₅₀ : Dose létale 50.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.

EOA : Espèces oxygénées activées.

ERO : espèces réactives oxygénées.

GC : Chromatographie en phase gaz.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50.

IM : Indice de mousse.

INT : Para-iodonitrotétrazolium.

J (Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz.

LDL : lipoprotéine de basse densité

m : multiplet.

M.A.T.E : Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement.

MeOH : Méthanol.

MTT : Méthylthiazolyl-tétrazolium.

ppm : parties par million.

R_f : Rapport frontal.

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

RMN1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

SOD : Superoxyde dismutase.

VLC : Chromatographie liquide sous vide.

δC : Déplacement chimique du carbone en ppm.

δH : Déplacement chimique du proton en ppm.

Liste des figures

Figure 01 : Carte de répartition de la famille Fabaceae.

Figure 02 : Espèce *Genista numidica* spach.

Figure 03 : Structures des alcaloïdes isolés de *G. ephedroides*.

Figure 04 : Structures des alcaloïdes isolés de *G. cinerea*.

Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes.

Figure 06 : Différentes classe de flavonoïdes.

Figure 07 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes.

Figure 08 : Différentes classes de triterpénoïdes.

Figure 09 : Structure du 2,3-époxydosqualène.

Figure 10 : Exemples de génines triterpéniques.

Figure 11 : Principaux squelettes stéroïdiques.

Figure 12 : Les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides

Figure 13 : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection.

Figure 14 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

Figure 15 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.

Figure 16 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

Figure 17 : Révélation des zones d'inhibition dans le cas des bioautographies directe ou "agar overlay".

Figure 18 : El Aouana wilaya de Jijel.

Figure 19 : Différentes étapes de l'extraction des feuilles et fleurs de la plante.

Figure 20 : Fractionnement de l'extrait CHCl₃ par VLC.

Figure 21 : Plaques CCM récapitulatives des fractions de la VLC.

Figure 22 : Fractionnement de la fraction F7 par CC.

Figure 23 : Quelques antioxydants synthétiques.

Figure 24 : Mécanisme de la réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.

Figure 25 : Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+}.

Figure 26 : Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II).

Figure 27 : Préparation de l'inoculum.

Figure 28 : Mise en évidence des tanins condensés.

Figure 29 : Caractéristique des saponosides.

Figure 30 : Chromatogrammes CLHP analytique de l'extrait méthanolique des feuilles-fleurs de la plante à 280 nm.

Figure 31 : Chromatogramme CLHP analytique de l'extrait méthanolique des feuilles-fleurs à 325 nm de la plante.

Figure 32 : spectre UV du composé GN1.

Figure 33 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH et NaOH.

Figure 34 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH, NaOAc et H₃BO₄.

Figure 35 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH, AlCl₃ + HCl.

Figure 36 : Spectre RMN ¹³C DEPT du composé GN1

Figure 37 : Spectres de RMN ¹H composé GN1.

Figure 38 : Structure de la Génistéine.

Figure 39 : Spectres de RMN ¹H composé GN 2.

Figure 40 : Mise en évidence de l'activité antiradicalaire

Figure 41 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de la plante.

Figure 42 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

Figure 43 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH).

Figure 44 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par différents extraits de la plante.

Figure 45 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

Figure 46 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS).

Figure 47 : Suivie de la cinétique des différents échantillons testés.

Figure 48 : Valeurs des IC₅₀ exprimées en µg / ml des échantillons étudiées classes en ordre croissant.

Figure 49 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (Test de blanchiment du B-Carotène).

Figure 50 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents extraits de la plante.

Figure 51 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

Figure 52 : Résultats de la Bioautographie.

Figure 53 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique et chloroformique.

Figure 54 : Courbe de % d'inhibition en fonction de la dose létale.

Figure 55 : Histogramme des CL_{50} des extraits et du standard.

Introduction Générale

❖ Introduction générale

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av. J.C). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations récoltées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (**Fouché et al., 2000**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mises à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composées on retrouve, dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (**Bahorun, 1997**). Il y a eu encore un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes.

D'après Le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (M.A.T.E, 2005), Le territoire algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et autour des points d'eau, ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région.

En Algérie, les plantes médicinales forment un groupe relativement important mais avec un nombre modeste d'espèces étudiées pour une ou plusieurs activités biologiques ou d'un point de vue phytochimique. Parmi les nombreuses plantes médicinales encore non étudiées qui peuplent la riche flore algérienne, réservoir inestimable de molécules bioactives, nous avons sélectionné une espèce végétale du Genre *Genista*. Appartenant à la famille des Fabaceae pour une étude phytochimique et biologique.

Parmi les 700 genres de la famille des fabacées, en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espèces (**Quazel et santa, 1963**). Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail à une espèce des 150 du genre *Genista* réparties en Europe et en région méditerranéenne notamment en Algérie (**Maire, 1987**).

De nombreuses substances naturelles ont été isolées des gènes à savoir, les alcaloïdes (**Tosun et al., 1987; Pistelli et al., 2001**) et les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes et les

isoflavonoïdes (**Pistelli et al., 1998 ; Pistelli et al., 2000**). Ces composés sont doués d'activités biologiques potentielles comme l'activité antihyperglycémiant, antioxydante et cytotoxique (**Rauter et al., 2009**) anti- Alzheimer (**A.R. Jesus et al., 2014**), ainsi que les activités antiinflammatoire, antiprolifératives et anti tumoral (**Rauter et al., 2009**).

D'après les recherches bibliographiques ; cette espèce a fait l'objet d'un nombre restreint des screening phytochimiques ; ce peu de travail mené sur cette espèce et la diversité du genre *Genista* et de la famille des légumineuses ; nous a encouragé à étudier cette espèce.

Notre travail sera présenté comme suit :

- Le premier chapitre concerne l'étude bibliographique. Cette étude commence par une description botanique du genre *Genista*, suivi par des travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, reporte également les résultats relatifs aux activités biologiques et l'utilisation dans la médecine traditionnelle des plantes du genre *Genista*.
- Le deuxième chapitre porte sur une étude des composés phénoliques (flavonoïdes et isoflavonoïdes) et saponosides tout en présentant leurs définitions classifications, biogénèses et propriétés biologiques.
- Le troisième chapitre présente les différents antioxydants, leurs classifications et leurs modes d'action.
- Un quatrième chapitre est consacré à la présentation des méthodes d'extraction de la partie aérienne de la plante du *Genista*, à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités, antioxydante (CUPRAC, B-Carotène), anti radicalaire (DPPH, ABTS), l'activité cytotoxique ainsi que l'activité antibactérienne de cette espèce.
- Enfin un cinquième chapitre qui présente les résultats obtenus, leurs discussion et leurs comparaison avec des études antérieures réalisée sur des plantes du même Genre.



CHAPITRE : 01
Aperçu bibliographique
sur le Genre *Genista*

I. L'ordre des Fabales

Les Fabales constituent un ordre de plantes Dicotylédones (**Chase *et al.*, 1993**). En classification classique de Cronquist, les Fabales renferment les familles suivantes : *Caesalpiniciacées*, *Mimosacées* et *Fabacées* ou *Papilionacées* (famille du haricot) (**Cronquist, 1981**).

I.1. Famille des Fabaceae

La famille Fabaceae ou Leguminosae constitue la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Ses plantes ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (**Shaiq *et al.*, 2001**). Les plantes Fabaceae sont généralement de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*). Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques (**Spichiger *et al.*, 2002**).

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical. Leur métabolisme dépendant de l'azote est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (**Wojciechowski *et al.*, 2004**).

I.1.1. Position systématique de la Famille des Fabaceae

Selon l'Angiosperm Phylogeny Group III (2009) les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles : les *Bauhinioïdes*, *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* ou *Faboïdeae*. Cette dernière constitue la plus grande sous-famille des *Fabaceae* avec 28 tribus, 478 genres et environ 13800 espèces dont 97% parmi les espèces testées sont nodulées (**De Faria *et al.*, 1989**) et les membres de cette sous-famille sont principalement des herbacées.

L'analyse des relations phylogénétiques des légumineuses est essentielle pour comprendre l'origine et la diversification de cette importante famille des angiospermes d'un point de vue écologique et économique (**Wojciechowski *et al.*, 2004**).

I.1.2. Description botanique

Les plantes de cette famille sont à feuilles simples ou composés ordinairement alternes et stipulées parfois plus ou moins entièrement transformées en vrilles, les fleurs sont généralement hermaphrodites régulières ou irrégulières, habituellement pentacyclique et pentamère sauf au niveau du gynécée qui est unicarpellé (Quezel et Santa, 1962).

I.1.3. Répartition géographique

La famille est particulièrement concentrée dans les régions subtropicales et tempérées chaudes (figure 01), comme en Afrique du sud ou sur le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées regorgent des espèces herbacées (Plantes-botanique.org, 2012).

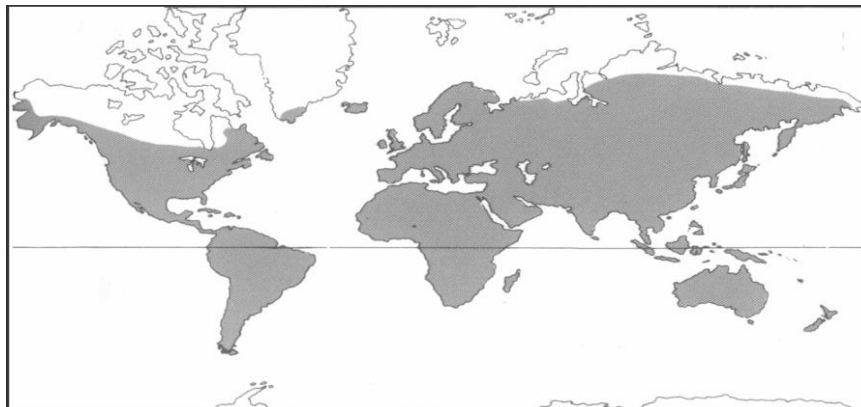


Figure 01 : Carte de répartition de la famille des Fabaceae (Heywood, 1996).

I.1.4. Etudes chimiques antérieures

Les recherches bibliographiques réalisées sur cet axe montre que la majorité d'études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Fabaceae certifie la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires. Les métabolites les plus importants sont: les alcaloïdes (Keeler, 1989 ; Huxtable, 1990), les coumarines (Estévez-Braun et Gonnzalles, 1997), les composés phénoliques de type flavonique et isoflavonique (Bilia *et al.*, 1993; Farag *et al.*, 2001), et en petites quantités les stéroïdes (Muhammad *et al.*, 2001) et les saponosides (Ibraheim et Khalifa, 2000).

I.2. Présentation du Genre *Genista*

Parmi les 700 genres de la famille des Fabaceae, en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espèces (Quezel et Santa, 1962). Le genre *Genista* compte environ 150 espèces réparties en Europe et en région méditerranéenne (Bruneton, 1999). D'après la bibliographie, ce genre

montre une richesse en composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses. Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des Légumineuses, sous famille Papilionacées et à la tribu des Genistées. Quezel et Santa, en 1963, comptent pour ce genre 23 espèces en Algérie dont 11 endémiques (Maire, 1987).

Le genre *Genista* a un calice campanulé à 5 dents subégales et 5 segments dont les deux supérieurs sont libres ou soudés. Les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes. La carène est oblongue et droite ou presque biggibeuse latéralement avec un étendard étroit qui comprend 10 étamines monadelphes en tube non fendu constitué de 5 longues et 5 courts stigmates oblique avec gousse déhiscente. Les feuilles formé de 1 à 3 foliole stipulées ou non et des graines non arillés (Quezel et Santa, 1962).

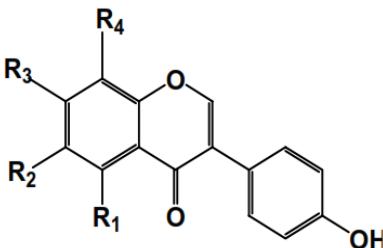
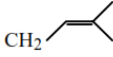
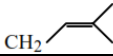
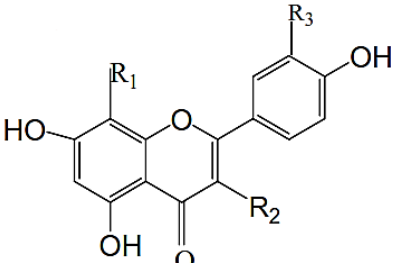
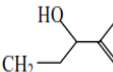
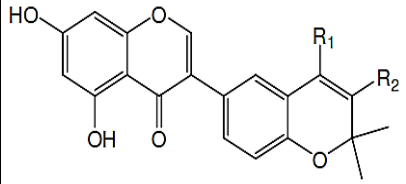


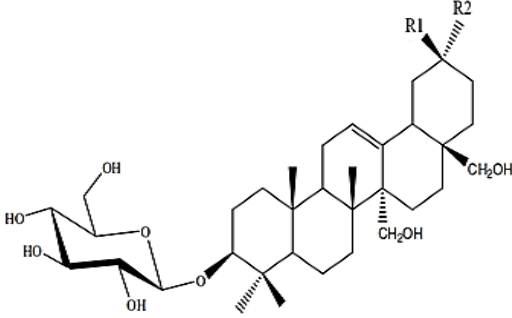
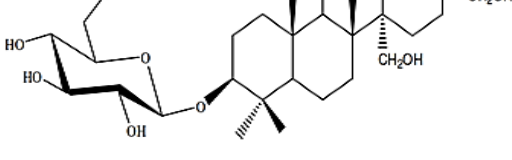

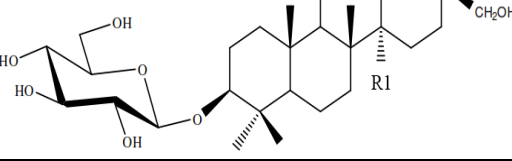
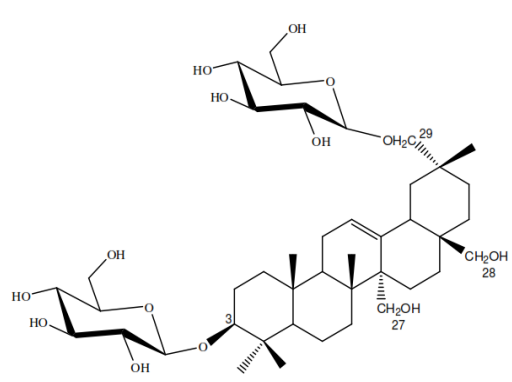
Figure 02 : Espèce *Genista numidica* Spach (Gdebelair.com, 2015).

I.2.1. Principaux métabolites secondaires du Genre *Genista*

Le genre *Genista* est connu pour contenir une variété de métabolites secondaires de divers types, notamment des alcaloïdes (Rensen *et al.*, 1994) des flavonoïdes, et des isoflavonoïdes qui sont biologiquement actifs (Pistelli *et al.*, 1998, 2000; Giachi *et al.*, 2002; Tosun *et al.*, 2009 ; Mekkiou *et al.*, 2012). Le tableau 1 présente le contenu en flavonoïdes, isoflavonoïdes, et saponosides ainsi que leurs structures respectives de certaines espèces du genre *Genista*.

Tableau 01 : Les métabolites secondaires isolé à partir des plantes de genre *Genista*

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	Structure de base	R1	R2	R3	R4	Références
Flavonoïdes et isoflavonoïdes							
<i>G. ephedroides</i>	Génistéine		OH	H	OH	H	(Pistelli et al., 1998)
	Isoprunétine		OCH ₃	H	OH	H	
	Wighteone		OH		OH	H	
	Génistine		OH	H	Oglc	H	
	Génisteone		OH		Oglc	H	
	8-C-glucoside génistéine		OH	H	OH	glc	
	Apigénine		H	H	H		
	Ephedroïdine			H	H		
	Isokaempféride		H	OCH ₃	OH		
<i>G. corcica</i>	Isoderrone		H	H			(Pistelli et al., 2000)
	Ficuisoflavone		H	OH			
	Dihydroisoderrondiol		OH	OH			

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	Structure de base	R1	R2	Références
Saponosides					
<i>G. ulicina</i>	acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,triol-29-carboxylique		CH ₂ OH		(Boutaghane, 2013)
	3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,30-tétraol			COOH	
	acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,28,29-triol-27-carboxylique		COOH		
	3-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol		CH ₂ OH		
	3-O-β-D-glucopyranosyl, 29-O-β-D-glucopyranosyl-oléan-12-ène-3β,27,28,29-tétraol				

Le genre *Genista* comprend également des alcaloïdes. L'investigation phytochimique de la plante *G. ephedroides* (Pistelli *et al.*, 2001) a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes dont : la quinolizidine (figure 3): Retamine (1), Anagryrine(2), Lupanine (3). Leurs structures ont été identifiées par la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse GC/MS.

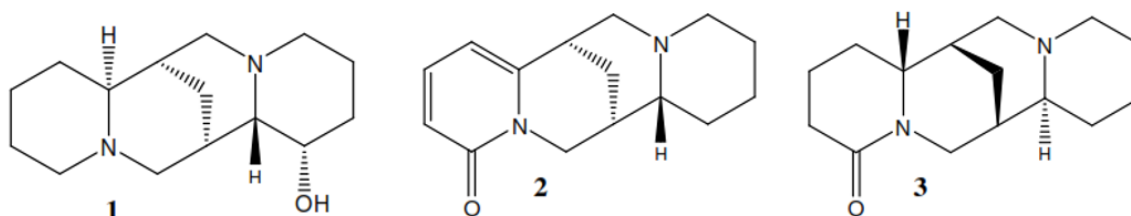


Figure 03 : Structures des alcaloïdes isolés de *G. ephedroides* (Pistelli *et al.*, 2001).

Dans une étude réalisée sur l'espèce *G. cinerea* Rensen (Rensen *et al.*, 1994), a pu caractériser deux alcaloïdes esters (figure 4) : Cineverine (4), et le 13 α -hydroxylupanine (5).

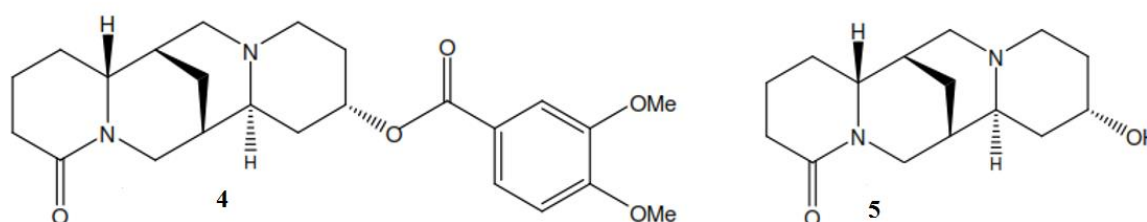


Figure 04 : Structures des alcaloïdes isolés de *G. cinerea* (Rensen *et al.*, 1994).

I.2.2. Quelques activités biologiques reconnues

Genista tenera est une plante utilisée pour sa propriété anti-hyperglycémiant dans la médecine traditionnelle. L'extrait butanolique de cette plante a fait l'objet d'une investigation biologique mené par Amélia P. Rauter et ses collaborateurs en 2009 (Rauter *et al.*, 2009). En plus de l'activité anti-hyperglycémiant remarquable une étude complète des extraits d'acétate d'éthyle, éther diéthylique, butanolique et d'eau a été réalisé dans la mesure de tester l'activité antioxydante, anti-cholinestérase et la cytotoxicité.

L'extrait butanolique de la plante a montré une activité anti-hyperglycémiant importante réduisant significativement les niveaux de glucose dans le sang à des valeurs normales après 15 jours de traitement des rats wistar diabétiques induit par des doses élevées de la streptozotocin. La meilleure activité de piégeage des radicaux libres a été observé pour l'extrait d'acétate d'éthyle a des concentrations variant entre [48,7 % à 139,1 g / ml]. L'extrait d'acétate d'éthyle

a présenté également la plus importante activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (77,0% à 70,0 g/ml), cependant les tests de toxicité *in vitro* n'ont montré aucune preuve de cytotoxicité aiguë ou génotoxicité.

Une étude récente a été réalisée par A. R. Jesus en 2014 (**A.R. Jesus *et al.*, 2014**) à recommander fortement le 8- β -D-glucopyranosylgenistein comme une entité moléculaire promotrice d'investigation dans les troubles amyloïdiques associée à la maladie d'Alzheimer et au diabète.

L'activité ulcéroprotectrice a été testée pour plusieurs flavonoïdes isolés à partir de *Genista rumelica* chez des rats Wistar atteints d'un ulcère gastrique en 1988 par L. Rainova (**L. Rainova *et al.*, 1988**) l'investigation biologique de ces flavonoïdes a permis la démonstration d'une activité ulcéroprotectrice avec une faible toxicité pour une durée de traitement inférieure à 3 mois.

I.3. Distribution et place dans la systématique du Genre *Genista*

La position systématique du Genre *Genista* est la suivante (**APG III, 2009**) :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotyledonae

Ordre : Fabidées

Sous ordre : Fabales

Famille : Légumineuses (Fabaceae)

Sous famille : Papilionaceae

Genre : *Genista*

L'espèce étudiée existe en formation quasi-monospécifique sur les pentes de basse et moyenne altitude, que ce soit sur le versant nord ou sur le versant Sud ; elle peut aller jusqu'à 400 m d'altitude (**Toubal, 1998**). Elle est répartie sur les collines du littoral depuis le Cap Aokas dans la région de Bejaia jusqu'à Bône (Annaba), (**Maire, 1987**). Elle a été localisée dans l'Edough (Cap de Garde, Seraidi, Cap de Fer, Bellelieta, O.El-Aneb, Bou Khanta...) (**Toubal, *et al* 2011**)

CHAPITRE : 02
Les Métabolites Secondaires

II. Les Métabolites Secondaires

II.1. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant, après trans-amination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate). La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone qui les composent, en fonction de la nature de leur squelette carbone et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Cheynier *et al.*, 1997). Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques. Cependant les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008).

II.1.1. Les Flavonoïdes et les isoflavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles qui forment une grande partie des métabolites secondaires d'un grand nombre de variétés de plantes supérieures appartenant à la famille des polyphénols, formant ainsi l'ensemble des substances les plus répandues. Ils possèdent une diversité structurale très importante. En effet, plus de 9000 structures ont été identifiées (Bruneton, 1993, Bohm, 1999). Ces diverses structures se rencontrent aussi bien sous la forme libre (aglycone) que sous forme de glycosides. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes (Bruneton, 1993).

Le terme Flavonoïdes (de flavus, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6) (Agrawal et Markham, 1989). (Figure 05).

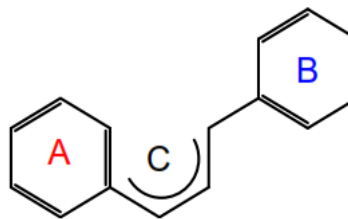


Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes.

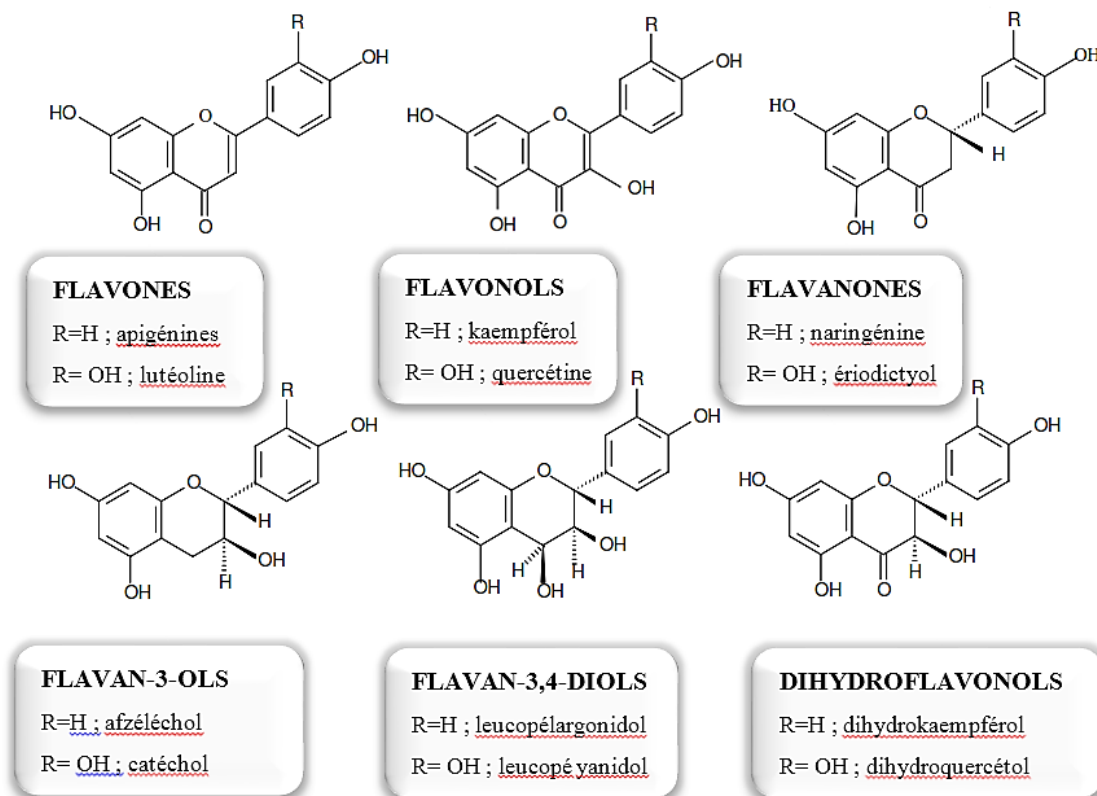


Les flavonoïdes sont de façon très générale localisés dans les feuilles, dans les fleurs ou encore dans les fruits (tégument externe) (**Bruneton, 1999**).

Les isoflavonoïdes forment une sous classe très large et très distinguée des flavonoïdes, toutes les molécules de ce groupe sont caractérisées par un squelette de 15 atomes de carbone comme les flavonoïdes mais réarrangé selon un motif 1, 2diphénylpropanique (**Dewick, 1993**). La distribution des isoflavonoïdes dans le règne végétal est très restreinte, elle est presque spécifique à la famille des Fabaceae (légumineuses), sous famille des Papilionaceae (**Dewick, 1993 ; Mann, 1987**).

II.1.2. Propriétés structurales et classification

Les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromone. Ils peuvent être regroupés en différents classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (**Narayane et al., 2001**). Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins (**Luthar, 1992, Middleton et Chithan, 1994**) (Figure 06).



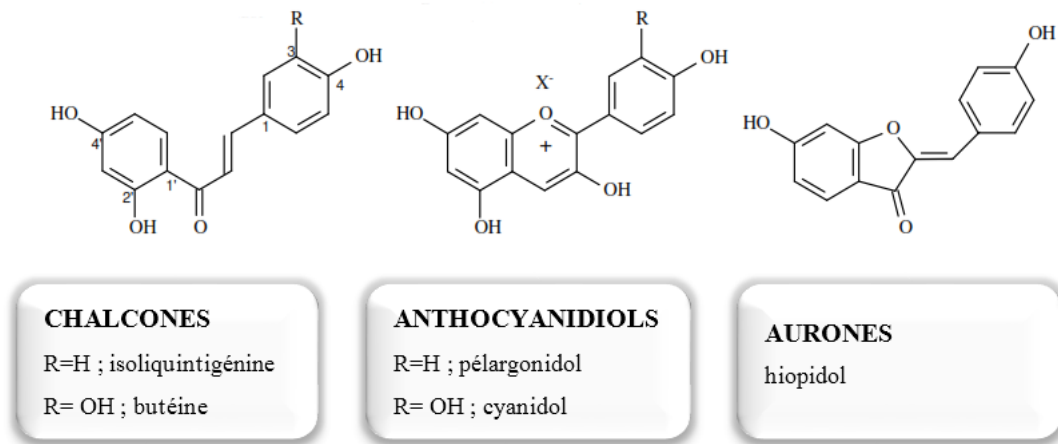


Figure 06 : Différentes classe de flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (**Bruneton, 1999**).

II.1.3. Les Voies de biosynthèse des flavonoïdes

La structure en C6-C3-C6 des flavonoïdes est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques, le noyau B et le pont carboné constituant une unité phénylpropanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétates via la voie de l'acide malonique. La fusion de ces deux parties implique la condensation d'un phénylpropanoïde, le 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la chalcone synthase, donnant ainsi le tétrahydroxy chalcone, qui va à son tour donner tous les flavonoïdes (**Crozier, 2003**). La structure de base des flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4,5,7. La plupart des flavonoïdes existent sous forme de glycosides, la nature du sucre variant grandement selon les espèces. Les substitutions modifient la solubilité des flavonoïdes, les hydroxylations et les glycosylations rendent les composés généralement plus hydrophiles, alors que d'autres

substitutions, telles que la méthylation, les rendent plus lipophiles (Rahman, 2005). (Figure 07).

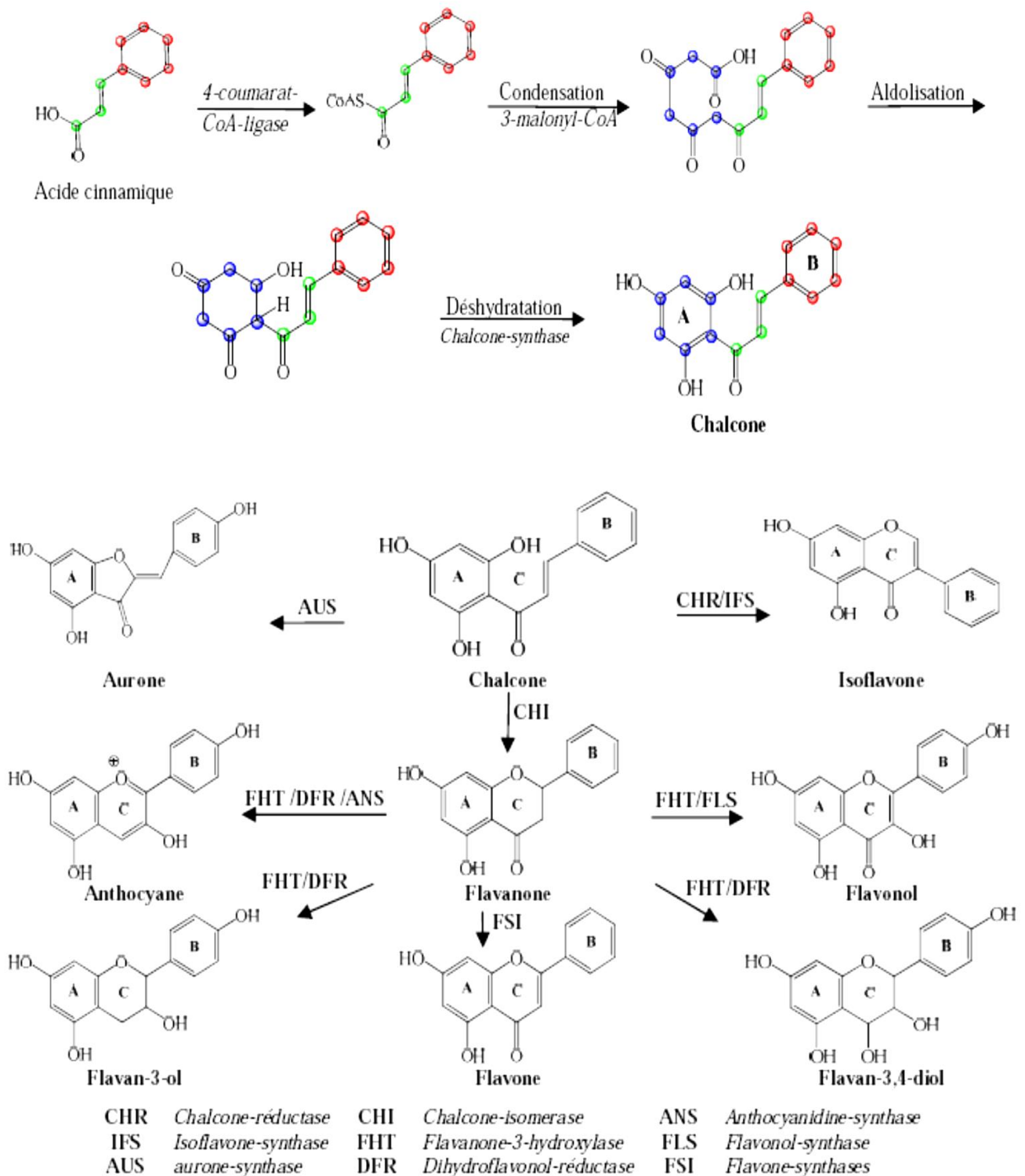


Figure 07 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes (Rahman, 2005).

II.1.4. Intérêt biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (**Manach *et al.*, 2004**). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes (**Bravo, 1998**). Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant (**Havsteen, 2002**). Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL (low density lipoprotein) et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (**Tu *et al.*, 2007**). Les flavonoïdes sont capables d'exercer en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcérogènes (**Di Carlo *et al.*, 1999**). Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur (**Woodman et Chan, 2004**). Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques » (**Middleton *et al.*, 2000**).

Une panoplie d'études *in vitro* ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (**Middleton *et al.*, 2000**), ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Récemment, plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (**Birt DF *et al.*, 2001**; **Yang *et al.*, 2001** ; **Ramos, 2007**).

II.2. Les Composés Triterpéniques

II.2.1. Généralités :

Les triterpénoïdes sont une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C₃₀, ce groupe est très répandu dans le règne végétal et animal. Ces composés sont issus de la cyclisation de l'époxysqualène et quelque fois du squalène. (**Manitto, P., 1981, Dey et Harborne., 1991, Bruneton 1999**).

Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3 étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. On dénombre plus de 4000 triterpènes, dérivés de plus de 40 types de squelettes, isolés des sources végétales. Ils peuvent être classés en trois groupes (**Bruneton 1999**). (Figure 08) :

- ❖ Acyclique comme le squalène, surtout rencontré dans le règne animal et qui se trouve également dans l'insaponifiable des huiles végétales (Olive, Lin, Arachide);
- ❖ Composés tétracycliques tels que les stéroïdes, les phytostérols et les cycloartanes;
- ❖ Composés pentacycliques très fréquents chez les plantes comme les α et β amyriines.

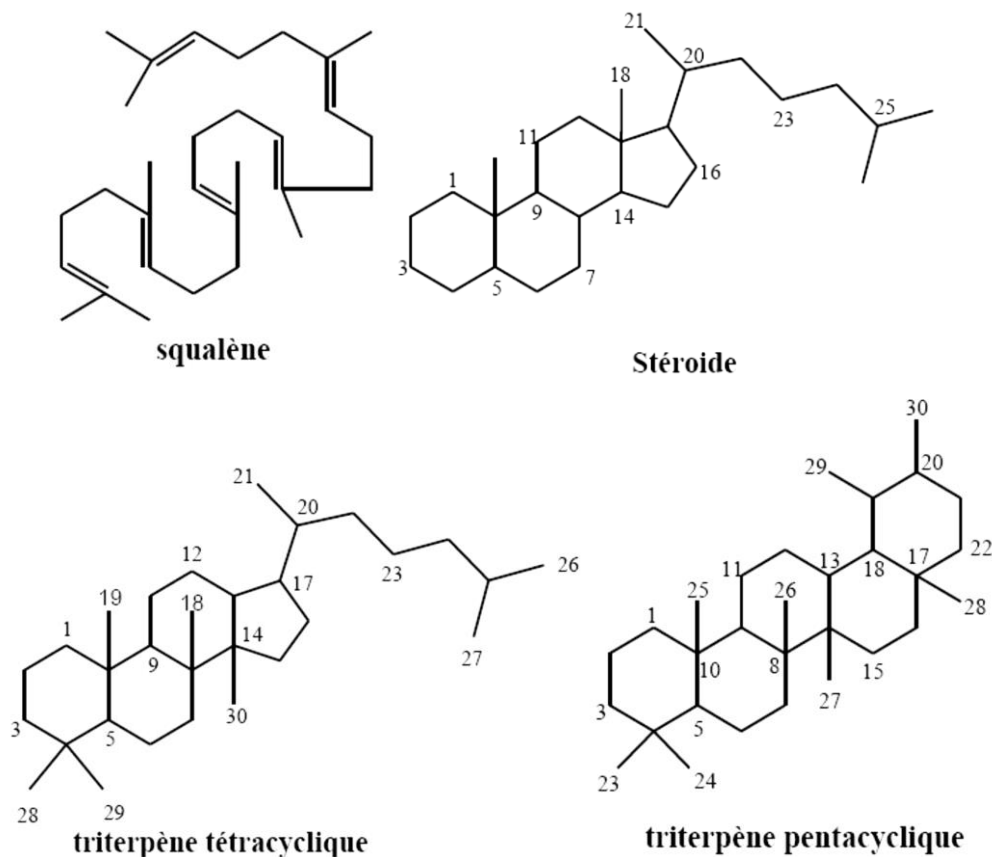


Figure 08 : Différentes classes de triterpénoïdes

II.2.2. Propriété biologiques des Triterpènes

Les triterpènes, au sens large, présentent un véritable panel d'activités biologiques *in vitro*. Ces activités sont aussi variées que le sont les structures triterpéniques. Peu d'expérimentations réalisées *in vivo* ont toutefois permis de valoriser ces activités (**Peirs, 2005**).

➤ La Cytotoxicité

Divers types de squelettes triterpéniques sont potentiellement actifs tel que l'ursanes, oléananes et le lupanes pour lesquels une forte cytotoxicité a été mise en évidence sur des lignées cellulaires tumorales. A contrario, certains stérols ne sont actifs qu'à forte concentration. C'est le cas par exemple du β -sitostérol. Cela a été mis en évidence in vitro où il a été constaté qu'au-delà d'un certain seuil, le β -sitostérol provoque la contraction des cellules endothéliales du cordon ombilical (Moghadasian, 2000).

➤ Activité Anti-Inflammatoire

Des travaux, basés sur le lien éventuel entre la structure triterpénique et l'activité anti-inflammatoire (voie orale et application locale), ont permis de montrer que la présence sur un squelette de base d'un groupement carboxylique en C-28, ou un en C-30 doublé par un groupement hydroxyle en C-28, entraînait une augmentation d'activité (Recio *et al.*, 1995). L'activité serait également liée à la conformation adoptée par le triterpène. Diverses structures témoignent de l'activité anti-inflammatoire agissant à divers niveaux (Akihisa *et al.*, 1994). Plus récemment, Huguet et son équipe (Huguet *et al.*, 2000) ont montré que l'activité des terpènes, de types oléanane et lupane, cible plus particulièrement l'activateur d'un des mécanismes menant à l'inflammation, la protéine kinase C. On associe aussi souvent l'activité anti-inflammatoire aux propriétés analgésiques de certains triterpènes.

II.3. Les Saponines

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken *et al.*, 2007). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante. C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) (Bruneton, 2009).

Les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. De nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne (Hostettmann et Marston, 1995).

II.3.1. Propriétés structurales et classification

Les saponines peuvent être classées en deux groupes en se basant sur la nature de leur squelette aglycone. Le premier groupe est constitué par des saponines stéroïdiennes, qui se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes. Le deuxième groupe est les saponines triterpénoïdes, qui sont le plus commun et on le rencontre chez les dicotylédones angiospermes. Quelques auteurs distinguent un troisième groupe appelé amines stéroïdiennes, classé par certains auteurs comme des alcaloïdes stéroïdiennes (**Sparg *et al.*, 2004**).

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille-Dubois, 2000).

II.3.2. Voie de biosynthèse des Saponines

Il apparaît qu'un nombre important de plantes synthétisent les saponines triterpéniques, comme une partie de leur programme normal de croissance et de développement ou comme réponse aux attaques pathogènes et au stress (**Osborn et Haralampidis, 2002**).

II.3.2.1. Génines Triterpéniques

Les sapogénines triterpéniques, comme la majorité des triterpénoïdes, sont issues de la cyclisation du (3S)-2,3-époxy-2,3-dihydro squalène (**Bruneton, 2009**). (Figure 09).

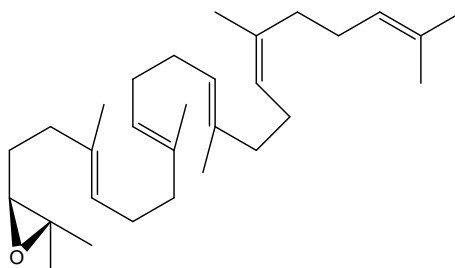


Figure 09 : Structure du 2,3-époxydosqualène (**Bruneton, 2009**).

Cette cyclisation conduit en premier lieu aux dammaranes, molécules tétracycliques qui existent à l'état d'hétérosides dans des plantes comme le ginseng, ou, lorsqu'elle implique une conformation différente du précurseur, aux cucurbitanes. Ceux-ci, également tétracycliques, ont une distribution restreinte (Cucurbitaceae principalement). Beaucoup plus fréquemment, le

composé tétracyclique de type dammarane n'est qu'un intermédiaire qui évolue vers des squelettes pentacycliques : oléananes, ursanes et lupanes qui peuvent eux-mêmes subir quelques réarrangements. De fait, les sapogénines triterpéniques de loin les plus nombreuses sont des molécules pentacycliques : oléanane (on dit aussi dérivés de la β -amyrine), ursane (on dit aussi dérivés de la α -amyrine) et lupane sont les trois squelettes les plus communs. Plus de 50% des saponines connues se rattachent à l'oléanane, en particulier à l'acide oléanolique et à l'hédéragénine (Gaoussou, 2012).

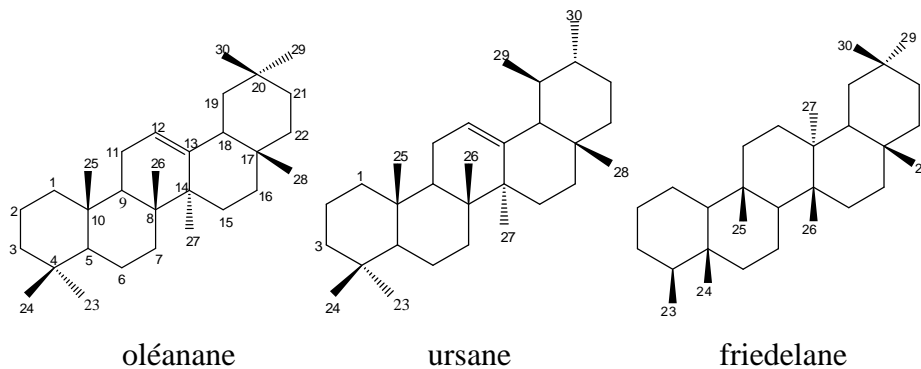


Figure 10 : Exemples de génines triterpéniques (Gaoussou, 2012).

II.3.2.2. Génines Stéroïdiques

Les génines stéroïdiques (c'est-à-dire les sapogénines) possèdent toutes un squelette à 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles : les deux cycles E (furanique) et F (pyranique) sont, la conséquence d'une cétylisation (mise en contact d'une fonction carbonyle avec deux fonctions alcool) intramoléculaire qui intervient après l'oxydation en C-16, C-22 et C-26 d'un précurseur cholestanique (Bruneton, 2009).

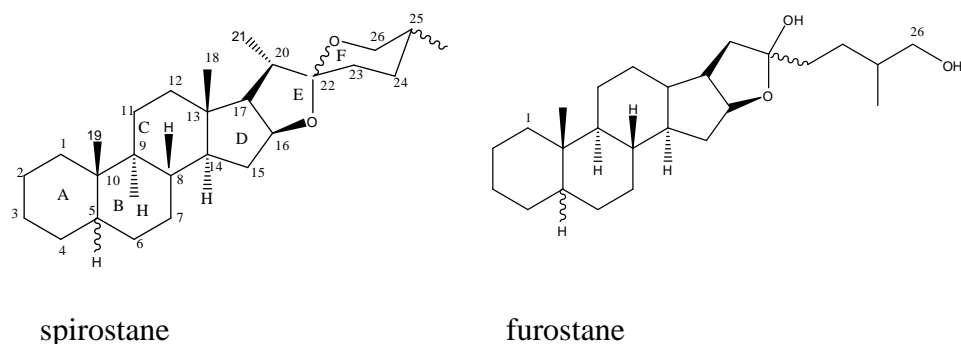


Figure 11 : Principaux squelettes stéroïdiques.

II.3.2.3. Les Sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Ils peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone (**Bruneton, 2009**). Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique sont les oses les plus fréquemment rencontrés dans la structure des saponosides, cependant la partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des génies peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques (**Boutaghane, 2013**).

II.3.2.4. Les Acides Organiques

Divers acides peuvent estérifier les saponines au niveau de l'aglycone ou au niveau des sucres (**Hostettmann et Marston, 1995**). La figure 12 résume ceux qui sont les plus fréquemment rencontrés.

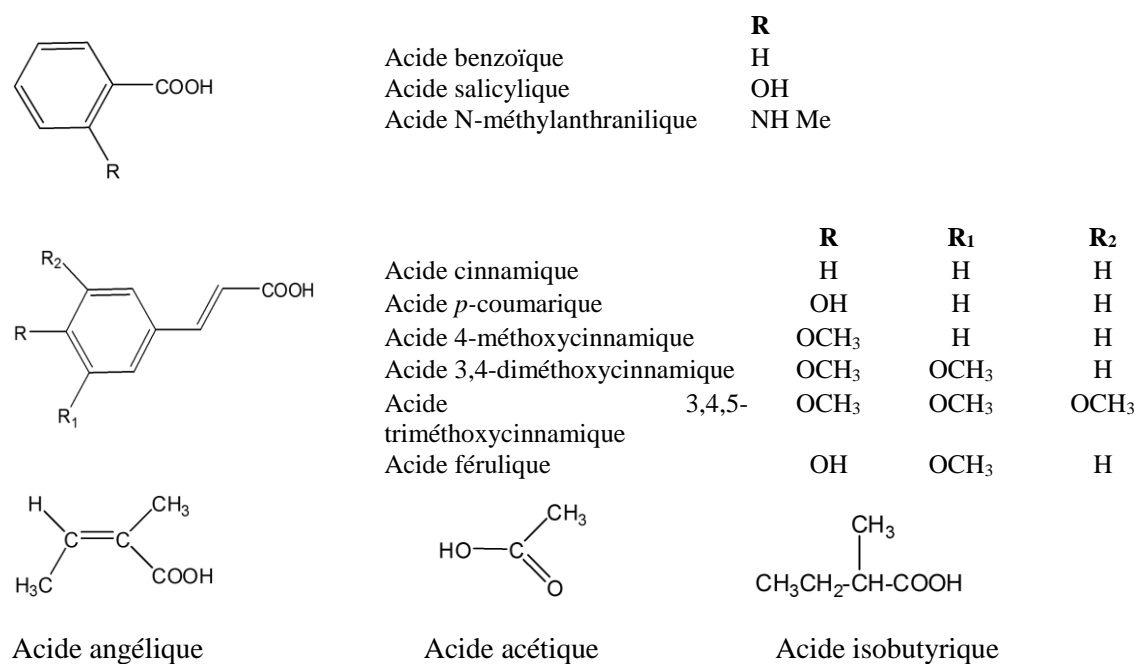


Figure 12 : Les différents acides organiques rencontrés dans les saponosides (**Hostettmann et Marston, 1995**).

II.3.3. Propriété biologiques des Saponines

Des travaux des scientifiques sur les saponines ressort que cette classe de molécules possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses. On peut citer entre autre l'activité anti oxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire,

cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice (**Hostettmann et Marston, 1995 ; Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 ; Lacaille-Dubois et Wagner, 2000 ; Perez Gutierrez et Vargas, 2002 ; Lacaille-Dubois, 2005**).

➤ **Activité Hémolytique**

Depuis longtemps, les saponines sont reconnues pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes) (**Gaidi et al., 2002**). Cette propriété a amené la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection des saponines dans les extraits de plantes (**Sparg et al., 2004**). Toutefois, la forte activité hémolytique de la plupart des saponines a freiné considérablement leur développement clinique en raison de leur toxicité potentielle lors de traitements donnés sous la forme d'injections intraveineuses (**Wachter et al., 2001**).

➤ **Activités Cytotoxique et Antitumorale**

De nombreuses saponines possèdent une activité cytotoxique in vitro envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Les valeurs d'IC₅₀ (Concentration d'inhibition 50) mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 ng/ml à 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire (**Lacaille-Dubois, 2000**).

➤ **Activité immunomodulatrice**

Actuellement, de nombreux nouveaux vaccins sont en cours de développement parallèlement à l'amélioration des vaccins déjà existants en vue de diminuer le nombre d'injections ainsi que les doses injectées. Il est donc nécessaire d'effectuer des recherches en vue de découvrir de nouvelles molécules qui auront un pouvoir immunostimulant plus important que leurs prédécesseurs. Parmi ces nouvelles molécules, les saponosides semblent être promis à un bel avenir (**Lacaille-Dubois, 1999**).

➤ **Autres Activités**

D'autres activités des saponines ont été mises en évidence tel que l'activité hypoglycémiant de *Chenopodiaceae* ou de *Gymnema* d'*Apocynaceae* (**Perez Gutierrez et Vargas, 2002**), ainsi que l'activité hypocholestérolémiant des lanostanes de *Kadsura heteroclita* (**Li et al., 1997**).

CHAPITRE : 03
Antioxydants et Activités
Biologiques

III.1. Généralités

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte a été le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (**Haleng,J, 2007**).

III.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. En situation normale, les EOA sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans certaines conditions, une surproduction d'EOA due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes : c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Pincemail, 1999**).



III.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Physiologiquement et dans certaines circonstances, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO). Ces molécules sont très nombreuses, de forme radicalaire (contenant un électron non apparié) ou non. Il existe de très nombreuses ERO mais les plus importantes sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'hypochlorite et le peroxyde d'hydrogène (Figure 13). L'ion superoxyde est formé spontanément ou par certaines enzymes comme les oxydases ou les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Peroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase. Cette molécule est plus stable que l'ion superoxyde. Elle est dégradée en eau et oxygène par la catalase et la glutathion peroxydase. En présence de métaux de transition sous forme libre (fer et cuivre), elle peut donner naissance au radical hydroxyle qui est la plus réactive et donc la plus toxique des ERO (Ichai *et al*, 2011).

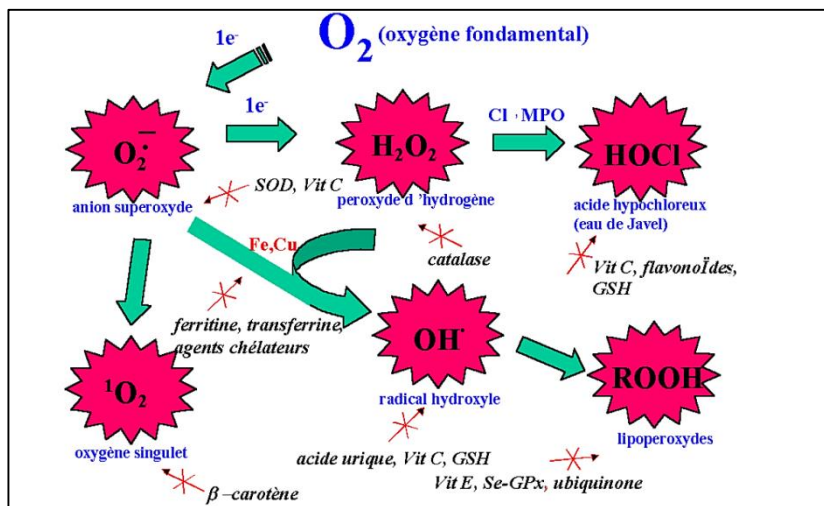


Figure 13 : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl^- : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante (Pincemail, 1999).

III.2.2. Les cibles biologiques des EOA

III.2.2.1. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme l'acide linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres (Pincemail, 1999). Les

conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées (Figure 14) qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

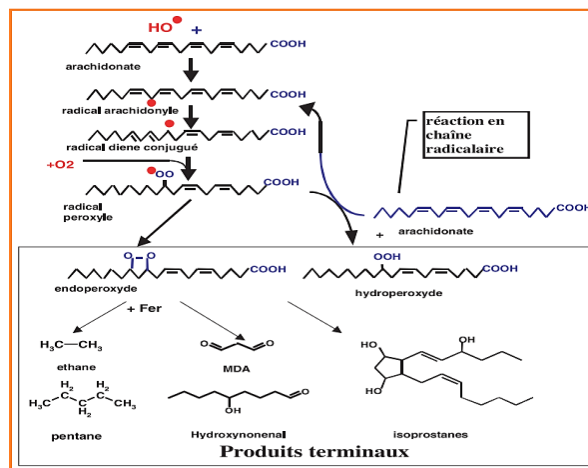


Figure 14 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

III.2.2.2. Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les EOA sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Pincemail, 1999). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées (Favier, 2003) (Figure 15).

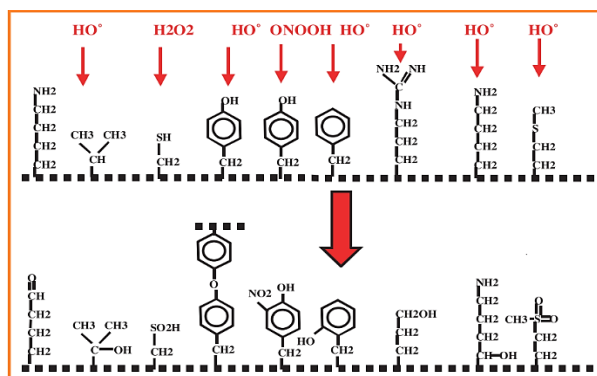


Figure 15 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

III.2.2.3. Oxydation de l'ADN

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées tel que le 8 oxo guanine, la formamidopyrimidine (**Favier, 2003**), et le 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) (Figure 16) qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer (**Pincemail, 1999**).

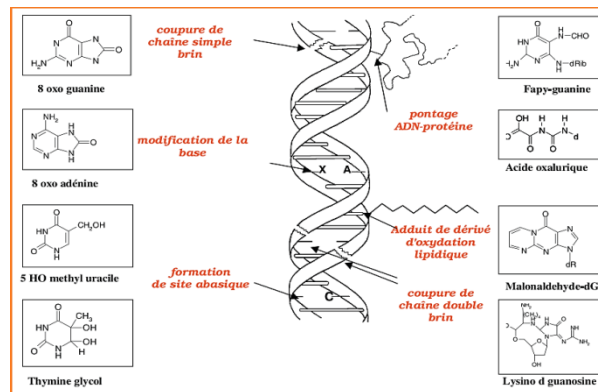


Figure 16 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**Favier, 2003**).

III.3. Les Antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011**). On peut distinguer plusieurs types d'antioxydants.

III.3.1. Les antioxydants enzymatiques

Trois enzymes ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion de deux ions superoxydes et deux protons en peroxyde d'hydrogène et oxygène (**Fridovich, 1995**). On la retrouve dans un grand nombre d'organismes vivants soulignant ainsi son importance (**Richier et al, 2003**).

La catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau, diminuant ainsi sa demi-vie et atténuant de ce fait la génération de radicaux hydroxyles. C'est un complexe tétramérique

contenant un hème, localisé essentiellement dans les peroxysomes. La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (Ichai *et al.*, 2011).

La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène (Levrault *et al.*, 2003). Elle peut aussi réagir avec d'autres substrats comme les lipides expliquant son rôle protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Son site actif contient du sélénium et elle a besoin de glutathion réduit pour fonctionner. C'est une enzyme ubiquitaire. Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme (Ichai *et al.*, 2011).

III.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité. Il possède une activité antioxydante propre mais surtout en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase. Une fois oxydé en glutathion disulfure, il est réduit par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le couple glutathion disulfure/glutathion est le principal responsable thiol de la balance redox intracellulaire (Ichai *et al.*, 2011).

Les vitamines A, C et E ont aussi des propriétés antioxydantes. Les vitamines C et E permettent leur régénération mutuelle après oxydation (Article) (Ichai *et al.*, 2011). En ce qui concerne les plantes médicinales bien connues et économiquement importantes, nous pouvons citer l'ail (*Allium sativum* L ; Liliaceae) et le ginkgo (*Ginkgo biloba* L ; Ginkgoaceae) qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires (Igor, 2002) pour leurs métabolites secondaires qui jouent le rôle d'antioxydant on peut citer comme exemple :

- **Les flavonoïdes** : Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (Igor, 2002).
- **Les tanins** : ce sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).
- **Les coumarines** : les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Igor, 2002).

- **Les phénols** : Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (**Igor, 2002**).
- **Les xanthones** : La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (**Diallo, 2005**).

III.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition (**Favier, 2006**). Les antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires (**Diallo, 2005**).

Tableau 02 : mécanisme d'action de quelques antioxydants

	Nature	Mode d'action
Antioxydants non Enzymatique	Vitamine E	Neutralise les radicaux libres
	Vitamine C	Participe à la réaction d'oxydoréduction
	Beta carotène	Fixation des métaux de transition
Antioxydants Enzymatique	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

III.5. Quelques activités biologiques antioxydantes

III.5.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

Le teste de DPPH est le plus ancien des tests indirecte pour détermination de l'activité antioxydante. Le DPPH a été suggéré la première fois en 1950 comme un produit naturel donneur de proton Plus tard, le test a été quantifié pour déterminer le potentiel antioxydant des composés phénoliques individuels et de la nourriture ainsi que des échantillons d'intérêt biologique (**Roginsky et Lissi, 2005**) Le radical DPPH porte une couleur pourpre foncé est c'est l'un des rares radicaux d'azote organique stable.

Le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams *et al*, 1995). La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux. D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

III.5.2. Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS⁺

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans et Miller, 1994 ; Rice-Evans et al 1995).

III.5.3. Test de Blanchissement de la Béta-carotène

Le potentiel antioxydant d'un extrait végétal peut être évalué par la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β -carotène. Dans ce teste, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaque les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de cette dernière mesuré spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kubola et Siriamornpun, 2008).

III.5.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak et al en 2004. Le Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre CUPRAC (cuivrique Réduire Antioxydant Capacity) est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisée pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxy cinnamiques, flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanines, ainsi que pour des thiols et les antioxydants synthétiques, les vitamines C et E (Özyürek *et al.*, 2011).

III.6. Autres activités biologiques

III.6.1. L'activité antimicrobienne

En raison de l'effet secondaire des produits chimiques antimicrobiens et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses.

C'est dans cette optique que nous envisageons dans ce présent travail, l'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits isolés à partir des feuilles de fleurs d'une plante du Genre *Genista* et de mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des germes pathogènes pour l'homme par la méthode de la Bioautographie.

III.6.2. La Bioautographie

Les techniques de purification des extraits peuvent être associées à des tests biologiques afin d'effectuer du fractionnement bioguidé. Le bioguidage consiste à déterminer, tout au long de la purification, la ou les activités d'intérêt des différentes fractions obtenues.

Une des méthodes de criblage classiquement mise en œuvre est la bioautographie sur plaque de chromatographie couche mince ; il s'agit d'une technique semi-quantitative facile à mettre en œuvre, permettant la séparation et la détection simultanées des composés bioactifs présents dans un extrait (**Choma et Grzelak, 2011**). Différents types d'activités, telles que des activités antimicrobiennes, d'inhibition enzymatique (acétylcholinestérase, glucosidase), ou encore de piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS), peuvent être évalués par bioautographie (**Marston, 2011**). Appliquée aux souches microbiennes, cette méthode est largement utilisée pour le fractionnement d'extraits de plantes.

III.6.2.1. Bioautographie de contact

Dans ce cas, la plaque de chromatographie couche mince est placée sur le milieu de culture gélosé, inoculé en surface, pendant quelques minutes ou heures pour permettre la diffusion des composés. Elle est ensuite ôtée, puis les micro-organismes sont mis à incuber. D'une manière générale, c'est la technique la plus utilisée mais la moins conseillée dans le cas de composés peu ou pas hydrosolubles.

III.6.2.2. Bioautographie directe

Après avoir été développées, les plaques CCM sont pulvérisées avec, ou immergées dans une suspension fongique ou bactérienne, avant d'être incubées. Cependant, des précautions sont requises afin d'éviter la dispersion des micro-organismes, en particulier dans le cas de la pulvérisation de bactéries ou champignons pathogènes.

III.6.2.3. Bioautographie « agar overlay »

Cette technique est considérée comme étant une combinaison entre les deux citées précédemment. Dans ce cas, la plaque CCM est immergée dans, ou recouverte par une fine couche de milieu de culture gélosé et inoculé par la souche bactérienne à tester.

Dans les trois cas, l'incubation est généralement effectuée en atmosphère humide (afin d'éviter le dessèchement du milieu de culture), puis une révélation est réalisée par une solution aqueuse stérile de bromure de méthylthiazolyl-tétrazolium (MTT) (jaune) afin de visualiser les micro-organismes vivants. Des zones d'inhibition de croissance blanchâtres mettent ainsi en évidence l'activité des composés sur la souche microbienne, alors que les micro-organismes vivants, capables de métaboliser les sels de tétrazolium en cristaux de formazan, sont révélés en violet (Figure 17).

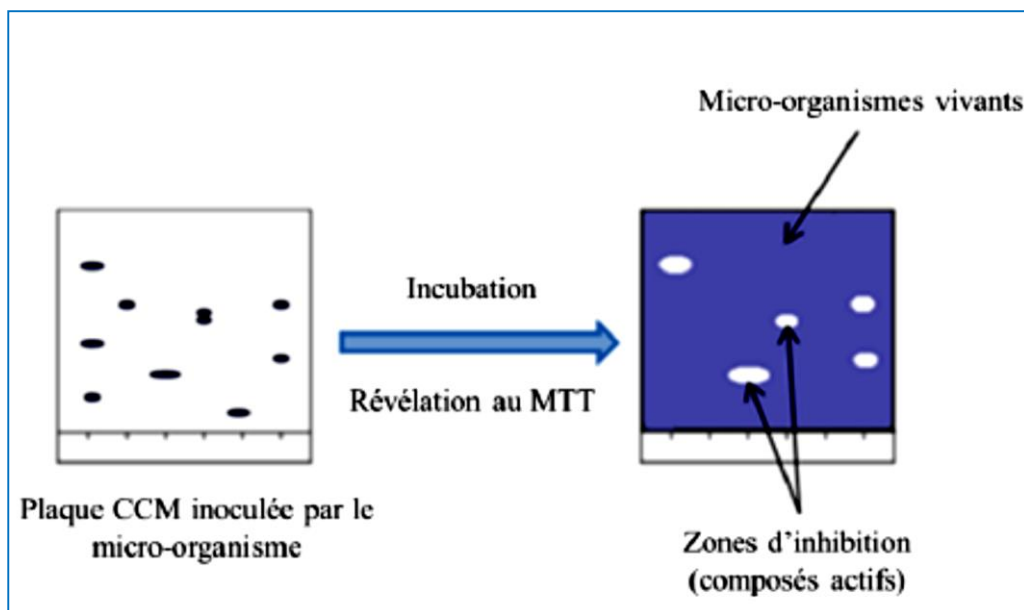


Figure 17 : Révélation des zones d'inhibition dans le cas des bioautographies directe ou "agar overlay" (Dieu, 2015).

III.6.3. Test de cytotoxicité contre l'artémia

L'utilisation des produits naturels comme anti-cancéreux a commencé avec la médecine traditionnelle. Plusieurs médicaments en chimiothérapie étaient isolés à partir d'espèces végétales ou dérivés d'un prototype naturel. Tel que la vinblastine, la vincristine, les taxanes, et l'étoposide ainsi que d'autres.

L'activité de létalité de l'artémia est un test qui semble être capable de détecter un large spectre d'activité biologique présente dans des extraits bruts. La disponibilité des œufs de l'artémia, le faible coût, la sécurité et la facilité d'exécution de l'activité ont fait du test un moyen efficace pour la mise en évidence de la cytotoxicité et l'activité anti-tumorale des extraits végétaux (Quignard *et al.*, 2003).



CHAPITRE : 04
Partie Expérimentale

IV.1. Aperçu et but de travail

L'espèce choisie est une plante endémique qui a fait l'objet d'un nombre très restreint de screening phytochimique et de dépistage d'activités biologiques. Ce présent travail a pour but de rechercher de nouvelles molécules et de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans cette espèce en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes médicinales endémiques.

Après l'extraction des parties aériennes de la plante, la phase chloroformique a été fractionnée en utilisant la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparation et purification chromatographiques, conduisant à l'isolement de 2 composés naturels purs.

Notre étude a porté aussi sur le dépistage des activités antioxydantes, l'activité anti bactérienne et la cytotoxicité des extraits chloroformique, méthanolique ainsi que des fractions chromatographique provenant de l'extrait méthanolique.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Matériel végétal

IV.2.1.1. Description de la zone de la récolte

El Aouana est une commune de la wilaya de Jijel en Algérie, située à environ 20 km au sud-ouest de Jijel (Figure 18).

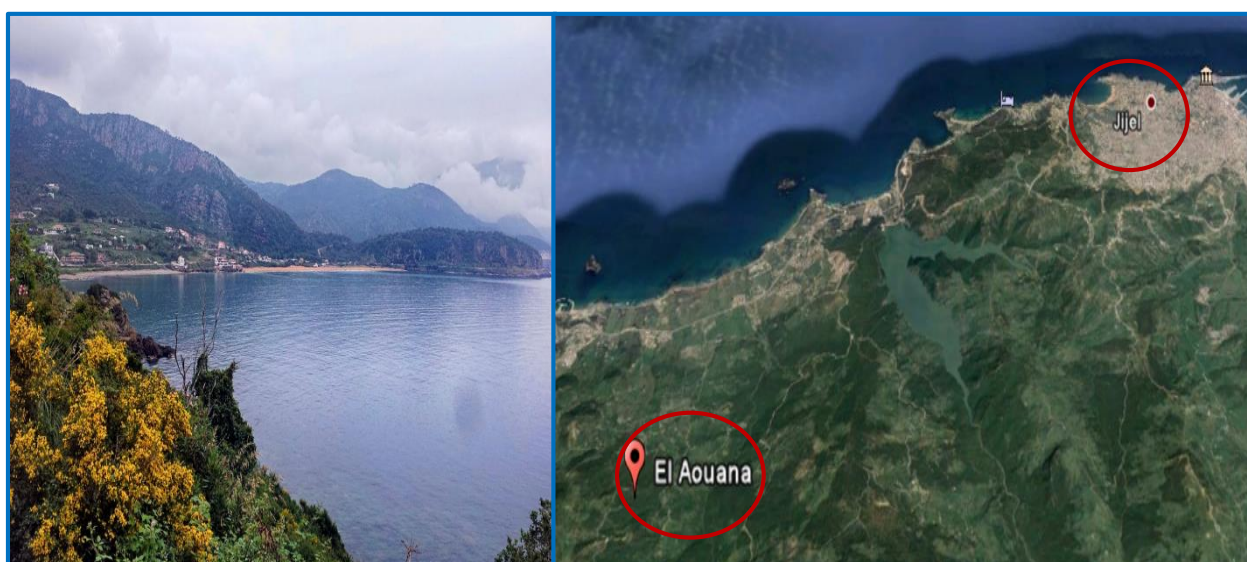


Figure 18 : El Aouana wilaya de Jijel

IV.2.1.2. Récolte de la plante du Genre *Genista*

Les feuilles et les fleurs de la plante ont été récoltées dans la région d'El Aouana au sud-ouest de la wilaya de Jijel (Nord Est Algérien) au mois de Mai 2014. La récolte de la plante a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.

IV.2.2. Matériel Chromatographique

IV.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques utilisées durant la réalisation de ce travail sont des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kieselgel 60 F254 Merck, 250 μm (20x20 cm) et en inverse RP 18 F254S, 200 μm Merck. Le développement des plaques CCM a été effectué dans des cuves en verre pré-saturées en éluant approprié (un solvant ou un système solvant selon la polarité des molécules que l'on souhaite séparer).

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) dans une chambre noire, avant la révélation par un révélateur à base d'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

IV.2.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour réaliser un fractionnement grossier et rapide des extraits. Elle permet d'économiser des quantités importantes de solvants en comparaison avec les techniques classiques. La VLC est également facile à mettre en œuvre et rapide, elle s'effectue sur colonne en verre au bas de laquelle est appliquée une dépression pour accélérer le débit d'élution.

La silice (Kiesel gel Merck 70-230 mesh, 63-200 μm) conditionnée dans l'entonnoir cylindrique filtrant sur un verre fritté n°3 doit avoir un poids 30 fois supérieur de celui de l'extrait à déposer (pour 1g d'échantillon on utilise 30 g de silice).

Les systèmes solvants utilisés doivent traverser la colonne à plusieurs reprises (3 fois) afin d'assurer une bonne élution des molécules et l'épuisement total du gel des molécules ayant une polarité comparable au système solvant utilisé.

IV.2.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La chromatographie sur colonne ouverte a été utilisée pour séparer et purifier les composantes de l'extrait chloroformique. Pour cela une colonne en verre de taille et diamètre adéquat au poids des fractions a été remplie en gel de silice (Kiesel gel Merck 70-230 mesh, 63-200 μm). Les éluants utilisés ont été choisis suite à plusieurs essais par chromatographie sur couche mince des fractions de la VLC.

IV.2.2.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'analyse par CLHP des extraits hydro-alcooliques (5 mg/ml CH₃OH) est effectuée sur silice greffée C18 à l'aide du gradient CH₃CN : H₂O : HCOOH 0,025% (10:90 à 37:63) pendant 31 min puis (37:63 à 850:50) pendant 15 min.

IV.2.3. Méthode physico-chimique

IV.2.3.1. Spectroscopie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-500 et sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-600 équipé d'une cryoplateforme. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données Topspin 2.1 sont appliqués.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl₃ et CD₃OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétra méthyl silane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

IV.2.3.2. Spectrophotométrie UV-visible

La lecture de l'absorbance a été effectuée grâce à un lecteur de microplaque Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode. Grâce à son monochromateur le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

IV.3. Etude d'une plante du Genre *Genista*

IV.3.1. Extraction des feuilles et fleurs de la plante

Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les feuilles et les fleurs de la plante (1200 g) ont été macérées à température ambiante par un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V), puis fractionnées par extraction liquide/liquide successives au chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol, selon la figure 19.

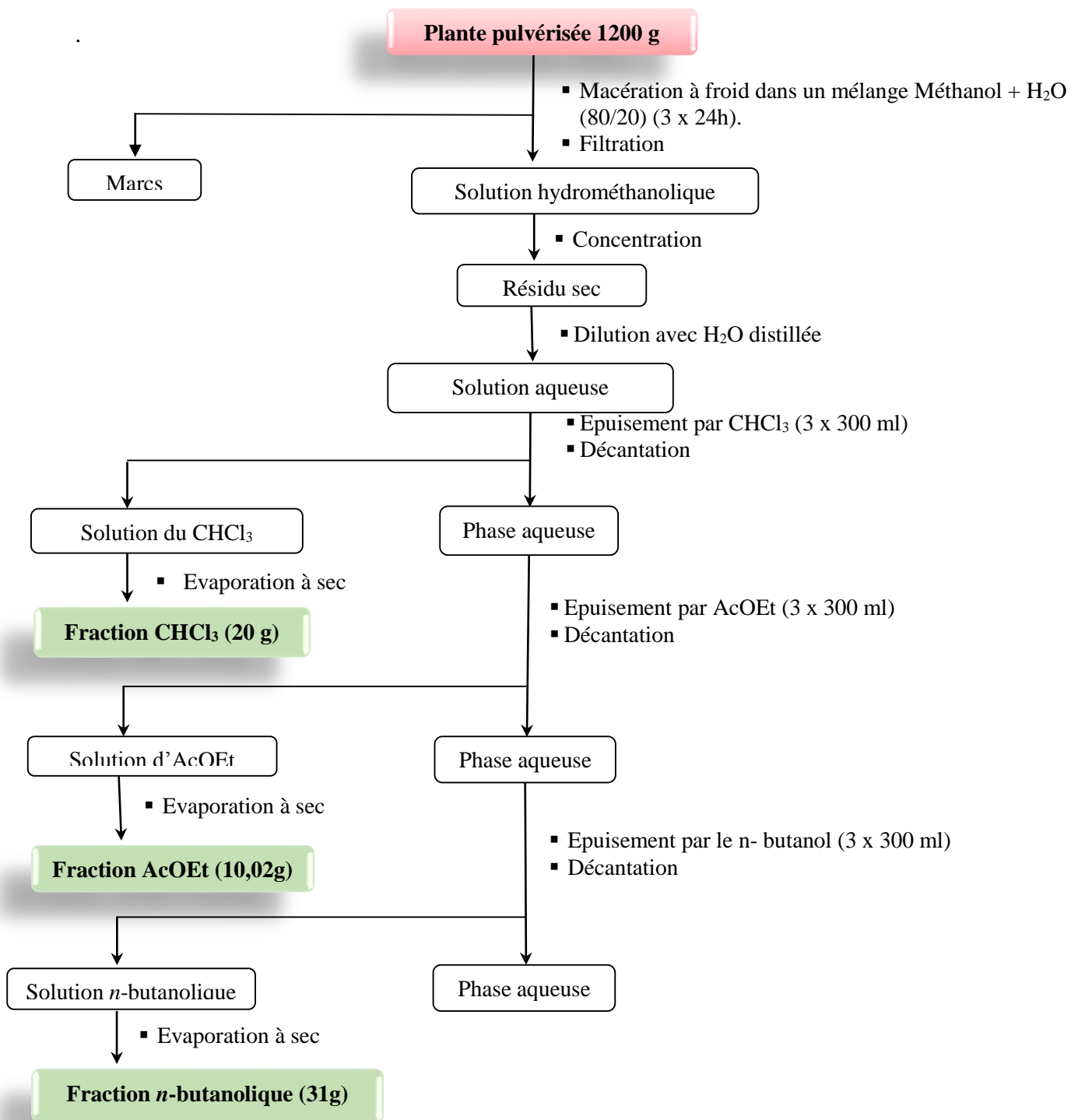


Figure 19 : Différentes étapes de l'extraction des feuilles et fleurs de la plante.

IV.4. Criblage « screening » phytochimique par réactions colorées

L'analyse phytochimique sommaire est réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. La plupart des tests sont effectués selon la technique de Harborne (1973).

IV.4.1. Mise en évidence des alcaloïdes

IV.4.1.1. Révélation par le réactif de Dragendorff

Le test est fondé sur la capacité des alcaloïdes de se combiner avec des métaux lourds. Pour cela Quelques gouttes du réactif de Dragendorff (composé d'un mélange de 0,80 g de nitrate basique de bismuth, 10 ml d'acide acétique glacial et 40 ml d'eau distillée) sont introduites dans un tube à essai contenant 2 ml de la solution d'extrait. La formation d'un précipité rouge-orangé indique la présence des alcaloïdes.

IV.4.1.2. Révélation par le réactif de Mayer

Les alcaloïdes sont également mis en évidence par le réactif de Mayer (10 g de KI et 2,70 g de HgCl_2 dissous dans 20 ml d'eau). L'ajout de quelques gouttes de ce réactif à 2 ml de la solution d'extrait entraîne la formation d'un précipité blanc ou blanc-jaune en présence d'alcaloïde.

IV.4.2. Mise en évidence des polyphénols

IV.4.2.1. Réaction de la cyanidine

Une des réactions spécifique de la caractérisation des flavonoïdes est la réaction de la cyanidine, elle utilise en effet le pouvoir réducteur des métaux en milieu acide pour réduire spécifiquement le noyau flavonoïdique ce qui permet l'apparition d'une couleur caractéristique. Pour cela une quantité de chaque extrait (Quelques millilitres) a été mélangé séparément avec 1ml de HCl, 1ml de l'eau distillée et 2 ml de rognure de Mg dans un tube à essai. La présence de coloration rose orange (flavones) ou rose violacé (flavonones) ou rouge cerise (flavonols) dans la couche surnageante du mélange indique la présence d'un flavonoïde.

IV.4.2.2. Révélation par le réactif de Stiasny

Les tanins peuvent être mis en évidence dans le milieu grâce à la réaction colorée avec la solution aqueuse de FeCl_3 . Cependant la différenciation des tanins peut être effectuée grâce à la révélation par le réactif de Stiasny (formaldéhyde chlorhydrique). En effet, les tanins condensés précipitent à chaud par addition à l'infusé du réactif de stiasny. Contrairement aux tanins hydrolysables qui peuvent être mis en évidence par l'addition de chlorure ferrique ce qui va se traduire par l'apparition d'un composé qui colore la solution.

Dans des tubes à essai, 2.5 ml de chacun des extraits sont mélangé avec 0.5 ml de la solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. La présence de tanins catéchiques ou galliques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

Pour différencier entre les tanins, l'utilisation du réactif de Stiasny s'est avéré nécessaire dont le principe est le suivant :

A 10 ml de chaque extrait 5 ml de réactif de Stiasny sont ajoutés (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré). La présence d'un précipité rouge confirmant la présence des tanins dans le milieu.

La séparation de précipité par filtration est suivie par une neutralisation de la solution par l'acétate de sodium à la fin quelques gouttes de FeCl_3 1% ont été rajoutées. L'apparition d'une coloration bleu noir indique la présence de tanins galliques.

IV.4.3. Mise en évidence des saponines

IV.4.3.1. Indice mousse

La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, qui se définit comme étant le degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100. La détermination de l'indice de mousse (IM) est la méthode la plus abondante pour la confirmation de la présence des saponines.

Dans une série de 6 tubes à essai, sont introduits successivement 1 à 6 ml de chaque extrait, tous les tubes sont complétés à 10 ml avec de l'eau distillée selon le Tableau 03 et agités vigoureusement dans le sens de la longueur pendant 15 secondes (**Vigor et al., 2011**).

Tableau 03 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait butanolique pour la mesure de l'indice de mousse.

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6
Extrait n-BuOH 1% (ml)	1	2	3	4	5	6
Eau distillé (ml)	9	8	7	6	5	4

Après agitation pendant une minute il se forme une mousse persistante en présence des saponines. La mesure de la hauteur de la mousse permet de calculer l'Indice de mousse (IM) :

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

Tel que :

C : Concentration initiale de l'extrait

D : Dilution dans le tube ou la mousse >1

IV.4.3.2. Mise en évidence des triterpènes

La mise en évidence des triterpènes est fondée sur la réaction de Lieberman-Burchard. Les extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique sont additionnés chacun de 0.5 ml

d'anhydride acétique puis de 0.5 ml de chloroforme, après dissolution, les mélanges sont transférées dans des tubes à essai aux quels est ajouté 1 ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de triterpènes.

IV.5. Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique de l'espèce du Genre *Genista*

Les systèmes solvants éther de pétrole/acétone et Méthanol/Acétone ont été choisis pour la VLC (Figure 20) ceci suite à plusieurs développements de l'extrait chloroformique sur des plaques CCM par différents systèmes solvant.



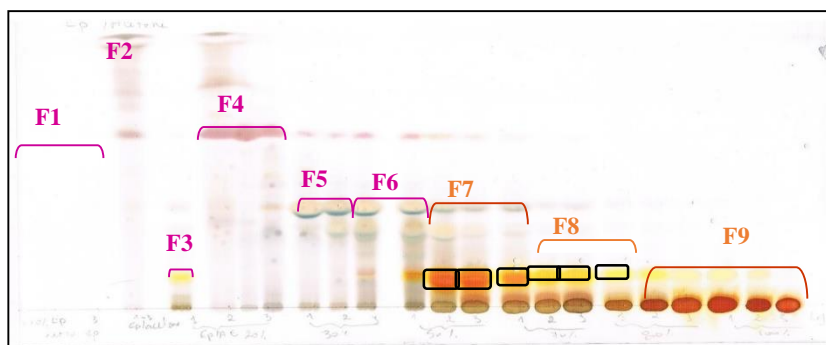
Figure 20 : Fractionnement de l'extrait CHCl_3 par VLC : (1) Équipement de VLC, (2) Chromatogramme pour le choix du système solvant.

Environ 11 g de l'extrait chloroformique de la plante ont été fractionnés par Chromatographie liquide sous vide sur phase normale, l'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par addition d'acétone, puis par l'acétone avec augmentation de la polarité par le méthanol jusqu'à 60%. Après fractionnement, les fractions aux profils chromatographiques voisins sont rassemblées. 11 fractions (**F1** à **F11**) ont été ainsi obtenues (tableau 04).

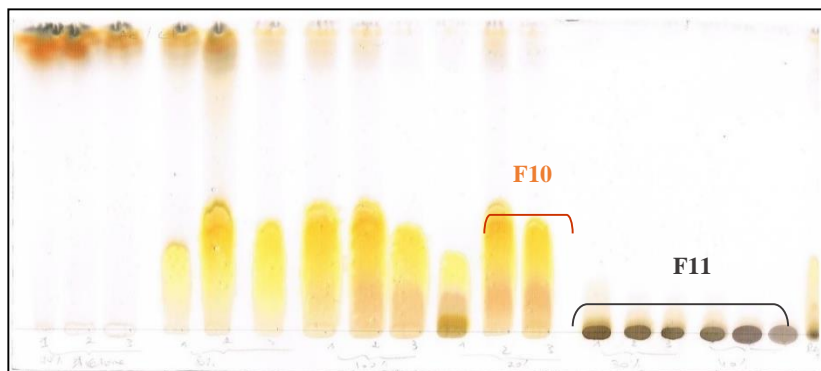
Tableau 04 : schéma d'évaporation de des fractions de la VLC.

Ether de pétrole /Acétone	100	90 :10	80 :20	70 :30	50 :50	30 :70	80 et 100
Fractions collectées	F1	F2 / F3	F4	F5	F6	F7	F8
Eluant : Acétone /Méthanol	80 :20	70 :30	60 :40	/	/	/	/
Fractions collectées	F9	F10	F11	/	/	/	/

Ep : Acétone (9 : 1)



Ep : Acétone (8 : 2)



Ep : Acétone (5 : 5)



Figure 21 : Plaques CCM récapitulatives des fractions de la VLC.

La sous fraction **F7** (1,058 g) est soumise à une CC de gel de silice en phase normale éluée par Ether de pétrole : Acétone (100, 95-5, 90-10, 85-15, 80-20, 70-30, 60-40, 100) conduisant à l'isolement de deux composés à l'état purs **GN1** et **GN2** (Figure 22).

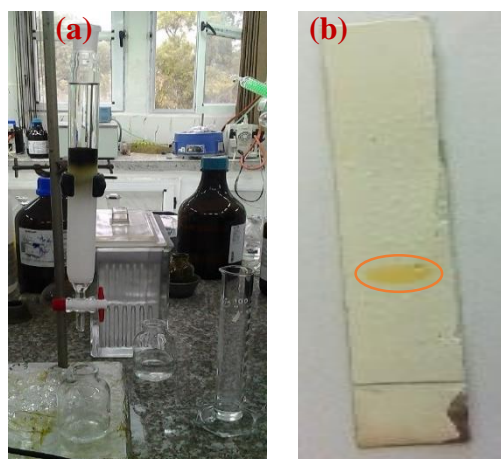


Figure 22 : Fractionnement de la fraction **F7** par CC : (a) Chromatographie sur colonne ouverte, (b) Chromatogramme des fractions **GN1**.

IV.6. Evaluation des activités biologiques de l'extrait chloroformique et méthanolique de l'espèce du Genre *Genista*

- ❖ Le choix des extraits méthanolique et chloroformique ainsi que les fractions F7 et F9 pour l'évaluation des activités biologiques se justifie par leur richesse en métabolites secondaires et par leur disponibilité en quantité qui permet de réaliser tous les tests biologiques prévus.

IV.6.1. L'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, comme le radical ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH[•] (diphényl-picrylhydrazyle). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise (Cristina *et al.*, 2009).

Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer les capacités totales antioxydantes des extraits méthanolique et chloroformique en utilisant trois méthodes spectrophotométrique à savoir ; le pouvoir réducteur de cuivre (Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC), l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS), l'activité antiradicalaire pour le radical DPPH[•] (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl, DPPH) et le test de blanchissement du β -carotène.

L'effet des solvants est un paramètre essentiel sur le comportement chimique des composés antioxydants. Le choix des solvants à différente polarité pour l'extraction peut avoir un effet significatif sur le transfert des électrons qui est la base des réactions antioxydantes (Finotti et Majo, 2003 ; Perez *et al* 2006).

IV.6.1.1. Les antioxydants standard

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E) et les antioxydants synthétiques tel que la BHA (Butyl-Hydroxy-Anisol) et le BHT (butyl-hydroxy-toluène) figure 24 (Molyneux, 2004).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective IC₅₀ (ou l'inverse 1/IC₅₀ correspond à une réduction de 50% de l'activité ou de l'absorbance) du DPPH[•]/ ABTS^{•+} dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petit. L'indice IC₅₀ montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration

initiale du DPPH^{*} à 50% (exprimée en mol : Antioxydant/mol DPPH^{*}/ABTS⁺⁺ ou mg : Antioxydant/g DPPH^{*}/ABTS⁺⁺), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction (Sanchez-Moreno *et al*, 1998).

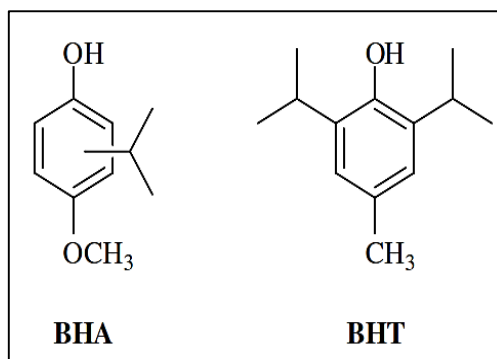


Figure 23 : Quelques antioxydants synthétiques (Gülçin, 2012).

IV.6.1.2. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

❖ Mise en évidence de l'activité antiradicalaire

Afin de mettre en évidence l'activité antiradicalaire de l'extrait chloroformique et méthanolique, deux plaques CCM des deux extraits ont été développées puis révélées par la solution méthanolique du DPPH.

❖ Dosage de l'activité anti radicalaire par le test DPPH

- Principe du test :

Le principe du test consiste à l'addition du radical DPPH^{*} à une solution éthanolique (ou méthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène qui entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH.

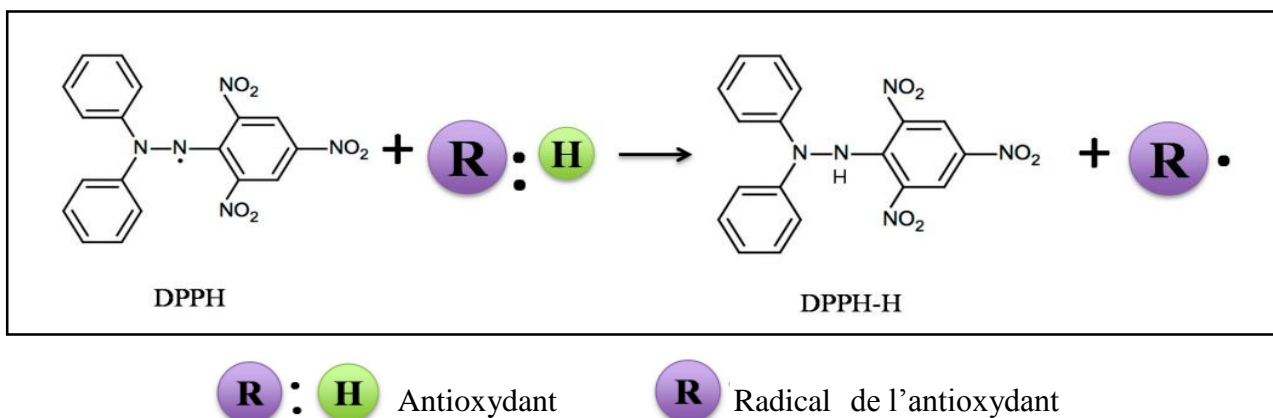


Figure 24 : Mécanisme de la réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.

- Procédure :

➤ Préparation de l'échantillon :

Une quantité de 4 milligrammes de l'extrait méthanolique, chloroformique, le composé GN1 et la fraction F9 et le standard (α tocophérol), ont été dissoutes dans 1 ml du méthanol (Solution mère de 4000 ppm), c'est à partir de cette dernière qu'une série de dilution de 1/2 a été préparé. Le tableau 05 présente la série de dilution préparée pour l'extrait chloroformique sachant que tous les extraits ainsi que le standard ont été préparé de la même manière.

Tableau 05 : Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait chloroformique.

Extrait chloroformique							
Dilution	1/1 (Solution mère)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration de la solution (mg/ml)	4 mg/ml (4000 ppm)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Concentration dans le milieu réactionnel en $\mu\text{g/ml}$	800	400	200	100	50	25	12,5

➤ Protocole

L'activité antiradicalaire été mesurée selon le protocole décrit par **Blois, 1958** avec de légères modification. Un volume de 40 μl de différentes concentrations de chaque échantillon ainsi que l'antioxydant standard (α -tocophérol), est déposé dans chaque puits, 160 μl de la solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) est ajouté par la suite. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en ajoutant 40 μl du méthanol à 160 μl de la solution méthanolique de DPPH. Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Les tests sont pratiqués en triplicata.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire de DPPH a été calculé comme suit :

$$\% \text{ AA} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

IV.6.1.3. Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

- Principe du test :

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un cation radicalaire facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu (Figure 25) (Re *et al*, 1999).

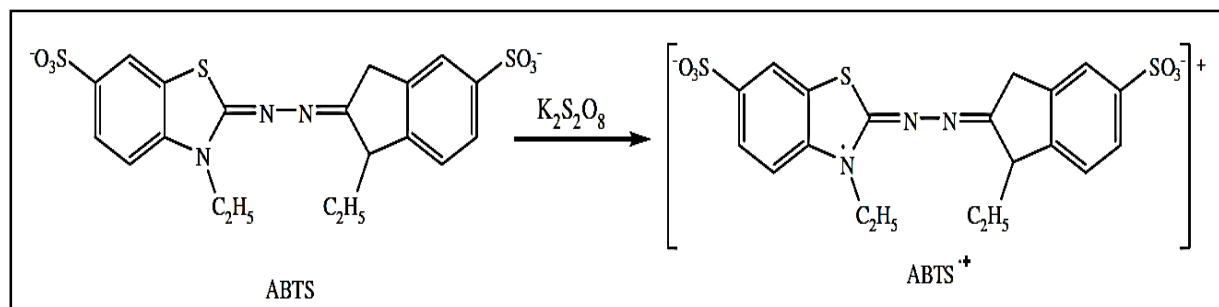


Figure 25 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+}
(Gülçin, 2012)

La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde appropriée. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce cation radicalaire entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance mesurable à 734 nm.

Cette diminution dépend de l'activité antioxydante des composés testés mais souvent aussi du temps et de la concentration (Re *et al*, 1999).

- Procédure :

➤ Préparation de l'échantillon :

Le protocole de dilution des extrait et celui utilisé pour l'activité précédente. Cependant, la série de dilution du standard a été modifiée en raison de la forte activité antiradicalaire de l'Hydroxyanisole butylé (BHA) pour la réduction de l'ABTS^{•+}. Pour cela, une solution mère de 31,25 µg/ml a été préparée avec 7 dilutions de 3/4 pour chacune.

➤ Protocole

Cette activité est déterminée selon la méthode de Re *et al* (1999) avec des volumes ajustés pour une manipulation sur microplaque de titration.

Le cation radicalaire ABTS^{•+} est généré en mélangeant 5 ml de la solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec le persulfate de potassium à 2,45 mM (concentration final dans le mélange), le tout est conservé à l'abri de la lumière et à + 4 °C durant 16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,7±0,020 à 734 nm. 160 µl de cette

solution fraîchement préparée sont ajoutés à 40 µl de différentes concentrations de chaque échantillon ainsi que l'antioxydant standard BHA.

Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 734 nm en utilisant le lecteur de microplaque.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ AA} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

IV.6.1.4. Test de Blanchissement de la Bêta-carotène

- Principe du test :

Cette technique spectrophotométrique consiste à mesurer la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'oxydation de ce dernier génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β-carotène (Tepe *et al.*, 2006).

- Procédure :

➤ Préparation de l'échantillon :

Selon la méthode Dapkevicius *et al.*, 1998. Cinq dilutions ont été préparées pour cette activité à partir de 1000 ppm pour l'extrait chloroformique, la fraction F9 ainsi que le composé GN1. Cependant, les résultats ont été obtenus à partir de 500 ppm pour le BHT et l'extrait méthanolique en raison de leurs fortes activités.

➤ Protocole

0,5 mg de Bêta-Carotène a été mélangé avec 200 µl de tween 40 et 25 µl de l'acide linoléique, le tout est ajouté à 1 ml de chloroforme. Le mélange est évaporé à l'aide d'un rota vapeur puis mélanger à 50 ml de l'eau oxygéné. La solution générée doit avoir une absorbance qui varie entre 0,5 et 0,6. Dans le cas contraire l'absorbance est ajusté en ajoutant de l'H₂O₂.

Dans chaque puits de la plaque, 40 µl de chaque concentration des extraits et du standard sont ajoutés à 160 µl de la solution du bêta-carotène, la plaque est incubée par la suite à 45°C et l'absorbance est enregistré à 470 nm chaque 30 min pendant 2 heures.

Les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la β -carotène ont été calculés par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(D.O E_{120} - D.O T_{120}) / (D.O T_0 - D.O T_{120})] \times 100$$

Tel que :

D.O E₁₂₀ : Absorbance de l'extrait à T = 120 min

D.O T₁₂₀ : Absorbance du témoin négatif à T= 120 min

D.O T₀ : Absorbance du témoin négatif à T = 0 min

IV.6.1.6. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

- Principe du test :

Le test consiste au suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) [$Nc_2 - Cu^{2+}$]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit (**Figure 26**).

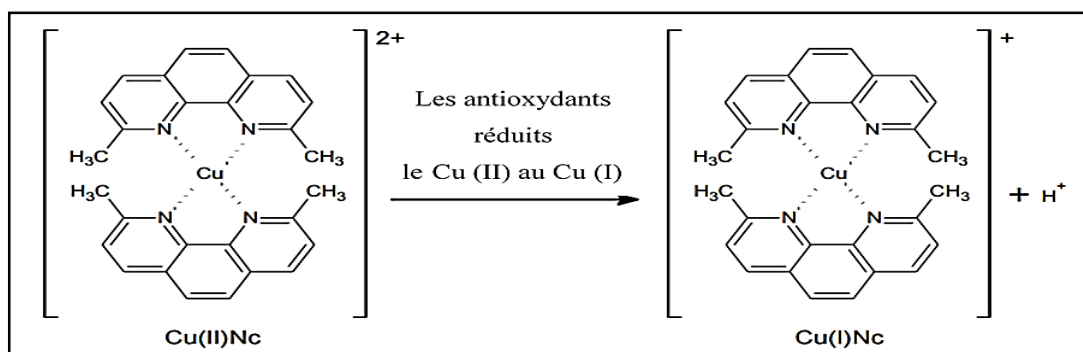


Figure 26 : Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II) (Özyürek *et al* 2011).

Cette réaction est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

- Procédure

➤ **Préparation de l'échantillon :**

Le protocole de dilution des extraits et du standard (BHT) et celui utilisé pour l'activité DPPH.

➤ **Protocole**

La méthode utilisée est celle de (Apak *et al*, 2004), 40 μ l de chaque échantillon et de standard est rajouté à 60 μ l du tampon d'acétate d'ammonium ($AC-NH_4$) (1M, PH 7) préparé dans de l' H_2O , 50 μ l de la solution aqueuse du Chlorure de cuivre (II) ($Cu Cl_2, 2H_2O$) (10 mM) et 50

μl de la solution éthanolique de la néocuproïne (7,5 mM), dans chacun des puits de la plaque. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur de microplaque, puis incubé durant une heure. L'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaque.

Les pourcentages d'inhibition sont déterminés graphiquement grâce au logiciel statgraphics.

IV.6.2. L'activité antibactérienne

IV.6.2.1. description et principe de la Bioautographie

C'est une technique qui permet la détection des composés antimicrobiens au sein d'un extrait de plante. En effet, la bioautographie est une technique de laboratoire visant à découvrir les substances qui affectent les taux de croissance des microorganismes dans des mélanges complexes et des matrices. (Rahalison L *et al*, 1991).

IV.6.2.2. préparation des plaques CCM

Un volume de 20 μL (100 mg/ml) des extraits méthanolique et chloroformique ont été déposés sur des plaques CCM en phase normal. Les plaques ensuite ont été développées dans un système de solvant MeOH : CHCl_3 7 : 3 et acétate : cyclohexane 5 : 5 respectivement. Après migration les plaques sont stérilisées sous hotte microbiologique par lampe U.V.

IV.6.2.3. préparation des souches microbiennes

Quatre souches bactériennes différentes ont été choisies. Dans un premier temps, 1 ml d'une suspension bactérienne liquide a été ajouté à 9 ml de BHI (Brain Heart Infusion Agar), le mélange est incubé pendant 24 heures dans une étuve en respectant la température optimale de la poussée de chaque espèce bactérienne. Le tableau 06 résume les conditions de la revivification bactérienne.

Tableau 06 : Conditions de préparation des souches bactériennes

N°	Souche	Certificat	Gram	T° optimal d'incubation	Milieu de culture
1	<i>Escherichia coli</i>	CECT 515	Négatif	37°C	BHI
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 4898		30°C	
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	Positif	37°C	
4	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20075		37°C	

IV.6.2.4. préparation de l'inoculum

La charge bactérienne a été réduite à 10^4 Bactérie/ml grâce à une série de dilution. Pour cela les souches bactériennes utilisées sont cultivées dans des tubes contenant le milieu Muller Hinton (culture en surface par stries dans des tubes inclinés). Un jour plus tard, 10 ml de l'eau peptonée sont ajoutés au tube contenant la culture bactérienne, une série de dilution est réalisée par la suite selon la figure 27. Il est important de bien mélanger le tube avant chaque transfère afin d'assurer une charge bactérienne homogène.

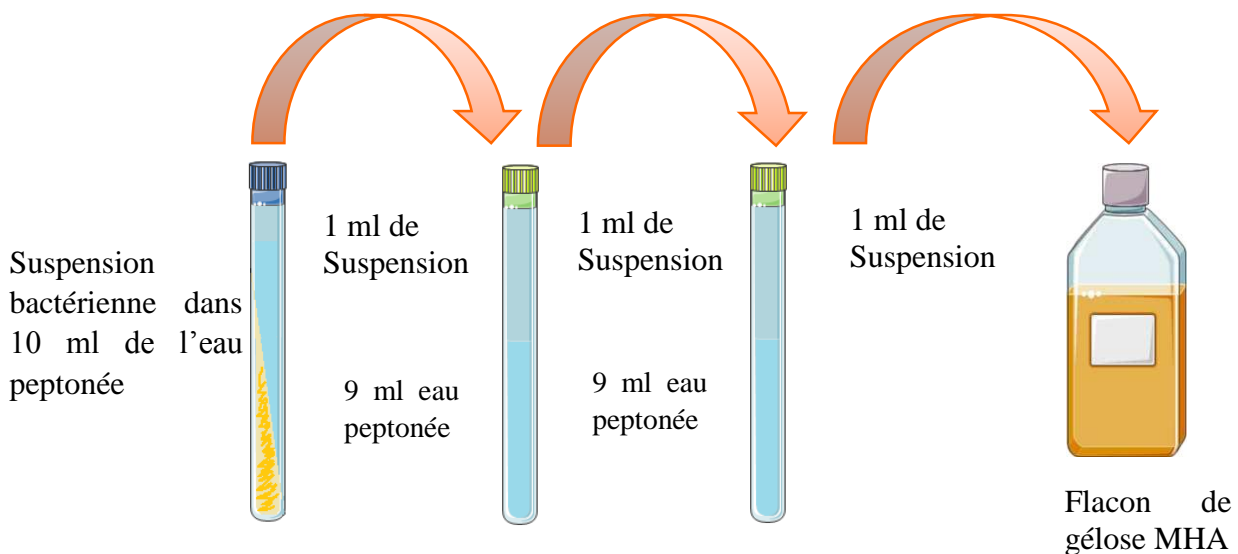


Figure 27 : Préparation de l'inoculum.

Les plaques développées et stérilisées sont placées dans des boîtes de pétrie en verre, 30 ml de la gélose contaminée est par la suite coulée sur les plaques qui seront incubées à 37°C pendant 24 heures.

Des disques de la gentamicine (un antibiotique puissant) sont incubés à la surface de la gélose contaminée par chacune des souches bactériennes séparément incubées dans les mêmes conditions que les plaques CCM.

IV.6.2.5. Révélation

Après une incubation pendant 24 heures à 37°C , une pulvérisation de la gélose par une solution de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/ml a permis de visualiser les zones d'inhibition révélant la présence de composés actifs.

IV.6.3. Test de Cytotoxicité contre l'Artémia

IV.6.3.1. Description de l'activité de Cytotoxicité

Un certain nombre d'études ont adopté l'utilisation du test de la cytotoxicité des extraits de plantes contre l'artémia comme un test de l'activité pesticide, anticancéreuse, larvicide, antiparasitaire et cytotoxique (Quignard *et al.*, 2003).

IV.6.3.2. Protocole

Une quantité de 2 g des œufs de l'artémia a été déposée dans 500 ml de l'eau de mer, a PH 8,3 ajusté avec de l'NaOH. Le mélange est incubé sous lumière dans une étuve réfrigérée à 26°C durant 48h. Et afin d'assurer les besoins de l'artémia en oxygène une pompe est reliée au récipient contenant les œufs.

Après l'éclosion des œufs, les larves sont mises en contact avec différentes concentrations des extraits méthanolique et chloroformique (4 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml). 100 µl de chaque concentration préparée dans le DMSO est déposée dans un tube contenant 4,9 ml de l'eau de mer avec 10 larves de l'artémia. Les tubes sont par la suite incubés pendant 24 h à 26°C. Un tube de control est préparé en remplaçant l'extrait par 100 µl du DMSO.

Les résultats sont obtenus par comptage des larves survivantes. Pour chaque concentration la dose létal 50 est calculée (dose nécessaire pour tuer 50% des larves).

Les pourcentages de mortalité sont calculés selon l'équation donnée par Meyer et al 1982 :

$$\% \text{ de mortalité} = [(A-B)/B] * 100$$

Où :

A : nombre de larves mortes dans l'extrait.

B : nombre de larves mortes dans le control.

CHAPITRE : 05
Résultats et Discussion

V. Criblage « screening » phytochimique par réactions colorées

L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des quatre grands groupes chimiques (flavonoïdes, terpenoïdes, saponosides et tannins). Cependant, les alcaloïdes ne semblent pas être présents dans les trois extraits.

Selon leur intensité les réactions qui se produisent sont classées de : négative (-) jusqu'à franchement positive (+++).

V.1. Recherche des alcaloïdes

Les réactions caractéristiques des alcaloïdes ont donné des résultats négatifs avec les trois extraits après utilisation des réactifs appropriés (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Résultats de recherche des alcaloïdes

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Alcaloïdes	-	-	-

On peut donc déduire que les alcaloïdes sont absents dans les 3 extraits.

V.2. Recherche des flavonoïdes

La caractérisation des flavonoïdes dans les extraits a montré que ces composés phénoliques sont fortement présents dans les trois extraits étudiés. (**Tableau 08**).

Tableau 08 : Résultats de recherche des flavonoïdes.

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Coloration	Pas de couleur (Forte concentration de la chlorophylle)	Rose orange	Rouge cerise
Type de flavonoïdes	+	flavones	flavonols

Les résultats obtenus montrent que la plante possède différentes classes de flavonoïdes.

V.3. Recherche des tanins condensés

Les tanins condensés ont été mis en évidence dans l'extrait Butanolique par le réactif de Stiasny. (Figure 28).

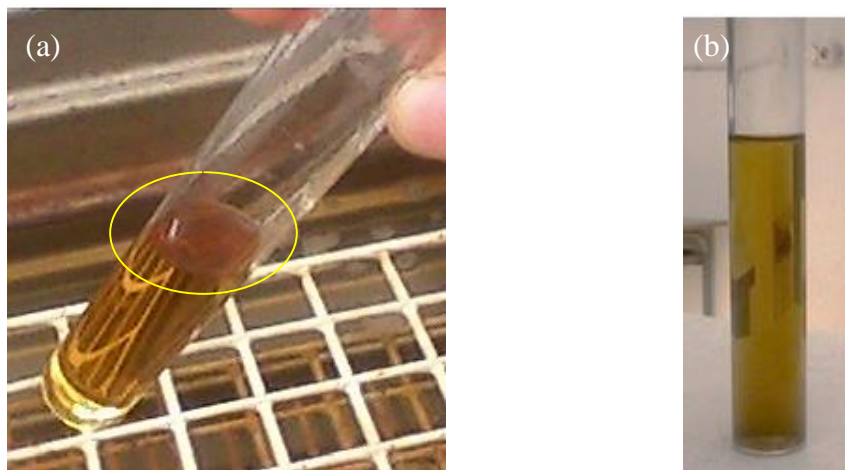


Figure 28 : mise en évidence des tanins condensés

(a) Coloration rouge de l'extrait Butanolique témoigne la présence des tanins condensés.

(b) Coloration verdâtre de l'extrait Butanolique confirme la présence des tanins hydrolysables.

Les résultats obtenus pour les trois extraits sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 09 : Résultats de recherche des tanins condensés et galliques dans les 3 extraits.

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Tanins condensés	-	-	++
Tanins galliques	-	-	+

On peut donc conclure que les tanins condensés sont présent considérablement dans l'extrait Butanolique. Cependant, ces derniers sont totalement absents dans l'extrait chloroformique et acétate d'éthyle.

V.4. Recherche des stérols et triterpènes

Les réactions caractéristiques des stérols et des triterpènes ont été révélés dans les trois extraits, les résultats sont réunis dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Résultats de recherches des stérols et triterpènes.

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Stérols et terpènes	+	++	+

Les résultats obtenus permet de confirmé la présence des stérols et des terpènes dans les 3 extraits. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche de ses molécules.

V.4. Recherche des Saponosides

Après agitation, la mousse persistante dans les tubes pour plus d'un quart d'heure ayant une hauteur de plus d'un cm (Figure 29) indique la présence des saponosides. L'indice de mousse est calculé par la suite selon la formule suivante :

$$\text{IM} = \text{l'inverse } C \times D$$

Où :

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

D : Dilution dans de tube N°2 = 2 / 10

$$\text{IM} = 1/100 \times 2/ 10 = 2/1000$$

$$\text{IM} = \text{l'inverse } 2/1000 = 1000/ 2 = 500 > 100$$

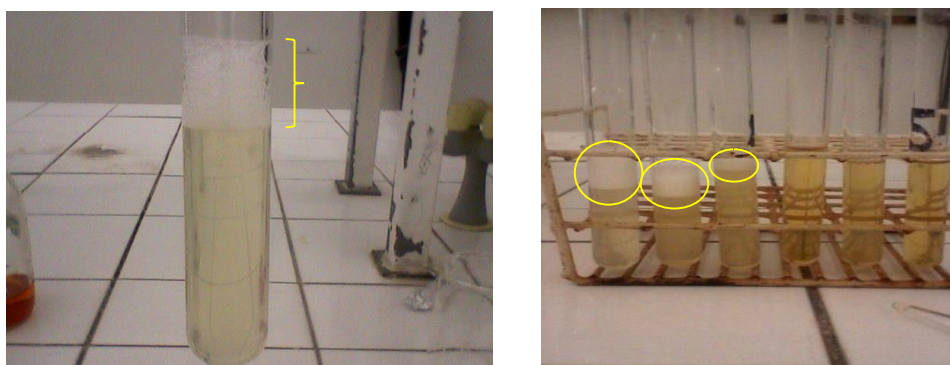


Figure 29 : Caractéristique des saponosides.

Les résultats obtenus ont montré que seul l'extrait Butanolique renferme des saponosides (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats de recherche des saponosides.

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Saponines	-	-	+++

Afin de résumer le criblage phytochimique de la plante, le tableau 12 récapitule les résultats obtenus pour les différents tests élaborés et montre la présence ou l'absence des composés pour chaque extrait :

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats.

Extrait	Flavonoïdes	Tanins condensés	Terpène et stérol	Saponine	Alcaloïdes
CHCl ₃	+++	-	+	-	-
AcOEt	+	-	++	-	-
n-BuOH	++	+++	+	+++	-

(+) : présence ; (++) : présence considérable ; (+++) : abondance ; (-) : absence

Tous ces métabolites secondaires identifiés dans les différents extraits sont à l'origine de nombreuses propriétés pharmacologiques. En effet, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes sont des antioxydants par excellence reconnus (**Husain *et al.*, 1987 ; D'abrosca *et al.*, 2007**) Outre leur pouvoir antioxydant. Ils sont des antiulcéreux, antispasmodiques, analgésiques, anti sécréteurs et des anti-diarrhéiques (**Di Carlo *et al.*, 1999**). Les tanins manifestent les propriétés de la vitamine P. Ils renforcent les vaisseaux sanguins et contribuent à l'accumulation de la vitamine C dans l'organisme (**Lazurevskii *et al.*, 1966**). Les polyphénols en général possèdent un effet de rétention potassique qui fait d'eux des diurétiques (**N'guessan, 2008**).

Les saponosides ont des effets : antiviral, hypocholestérolémiant, hépato-protecteur, antitumoral, et anti-cancérigène (**Hayashi *et al.* 1997 ; Kuzuhara *et al.*, 2000 ; Kerwin, 2004**).

Les stérols et polyterpènes ont la capacité de diminuer les risques de maladies cardiovasculaires s'ils sont associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol (**US FDA, 2000**). Ils sont également utilisés en cosmétique comme émulsifiants et bactéricides (**Clark, 1996**).

V.5. Description des profils chromatographique de l'HPLC

L'observation de profil chromatographique de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de l'espèce du Genre *Genista* (figure.30) par HPLC, montre bien la richesse de ce dernier en métabolites secondaires notamment les polyphénols qui absorbent bien à 280 nm.

La figure 31 montre la présence de deux séries de composés isoflavoniques ($\lambda = 325$ nm) de polarité différente :

- ❖ La première série des composés polaires entre $t_r = 1$ et 5 min
- ❖ La deuxième série des composés apolaires entre $t_r = 15$ et 30 min

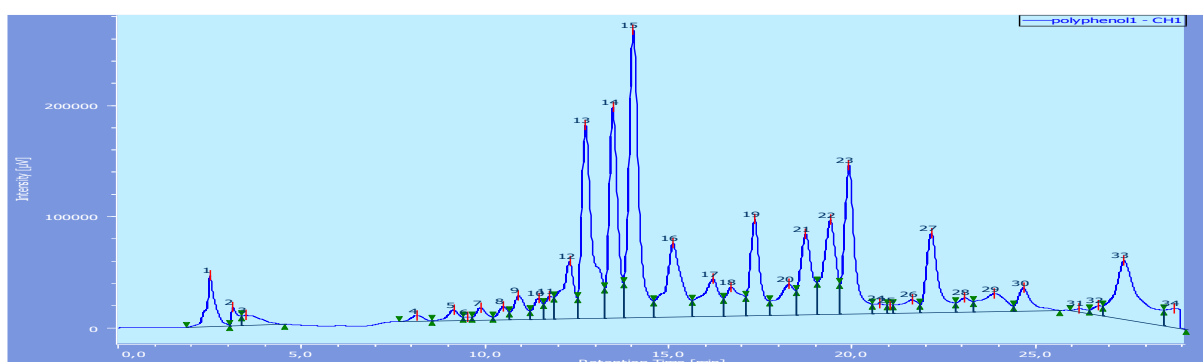


Figure 30 : Chromatogrammes CLHP analytique de l'extrait méthanolique des feuilles-fleurs de la plante à 280 nm.

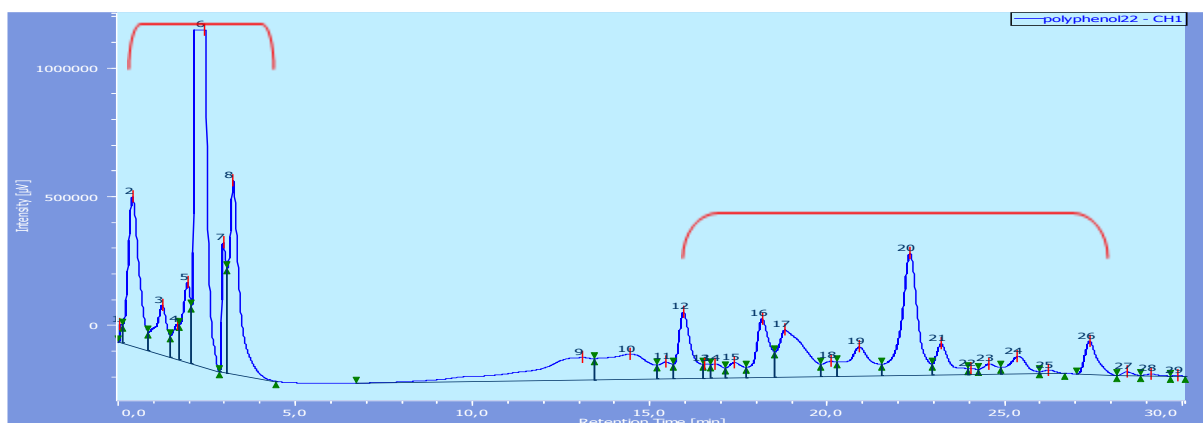


Figure 31 : Chromatogramme CLHP analytique de l'extrait méthanolique des feuilles-fleurs de la plante à 325 nm

V.6. Détermination structurale du composé GN1

Le composé GN1 se présente sous forme d'une poudre jaune. Il donne une tache orange à la lumière UV à 365 nm et se révèle en jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C. Ceci suggère une nature isoflavonoïdique de ce composé.

Le spectre UV du composé GN1 enregistré dans le MeOH présente deux bandes d'absorbances maximales : la bande I à 364 nm sous forme d'un épaulement et la bande II à 261 nm (figure 32) tel que la bande I est caractéristique d'un squelette de type **isoflavone**.

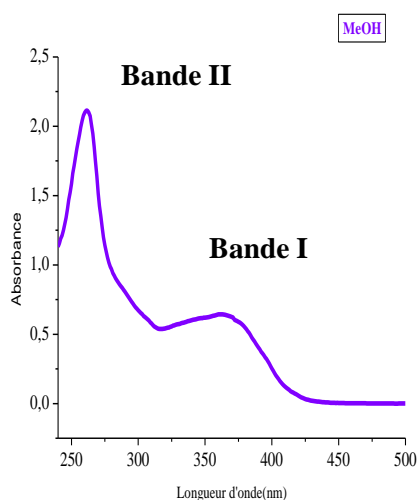


Figure 32 : Spectre UV du composé GN1

L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de 65 nm pour la bande I, indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle la présence d'un OH libre en position 7.

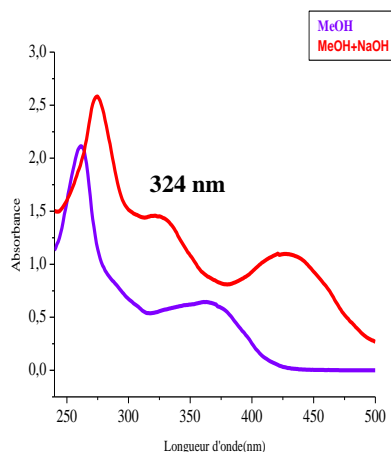


Figure 33 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH et NaOH

L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 6 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7

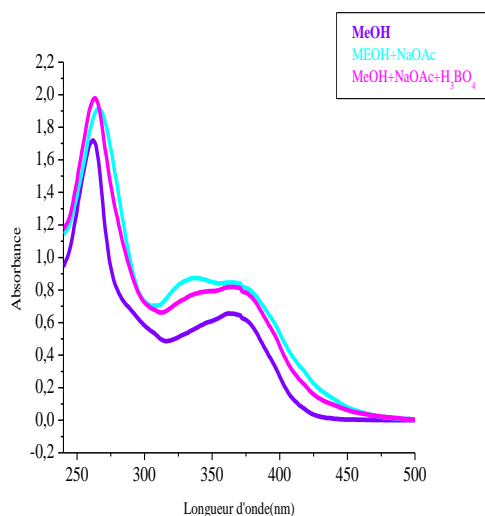


Figure 34 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH, NaOAc et H₃BO₄

Le déplacement bathochrome de 54 nm de la bande I, observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié (AlCl₃ + HCl), indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl₃ + HCl / AlCl₃, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B

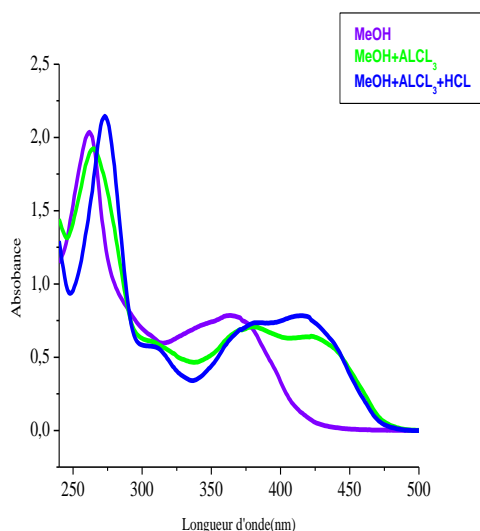


Figure 35 : spectre UV du composé GN1 enregistré dans le : MeOH, AlCl₃ + HCl

La nature de ce composé est mise en évidence une fois de plus par l'analyse du spectre RMN ^{13}C (figure 36) qui révèle l'existence d'un nombre important de signaux entre 94,6 et 181,5 ppm attribués aux carbones aromatiques de ce flavonoïde.

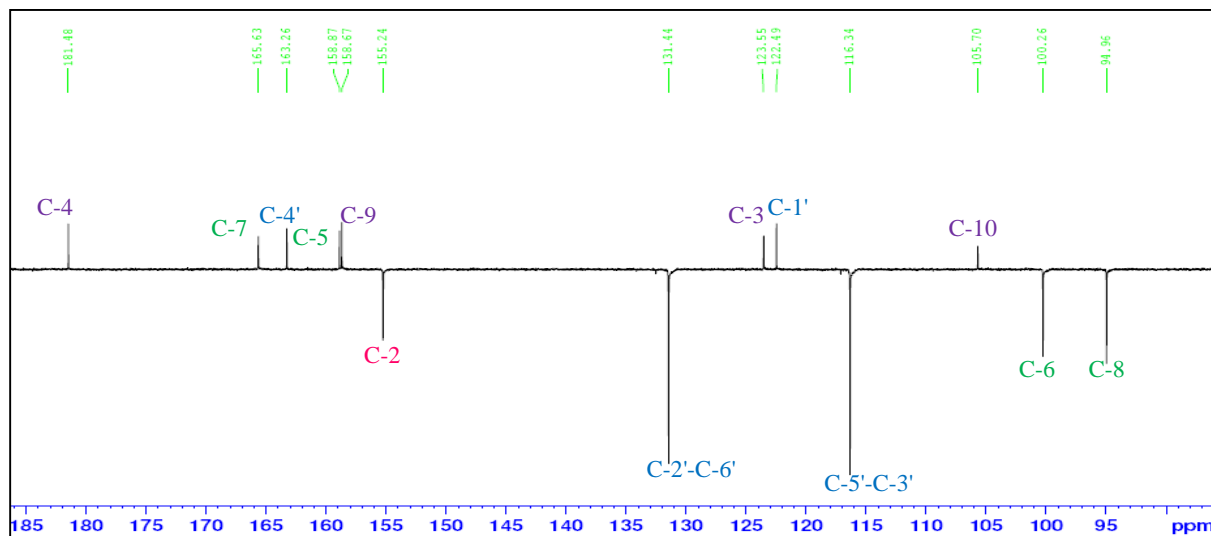


Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé GN1

L'analyse du spectre de RMN ^1H (figure 37) du composé GN1 montre la présence de :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,31$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,39$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-8, le second à $\delta = 6,23$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-6 indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta_{\text{H}} 6,83$ ($d, J = 8,6$), et $7,38$ ($d, J = 8,5$), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6', respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé GN1 sont réunis dans le tableau 13.

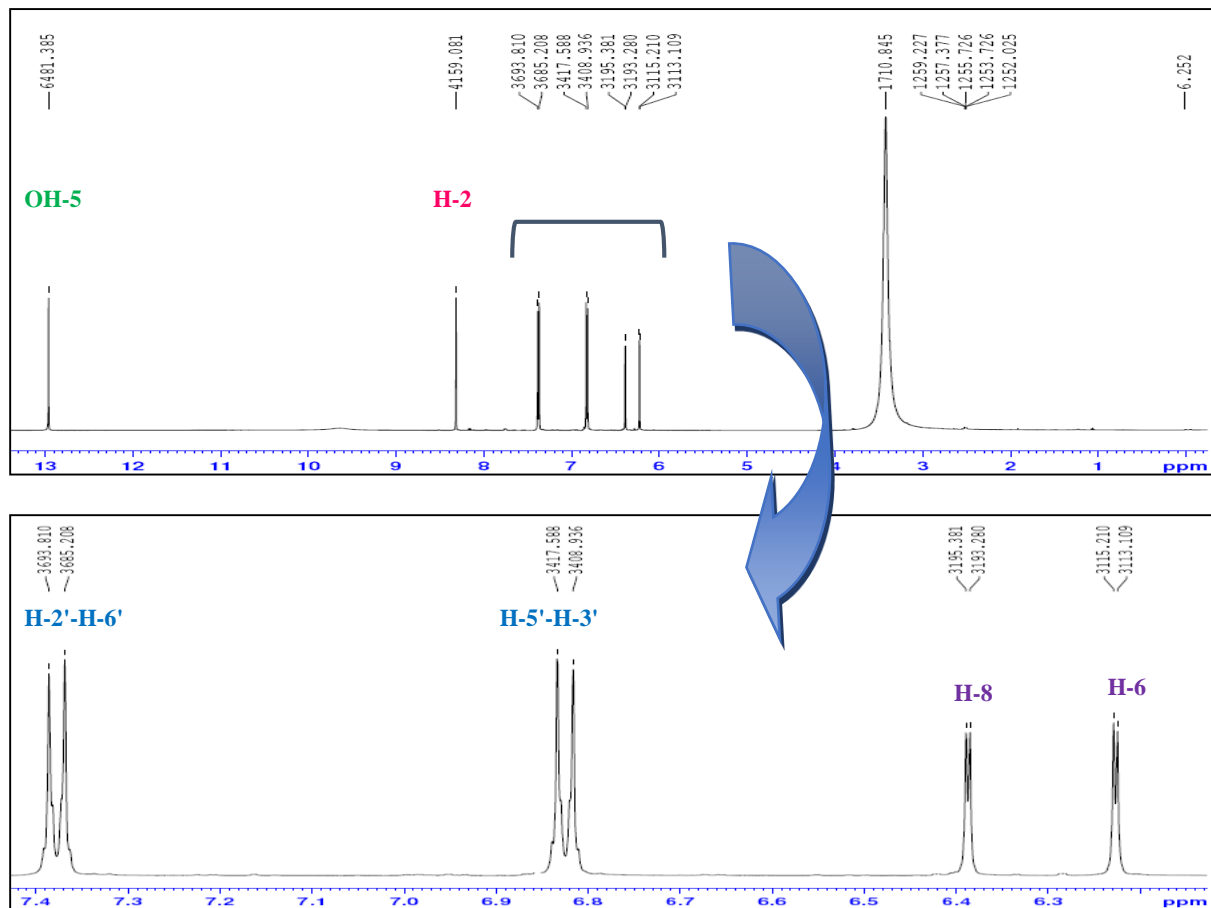


Figure 37 : Spectres de RMN ^1H composé GN1.

Ces données spectrales UV et RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour la **Génistéine** isolée pour la première fois de *Genista tinctoria* en 1899 par Perkin and Newbury (Kristina *et al.*, 2013).

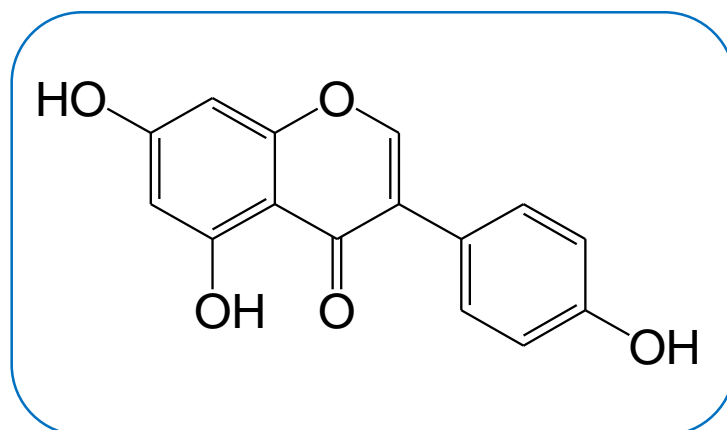


Figure 38 : Structure de la Génistéine

Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du GN1 dans CD_3OD .

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
2	155,2	s, 8,31
3	123,6	-
4	181,5	-
5	158,9	-
6	100,3	6,23 d (2,1)
7	165,6	-
8	94,6	6,39 d (2,1)
9	158,7	-
10	105,7	-
1'	122,7	-
2'	131,5	7,38 d (8,6)
3'	116,3	6,83 d (8,6)
4'	163,3	-
5'	116,3	6,83 d (8,6)
6'	131,2	7,38 d (8,6)

V.7. Détermination structurale du composé GN2

Ce composé est purifié sous forme d'une huile blanche soluble dans le chloroforme. Il montre sur CCM une tache qui se colore en rose après révélation par une solution acide et chauffage à 100°C .

Le spectre RMN ^1H de ce composé GN2 (Figure 39) montre des signaux à champ fort sous forme multiplet, doublet et singulets d'intégration 3H chacun, résonant dans une région allant de 0,70 à 1,3 ppm, caractéristiques de protons méthyliques. Il montre aussi un signal sous forme doublet large d'intégration 1H à 5,37 ppm caractéristique d'un proton oléfinique, ainsi qu'un signal multiplet d'intégration 1H repéré à 3,51 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxydé. Ce premier constat permet d'avancer pour notre composé un squelette stéroïdique (phytostérol).

L'identification structurale complète de cette molécule nécessite d'autres méthodes d'analyses comme résonance magnétique nucléaire bidimensionnel RMN 2D

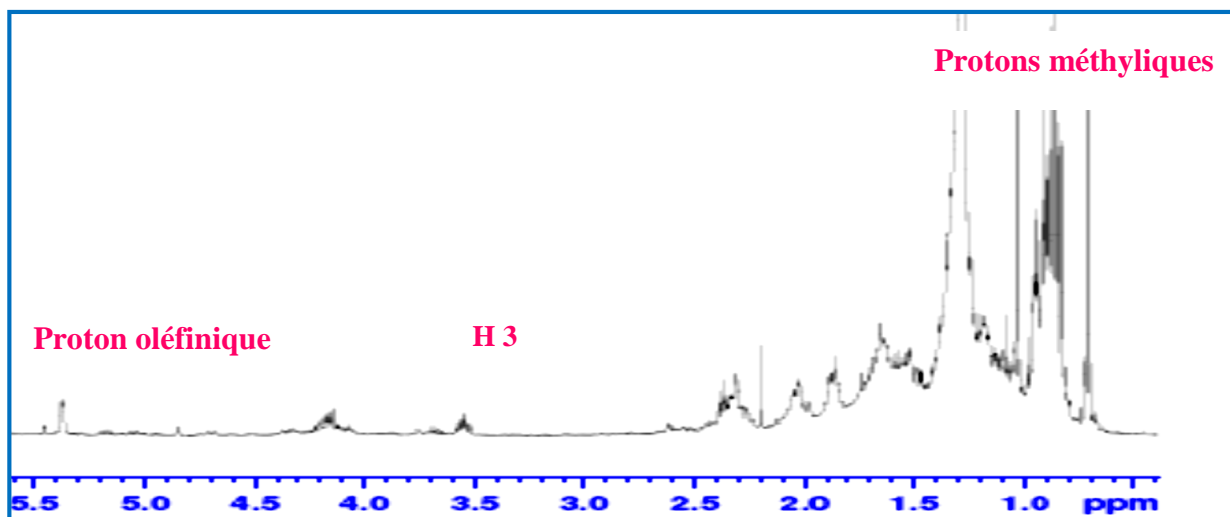


Figure 39 : Spectres de RMN ^1H composé GN 2.

V. 8. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés est attribuée à divers mécanismes d'action, parmi eux, la capacité réductrice, la fixation des ions métalliques de transition (catalyseurs), la décomposition des peroxydes, et l'activité scavenger ainsi que d'autres activités (Gülçin *et al.*, 2004). De plus, la capacité antioxydante des extraits végétaux est largement influencée par la composition des extraits et les conditions de la réalisation du test. Pour cette raison, il est nécessaire d'effectuer plus d'une mesure de l'activité antioxydante afin de prendre en considération les différents mécanismes d'action (Li *et al.*, 2008). Dans ce travail, quatre mécanismes d'action ont été étudiés ; l'activité scavenger du DPPH $^\circ$ et de l'ABTS $^\circ+$, l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (test de blanchiment du bêta carotène) et enfin la capacité de réduction de cuivre par le teste Cuprac.

VI. 8.1. Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

❖ Mise en évidence de l'activité

L'activité anti radicalaire a été mise en évidence grâce à une révélation des plaques CCM des deux extraits par le DPPH, la figure 40 montre les chromatogrammes obtenus.

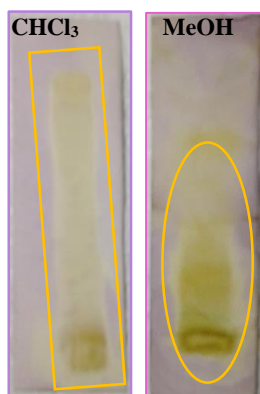


Figure 40 : Mise en évidence de l'activité antiradicalaire.

Les zones claires sur un fond violet montre la forte activité antiradicalaire des deux extraits notamment l'extrait chloroformique ceci nous a encouragé à doser l'activité antiradicalaire des deux extraits.

❖ Dosage de l'activité antiradicalaire par le test DPPH

L'absorbance a été mesuré à 517 nm, le pourcentage d'inhibition est calculé par la suite selon la formule (1) suivante :

$$\% I = [(Abs\ contrôle - Abs\ extrait) / Abs\ contrôle] \times 100$$

L'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait méthanolique, chloroformique la fraction F9 et la génistéine a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Le standard utilisé est le α -Tocopherol. Les résultats obtenus on permit de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des d'extraits et de standard (Figure 41).

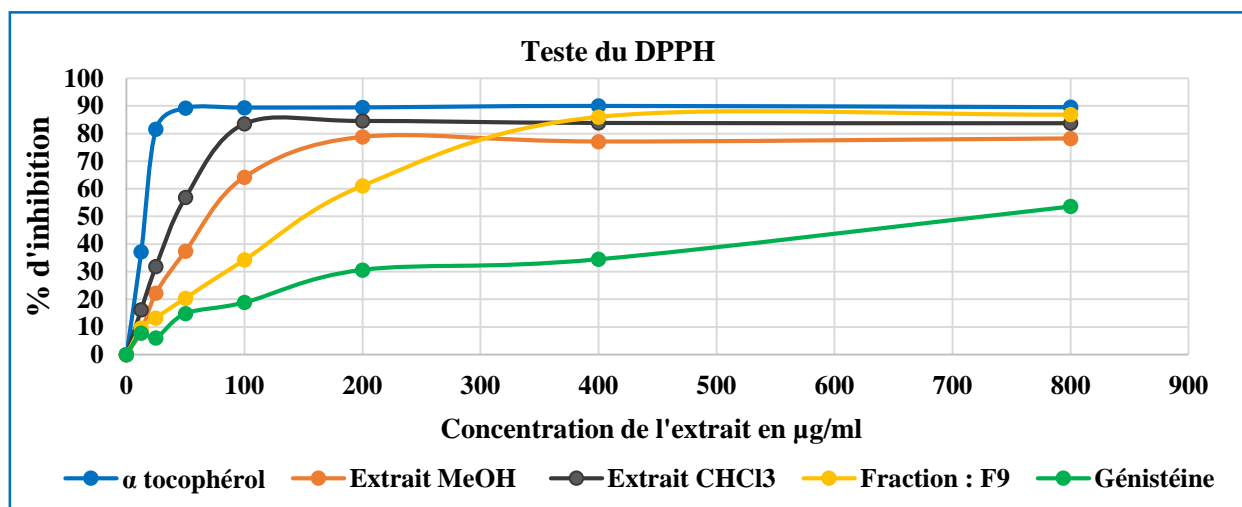


Figure 41 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extrait de plante.

La figure 41 révèle que l'extrait méthanolique, chloroformique, la fraction F9 et la génistéine possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante.

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition) afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.

➤ Détermination de l'IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ exprimée en µg/ml a été déterminée graphiquement en utilisant le logiciel Statgraphics à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé (**Figure 42**).

Les valeurs de l'IC₅₀ de chaque extrait ainsi que celle de l'α tocophérol sont classés par ordre croissant sous forme d'histogramme (**Figure 43**).

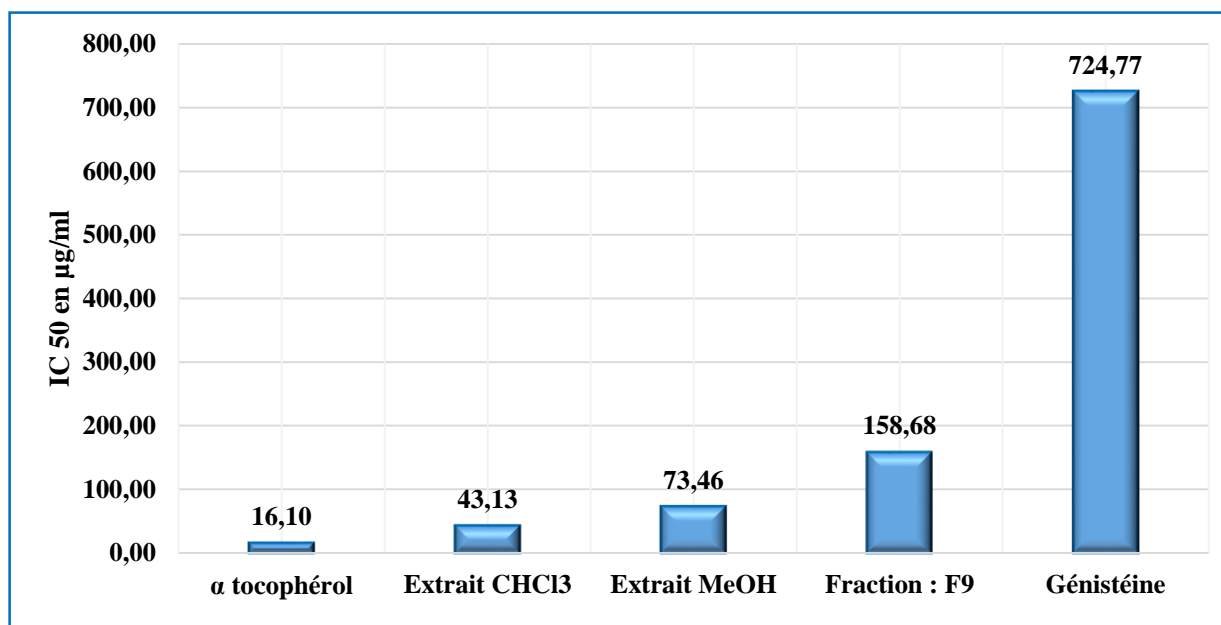


Figure 42 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudiés classés en ordre croissant.

Une valeur plus faible de l'IC₅₀ (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée.

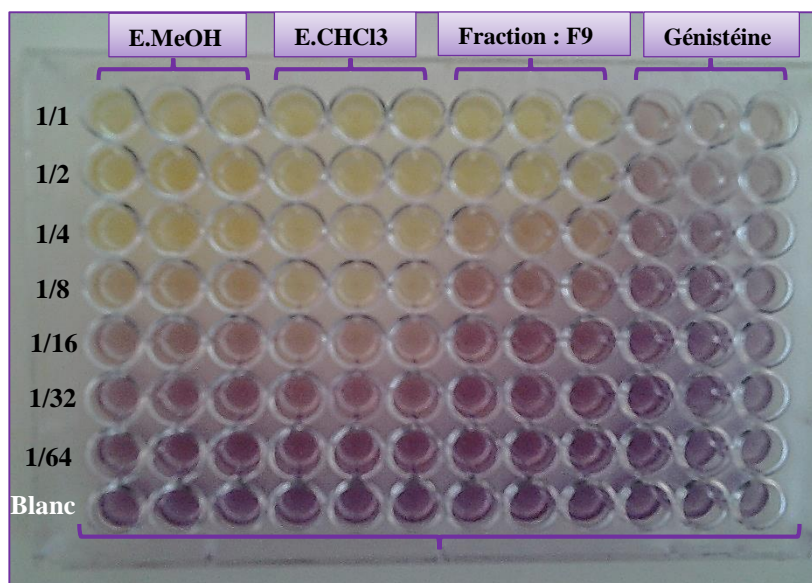


Figure 43 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH)

Les pourcentages d'inhibitions de l'activité antiradicalaire révèlent que les deux extraits (méthanolique, chloroformique), ainsi que la fraction F9 possèdent une activité anti radicalaire (Figure 41 et 42).

➤ Discussion des résultats

Parmi les extraits testés, l'extrait chloroformique représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de l'ordre de $43,13 \mu\text{g/ml}$ en confirmant le résultat du CCM de criblage phytochimique suivi par l'extrait méthanolique avec une IC_{50} de $73,46 \mu\text{g/ml}$. Cependant la fraction F9 ainsi que la génistéine ont présentée des IC_{50} plus faible de l'ordre de $158,68$ et $724,77 \mu\text{g/ml}$ respectivement. En comparaison avec le standard, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, par exemple l'activité antiradicalaire de l'extrait chloroformique est 3 fois moins importante de celle de l'alpha tocophérol qui présente une IC_{50} égale à $16,10 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antioxydante de notre extrait chloroformique est similaire à celle obtenu par Boukaabache et ces collaborateurs (**Boukaabache et al., 2013**) pour leurs études de la plante *Genista quadriflora* (Fabaceae) dont l' IC_{50} égale à $58,97 \mu\text{g/ml}$. Egalement l'extrait méthanolique de *Genista vuralii* avait présenté une activité antiradicalaire semblable à celle de notre espèce par une IC_{50} égale à $77,95 \mu\text{g/ml}$ selon **Duran et al, 2015**.

L'activité antioxydante des extraits pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques et plus particulièrement les composés flavoniques. Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (**Kadri et al., 2011. Ghedadba et al., 2014**).

En se basant sur ces résultats, on peut conclure que la variation de capacité antioxydante de ces extraits comparativement à celle du témoin (α tocophérol) pourrait être **principalement** due à la présence des composés phénoliques, et de leurs taux dans ces extraits notamment dans l'extrait chloroformique.

VI. 8.2. Activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

L'activité scavenger des extraits est également étudiée en utilisant l'ABTS. Ce dernier réagit avec le persulfate de potassium pour donner le radical ABTS^{•+}. La génération du radical avant l'ajout des extraits est nécessaire afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante (**Katalinic et al., 2006**). L'ajout de l'extrait ou du BHA entraîne une décoloration de la solution indiquant l'existence d'une activité scavenger des échantillons.

Après avoir mesuré l'absorbance à 734 nm, les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule (1) précédemment utilisé pour l'activité DPPH.

Cependant la forte activité du BHA nous a obligés d'établir une série de dilution beaucoup plus large que celles utilisée pour les extraits. Le tableau 14 résume les résultats obtenu.

Tableau 14 : Gamme de dilution du standard.

BHA									
Concentration en $\mu\text{g/ml}$	800 \rightarrow 12,5	6,25	4,69	3,52	2,64	1,98	1,48	1,11	IC ₅₀
% d'inhibition	95-94	93,49	84,73	66,44	51,69	39,29	30,43	22,46	2,54
S.D	$\pm 0,36$	$\pm 0,36$	$\pm 1,15$	$\pm 0,63$	$\pm 0,27$	$\pm 1,04$	$\pm 1,36$	$\pm 0,72$	

*Les valeurs exprimées représentent la moyenne \pm l'écart type (S.D) des trois répétions pour chaque essai.

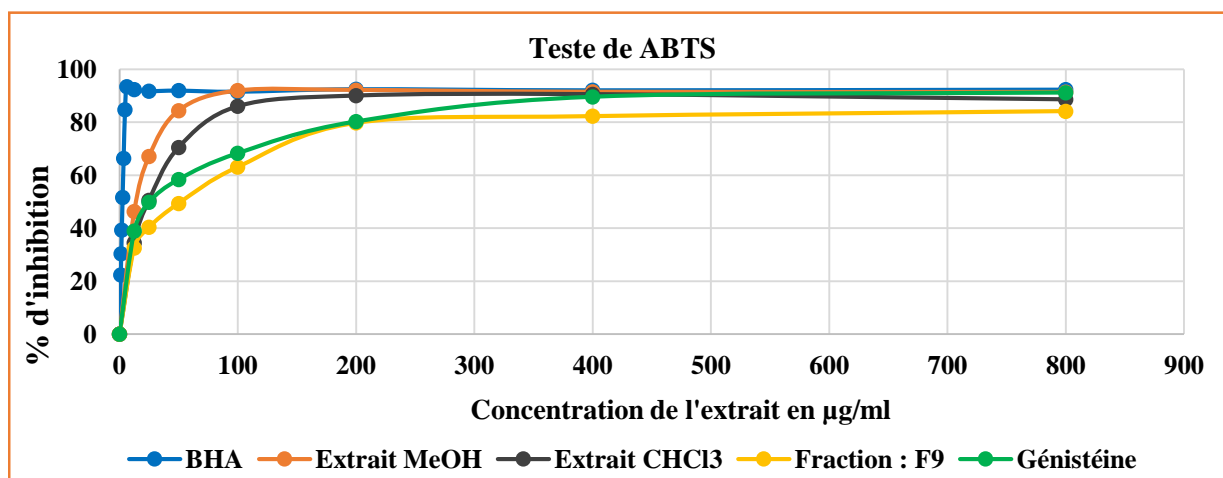


Figure 44 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par différents extraits de la plante.

La figure 44 représente les courbes des pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations de chaque échantillon testé obtenues à partir des valeurs expérimentales permettant ainsi de calculer l'IC₅₀ des différents extraits grâce au logiciel Statgraphics.

Et afin de faciliter l'étude comparative des échantillons avec le standard, les résultats des IC₅₀ ont été traduits sous forme d'historgramme (Figure 45).

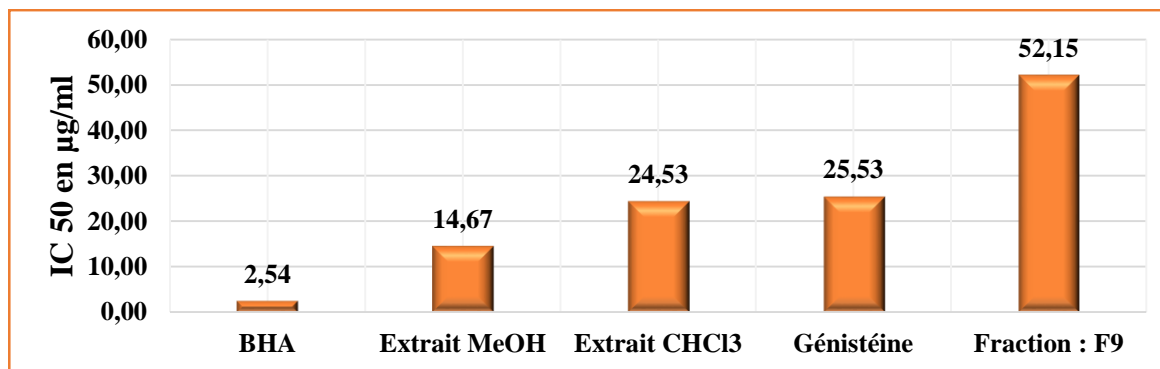


Figure 45 : valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

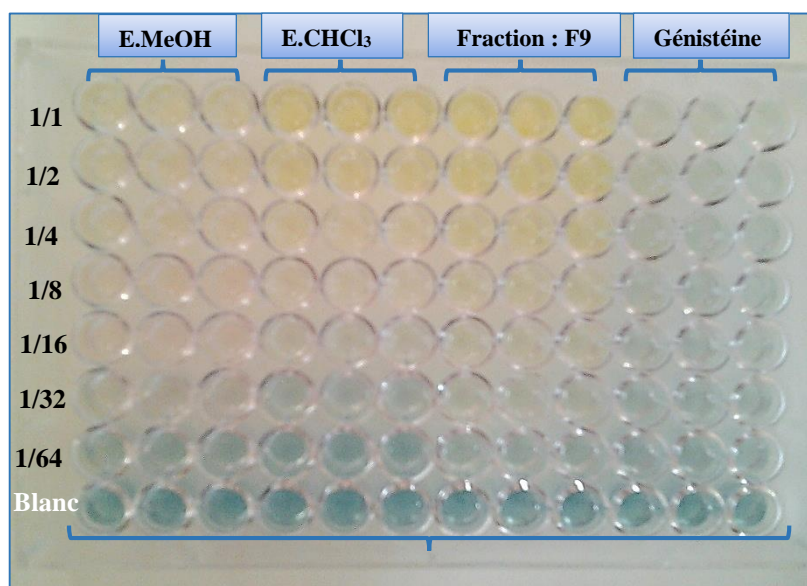


Figure 46 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS)

Les valeurs des IC₅₀ qui sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante sont en accord avec ces observations (Figure 46).

➤ Discussion des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS est proportionnel à la concentration des extraits et du BHA. Ils montrent clairement que tous les échantillons testés possèdent bien une propriété antioxydante intéressante.

Le BHA utilisé comme standard présente les pourcentages d'inhibition les plus importants de l'ordre de 90% pour les 8 premières concentrations (de 800 jusqu'à 6,25 µg/ml) et un IC₅₀ égale à 2,54 µg/ml, possédant l'activité la plus importante entre les échantillons testés. Toutefois, l'extrait méthanolique est 7 fois moins actif que le BHA.

L'extrait chloroformique ainsi que la génistéine possédant des IC₅₀ presque semblable 24,53 et 25,53 µg/ml respectivement. L'activité de l'extrait chloroformique pourrait être expliquée par la présence d'un produit majoritaire ; le GN1 qu'il s'agit bien de la génistéine dans cet extrait.

L'activité antioxydante de notre extrait méthanolique est similaire à celle de Godevac *et al.*, 2008 qui ont trouvé un très bon potentiel antiradical (ABTS⁺), avec un IC₅₀ aux environs de 14.06±23.08 µg/ml pour l'extrait méthanolique d'*Anthyllis aurea* (Fabaceae). Cependant, l'activité antioxydante de notre espèce est deux fois supérieure à celle de *Anthyllis vulneraria* 29.52±0.81 µg/ml est sept fois supérieure à celle de *Coronilla emerus* 107.17±2.43 µg/ml (Fabaceae) (Godevac *et al.*, 2008).

VI. 8.3. Test de Blanchissement de la Béta-carotène

Dans cette analyse, la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et de la formation des hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaquent simultanément le β-carotène et ayant comme résultat le blanchiment du β-carotène et la disparition de sa couleur orange, cette dernière mesurée spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β-carotène (Kubola et Siriamornpun, 2008).

Les courbes de la cinétique de blanchiments du β- Carotène en fonction du temps ont permis de mettre en évidence la propriété antioxydante des échantillons et du standard (Figure 47).

Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés par la suite grâce à la formule suivante :

$$PI = [(D.O E_{120} - D.O T_{120}) / (D.O T_0 - D.O T_{120})] \times 100$$

Où :

D.O E₁₂₀ : Absorbance de l'extrait à T = 120 min

D.O T₁₂₀ : Absorbance du témoin négatif à T= 120 min

D.O T₀ : Absorbance du témoin négatif à T = 0 min

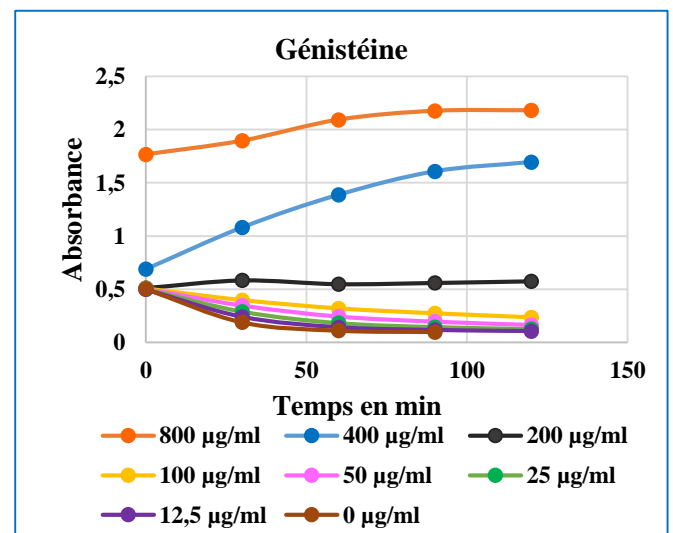
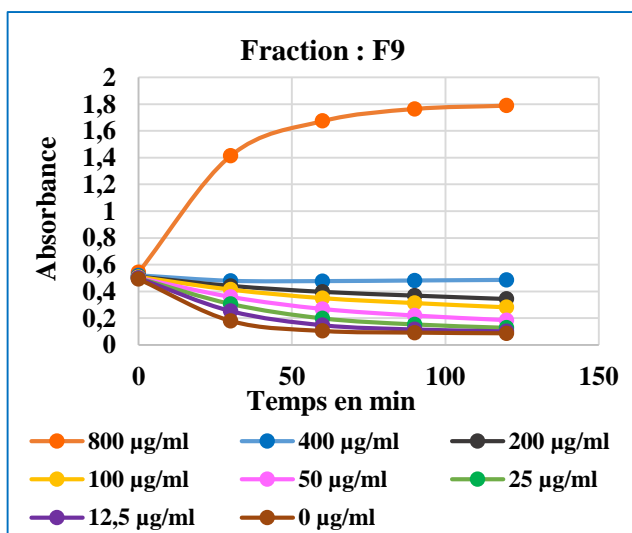
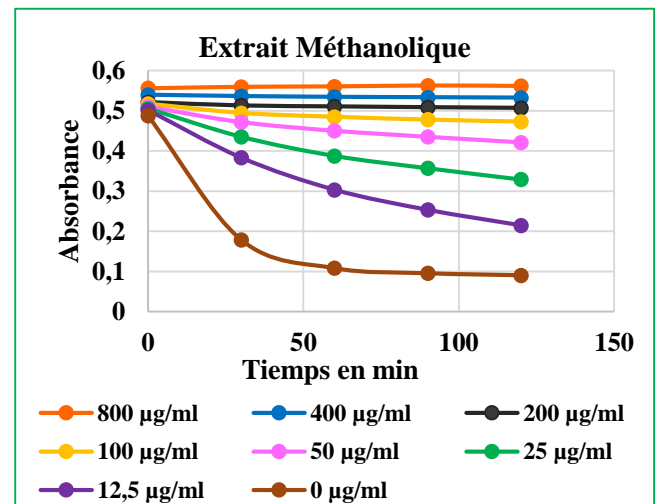
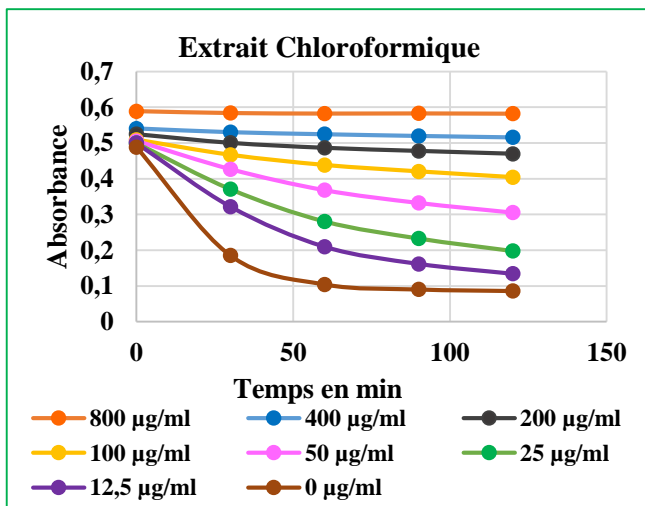
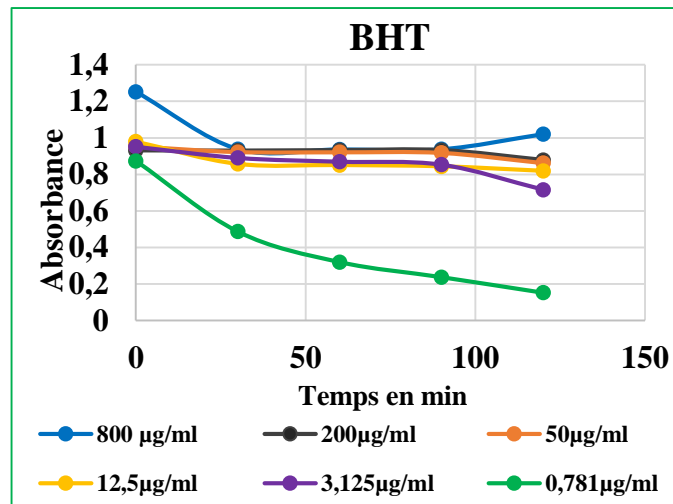


Figure 47 : Suivre de la cinétique des différents échantillons testés.

Les valeurs d'IC₅₀ obtenu grâce au logiciel Statgraphics ont été classées par ordre croissant (Figure 48)

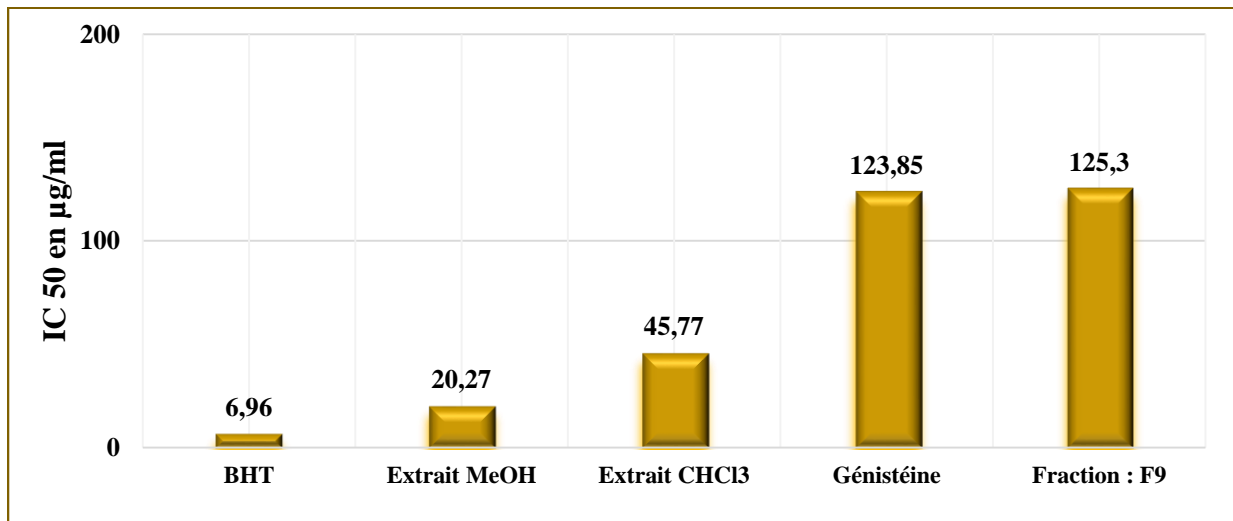


Figure 48 : valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudiées classes en ordre croissant.

Exprimée en IC₅₀ les résultats obtenus pour cette activité sont en accord avec les observations (Figure 49).

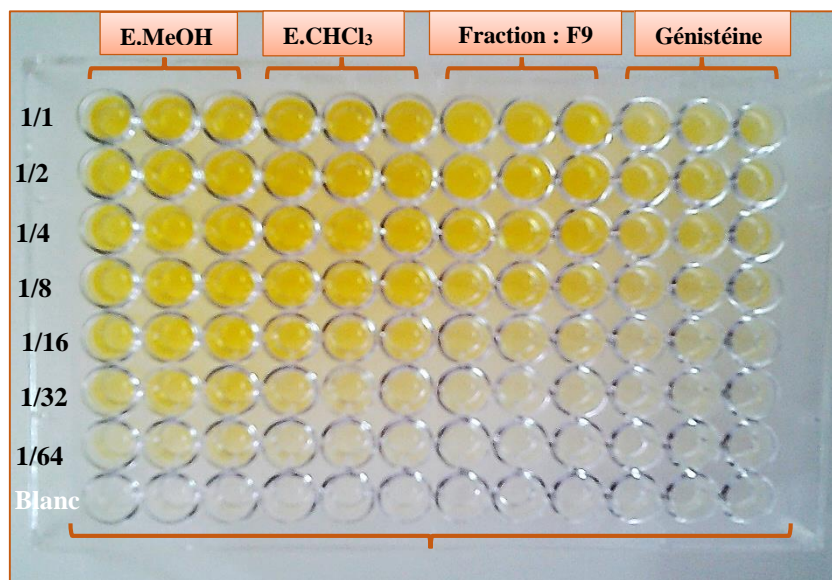


Figure 49 : Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (Teste de blanchiment du B-Carotène)

➤ Discussion des résultats

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes (**Terpinc, et al., 2009**). C'est la raison pour laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Ferreria, et al., 2006**).

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène on peut noter que les extraits méthanolique, chloroformique, la fraction F9 ainsi que la génistéine exercent un effet préventif significatif contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle positif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorbance durant les 120 minutes d'incubation.

L'extrait méthanolique exerce la plus grande activité inhibitrice des échantillons étudiés. A forte concentration, l'extrait méthanolique présente une activité 3 fois moins importante que le BHT (IC_{50} égale à 20,27 $\mu\text{g/ml}$). Cependant, l'extrait chloroformique possède la moitié de l'activité de l'extrait méthanolique. La fraction F9 et la génistéine sont moins actives et présentent une propriété antioxydante similaire avec une IC_{50} de l'ordre de 123,85 et 125,30 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ceci suggère que l'activité antioxydante enregistré pour la fraction F9 est dû à la présence de la Génistéine dans la fraction.

VI. 8.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak et al en 2004. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{2+} - Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^+ -Nc qui absorbe à 450 nm.

Les IC_{50} sont déterminées à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration grâce au logiciel Statgraphics, elles ont été classées par ordre croissant et présenté sous forme d'histogramme (Figure 51).

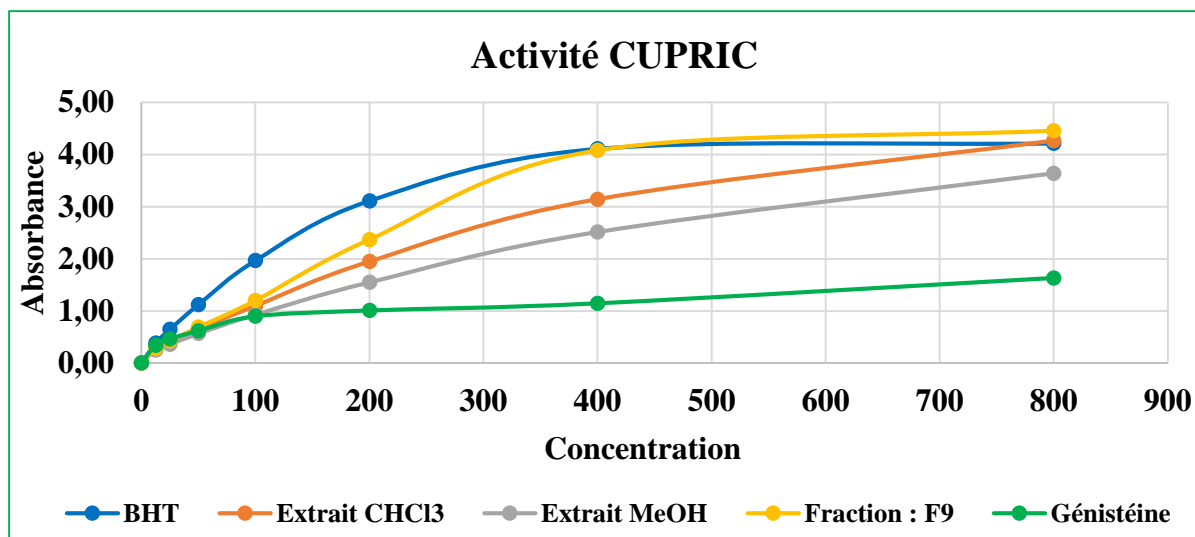


Figure 50 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration des différents extraits de la plante.

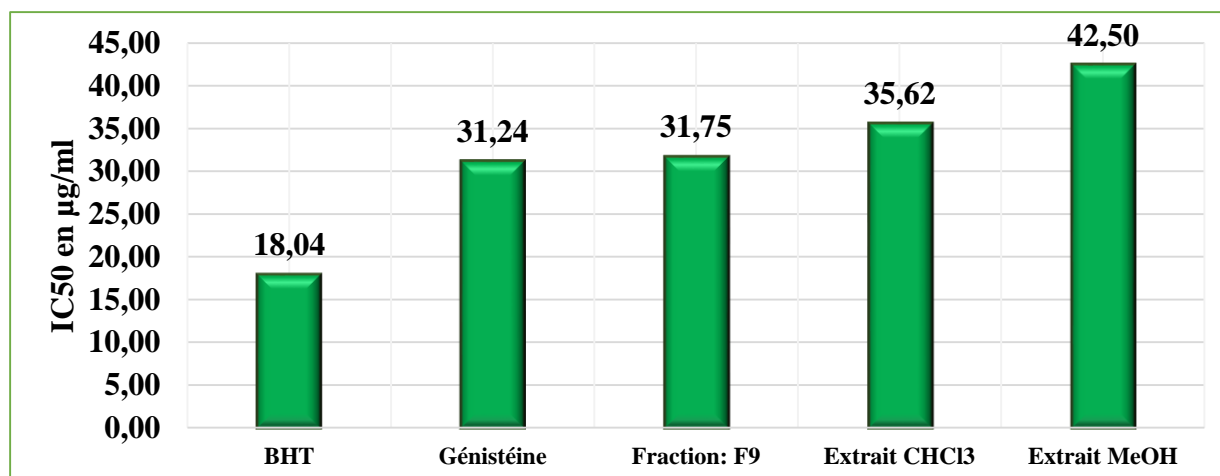


Figure 51 : Valeurs des IC₅₀ exprimées en µg / ml des échantillons étudiés classés en ordre croissant.

➤ Discussion des résultats

Les extraits (chloroformique, méthanolique), la fraction F9 et la génistéine se sont tous révélés capables de réduire le cuivre. La figure 51 présente les courbes de l'absorbance en fonction de la concentration des standards et des extraits, et fractions étudiées.

A partir de la figure 51 on peut déduire que la génistéine et la fraction F9 montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui des extraits. Toutefois le BHT présente la plus forte activité réductrice de cuivre, la génistéine ainsi que la fraction F9 ont des activités comparables ceci peut être expliqué par la présence de la génistéine dans la fraction F9, la génistéine montre

l'activité la plus forte des échantillons végétal étudié, malgré cela la génistéine demeure moins active que le BHT.

Sur une échelle plus faible l'extrait chloroformique est plus actif que l'extrait méthanolique avec des IC_{50} égale à 35,62 et 42,50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

VI. 8.5. Bioautographie

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de notre plante, nous avons utilisé la méthode de la bioautographique sur plaque CCM (**Rahalison et al., 1991**). Les extraits méthanolique et chloroformique ont été soumis à ce test. Les spots actifs apparaissent comme des taches blanches sur un fond pourpre (Figure 52).

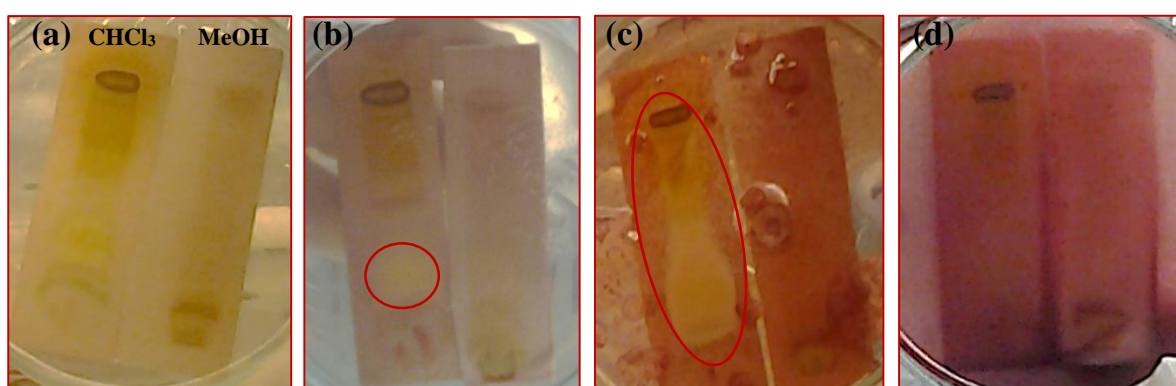


Figure 52 : Résultats de la Bioautographie : (a) résultat pour l'espèce *Escherichia coli*, (b) résultat de pour l'espèce *Enterococcus faecium*, (c) résultat pour l'espèce *Staphylococcus aureus*, (d) résultat pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Le choix des souches s'est basé sur une étude antérieure du pouvoir antibactérien des extraits des plantes de genres *Genista* (**Toubal, 2011**), les extraits de la plante ont montré un grand pouvoir antimicrobien particulièrement avec les souches choisies.

➤ Discussion des résultats

L'extrait méthanolique ne présente aucune activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches testées. Contrairement à l'extrait méthanolique, l'extrait chloroformique a montré un effet inhibiteur important sur la croissance des bactéries Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*. La tâche avec un rapport frontal égal à 0,73 (Figure 53) a été identifiée comme étant la génistéine suite à une séparation et purification sur une colonne de gel de silice en phase normale à partir de l'extrait chloroformique (voir le chapitre 04).

Ce résultat est similaire à celui obtenu par **Verdreng et al., 2004** qui ont signalé la propriété antibactérienne de la génistéine contre les bactéries à Gram positif notamment le genre *Staphylococcus*. Elle exerce une activité inhibitrice sur l'ADN topoisomérase.

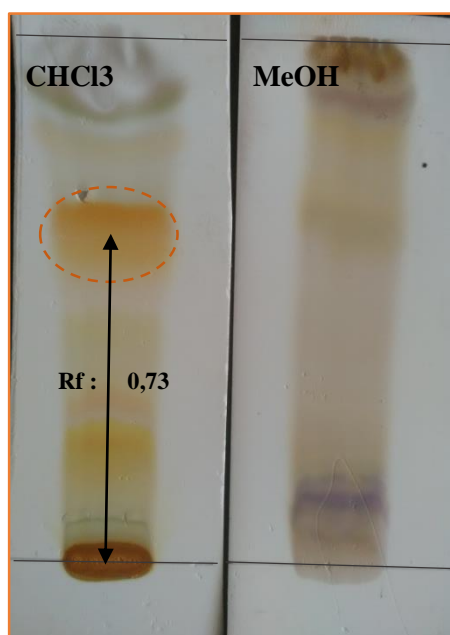


Figure 53 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique et chloroformique : le composé cerné (GN1) est principalement responsable de l'activité antibactérienne.

VI. 8.6. Test de cytotoxicité contre l'artémia

Le modèle *Artemia salina* a été choisi en particulier pour sa mise en œuvre relativement rapide et peu coûteuse. Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition de 24 heures aux échantillons testés rapportée à la mortalité normale à quatre concentrations : 10, 20, 40 et 80 µg/ml (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Résultats de l'activité de cytotoxicité des larves de l'artémia

Quantité de l'extrait/ ml	Extrait chloroformique				Extrait méthanolique			
	80 µg	40 µg	20 µg	10 µg	80 µg	40 µg	20 µg	10 µg
% de mortalité	93,75%	81,25%	68,75%	25%	95,82%	91,66%	79,17%	54,17%

Après 24 heures d'incubation des tubes, le comptage des larves survivantes a révélé un taux de mortalité élevé pour les fortes concentrations des extraits. Le tableau 19 résume les résultats obtenus avec les différentes concentrations des deux extraits.

➤ Le calcul de la DL_{50} et de la CL_{50}

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer les courbes des pourcentages d'inhibitions en fonction de la dose létale (Figure 54). Les doses létale 50 ont été déterminées par la suite en utilisant le logiciel statgraphics.

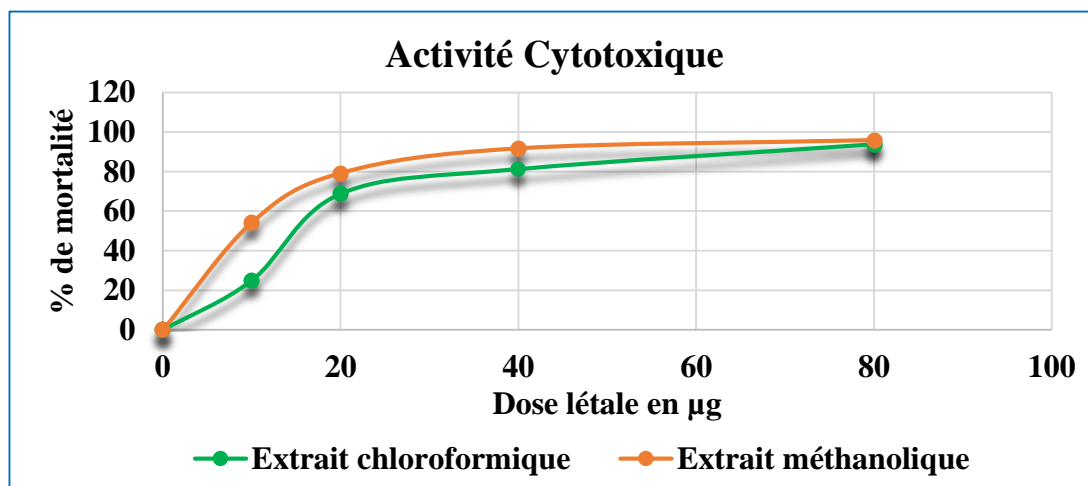


Figure 54 : Courbe de % d'inhibition en fonction de la dose létale.

La figure 55 présente la CL_{50} des deux extraits étudiés et comparés à celle de la Vincristine sulfate (molécule utilisée pour le traitement de plusieurs types de cancer). D'après Md. Atiar Rahman 2013.

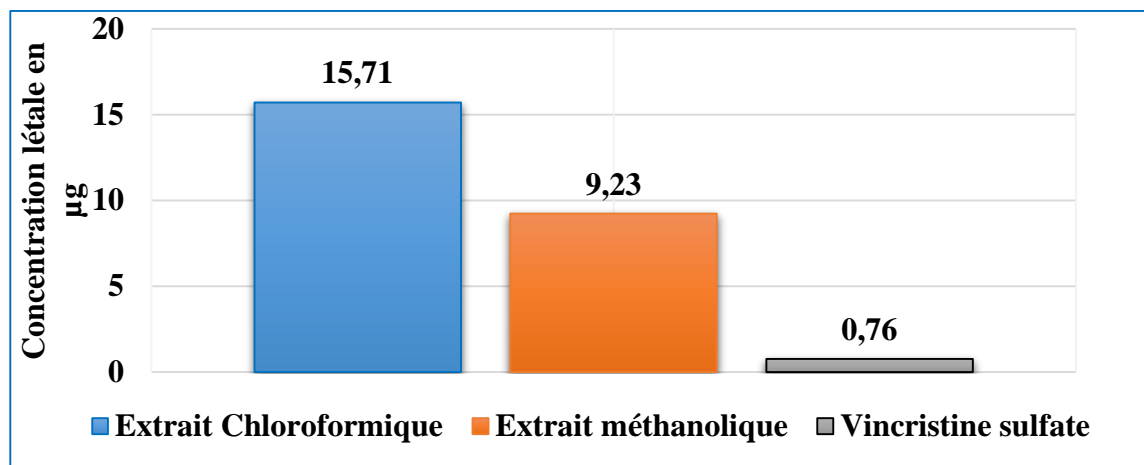


Figure 55 : Histogramme des CL_{50} des extraits et du standard.

➤ Discussion des résultats

D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique est plus toxique que l'extrait chloroformique, présentant des CL_{50} égales à 9,23 et 15,71 µg/ml respectivement. La vincristine sulfate, une molécule très répondue pour le traitement de certains types de cancer, présente une CL_{50} de

0,76µg/ml (**Atiar, 2013**). La comparaison des extraits avec les résultats bibliographiques de la vincristine suggère un éventuel effet clinique contre les cellules tumorales étant donné que la cytotoxicité contre l'artémia est considérée comme un test préliminaire pour évaluer l'activité anti-tumoral, la toxicité contre les champignons, l'effet pesticide ainsi que d'autres effets pharmacologiques (**Meyer et al., 1982**).

L'effet cytotoxique des plantes est dédié principalement à la présence des métabolites secondaires tel que les alcaloïdes, les stéroïdes, les glycosides, les triterpènes parfois même des flavonoïdes (**Ozçelik et al., 2011**). Cela est aussi compatible avec notre observation vu que le screening phytochimique des extraits de notre espèce a révélé la présence des terpénoïdes, des saponosides, des tanins, et des flavonoïdes. D'autres études de toxicité *In vivo* pourraient être menées sur des lignées de cellules pour confirmer l'effet toxique des extraits de cette espèce.



Conclusion Générale

Conclusion générale

Le présent travail porte sur l'investigation chimique et biologique d'une plante médicinale endémique Algérienne appartenant à la famille des Fabaceae ou Leguminosae. Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les alcaloïdes et les saponosides.

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait chloroformique de la plante du Genre *Genista*, a permis d'isoler 2 composés naturels **GN1** et **GN2** appartiennent à deux classes de métabolites secondaires :

- ✓ Un isoflavonoïde (**GN1**)
- ✓ Un phytostérol (**GN2**)

L'isolement et la purification de ces composés ont été essentiellement fondé sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques (VLC, CC et CCM) utilisant divers supports (silice normale et silice greffée RP-18).

La détermination structurale a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN 1D ^1H , ^{13}C et la spectroscopie UV, et la comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antioxydante des extraits méthanolique et chloroformique des feuilles et fleurs de notre espèce a été évalué à différentes échèles par le test DPPH, ABTS, CUPRAC, ainsi que le test de blanchiment de la Béta carotène ce qui nous a permis de confirmer leurs pouvoir scavenger de radicaux libres. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

Les différentes méthodes utilisées ont également montré un pouvoir antioxydants pour le composé GN1 et la fraction F9. L'étude du pouvoir antibactérien de l'extrait chloroformique a montré une activité antibactérienne vis-à-vis les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*), cependant l'extrait méthanolique n'as montré aucune activité antibactérienne.

La cytotoxicité des extraits méthanolique et chloroformique a été également évalué grâce au test de cytotoxicité contre l'artémia, les deux extraits ont prouvé une grande cytotoxicité mais qui reste loin d'être comparé au anticancéreux actuellement utilisé tel que la vincristine sulfate.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus ouvre des perspectives d'utilisation de cette plante pour différents usage et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une espèce du Genre *Genista* de la famille Fabaceae ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, antibactérienne et cytotoxique des extraits végétaux et des produits isolés. Cette plante endémique de l'Algérie n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et CC) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) de 2 métabolites secondaires de nature flavonoïdique (GN1), et stéroïdique (GN2).

Les extraits de la plante ainsi que le produit isolé GN1 ont manifesté un grand pouvoir antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS, CUPRAC et le test de Blanchiment de Béta carotène. L'extrait chloroformique a montré également une activité antibactérienne contre deux souches bactérienne Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*).

Les deux extraits méthanolique et chloroformique ont montré une cytotoxicité contre les larves de l'artémia. Les résultats obtenus sont très promoteurs pour une utilisation de cette plante dans la médecine moderne.

Mots clés : Fabaceae, *Genista*, screening phytochimique, activité antioxydante, cytotoxicité, activité antibactérienne, RMN, HPLC, VLC.

المخلص

خصص هذا العمل للدراسة الكيميائية لنبات من صنف *Genista* عائلة الفصيلة البقولية وتقييم النشاط المضاد لأكسدة، و النشاط المضاد للبكتيريا و الخاصة السمية للمستخلصات والمركبات المعزولة من هذا النبات. هو نبات مستوطن في الجزائر لم يخضع لأيت دراسة كيميائية نباتية أو تقييم بيولوجي.

سمح هذا العمل بعزل عن طريق الكروماتوغرافيا (VLC، CCM و CC) وتحديد الهيكل بمختلف الطرق الطيفية (الرنين المغناطيسي والأشعة فوق البنفسجية) لمركبين ثانويين من نوع الفلافونويد (GN1) والستيرويدية (GN2).

أظهر فحص المستخلصات النباتية والمركب GN1 النشاط الكبير المضاد للأكسدة وذلك عن طريق اختبار DPPH، ABTS، CUPRAC واختبار تبييض البيتا كاروتين. كما أظهر مستخلص الكلوروفورم أيضا نشاط مضاد للبكتيريا ضد نوعين من البكتيريا إيجابية الغرام (*Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecium*).

وقد أظهر كل من المستخلصين الميثانولي وكلوروفورمي السمية الخوية ضد يرقات الأرتيميا. وكانت النتائج واعدة للغاية لاستخدام هذا النبات في الطب الحديث.

الكلمات المفتاحية: الفصيلة البقولية، *Genista*، RMN، HPLC، VLC، السمية الخلوية، مضاد للجراثيم، النشاط المضاد للأكسدة، الفحص الكيميائي النباتي.

Abstract

This work is dedicate to the phytochemical study of one species of *Genista*, Fabaceae family as well as the evaluation of the antioxydant, antibacterial and cytotoxic activity of their vegetable extracts and isolated products. This Algerian endemic plant was not the subject of any phytochemical study or a biological proprieties evaluation.

This work allowed insolation by the chromatographic methods (VLC, CCM and DC) and the characterization by the various spectroscopic methods (NMR and UV) of two secondary metabolites of flavonoidic nature (GN1), and steroidal (GN2).

The extracts of the plant as well as the product isolated GN1 expressed a great antioxydant power by the methods of DPPH, ABTS, CUPRAC and the test of Beta carotene Bleaching. The chloroformic extract also showed an antibacterial activity against two Gram positive bacterial strain (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*). The methanolic and chloroformic extracts showed a cytotoxicity against the larvae of artémia. These results are very interested for the use of this plant in modern medicine.

Keywords: Phytochemical screening, Fabaceae, *Genista*, screening, antioxydant activity, Cytotoxicity, antibacterial activity, NMR, HPLC, VLC.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Agrawal P.K, Markham K.R. (1989). Introduction in Carbon-13 NMR of flavonoids. Agrawal P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam. pp 1-31.

Akihisa T, Yasukawa K, Kimura Y, Yumiko T, Michio K, Wihelmus C.MC., Tamura, T. (1994). Five D.C-Friedo-oleanane triterpenes from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. And their anti-inflammatory effects, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42(5):1101-5.

Apak R, Güçlü K, Özurek M, Karademir S. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970-7981.

APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.*, 161(2):105–121.

ATI Samira. (2010). Cartographie de l'aire de répartition de l'espèce *Genista numidica ssp numidica* et sa valeur biologique dans l'Est algérien, Université - Badji Mokhtar – Annaba, Algérie 13-15.

Atiar Rahman Mohamed, Talha bin Imran, Shahidul Islam, (2013). Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 20, 213–225.

-B-

Boukaabache R, Boubekri N, Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Zama D, Benayache F, Benayache S. (2013). Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genistaquadriiflora* Munby (Fabaceae), *Der Pharmacia Lettre*, 5 (6):56-59.

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle, *Food and Agricultural Research council Mauritius*, 83-94.

Bilia A.R, Flammini F, Fammini G, Morelli I, Masili A. (1993). phytochemistry, vol. 34, N° 1, 847-852.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, 90(2-3):157-77.

Bohm B. A. (1999). Introduction to flavonoids. *CRC Press, England*.

Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.

Boutaghane Naima. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae), Faculté des sciences exactes, Université de Constantine. 20, 41.

Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30.

Bravo Laura. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, Lead Review Article, 317-333.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème édition, Lavoisier, Paris.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4^e édition.

-C-

Cavin, A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, 241 P.

Chase M. W, Soltis D. E, Ohnstead R. G, Morgan D, Les D. H, Mishler B. D, Duvall M. R, Price R, Hills H. G, Qui Y, Krron K. A, Rettig J. H, Conti E, Paliner J. D, Manhart J. R, Sytsma K. J, Michaels H. J, Kress W. J, Karol K. G, Clark W. D, Hedren M, Gaut B. S, Jansen R. K, Kim K, Wimpee C. F, Smith J. E, Furrder G. R, Strauss S. H, Xiang Q, Plunkett G. M, Soltis R. S, Swensen S. M, Williams S. E, Gadek P. A, Quinn C. J, Eguiarte L. E, Golenberg E, Leam G. H, jr S. G, Barrett S. C. H, Dayanandan S, Albert V. A. (1993). Phylogenetics of seed plants : An analysis of the nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 80:528–580.

Cheynier V, Fulcrand H, Sarni P, Moutounet M. (1997). Application des techniques analytiques a l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de leur vinification. *In vino Analytica Scientia. Analisis* 25: 14-44.

Chira.K, J.-H. Suh, C. Saucier, P.-L. Teissèdre. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6: 75–82.

- Choma I. M, Grzelak E. M. (2011).** Journal of Chromatography A, 1218, 2684-2691.
- Clark J. (1996).** Tocopherols and sterols from soybeans. Lipid Tech., 8: 111-114.
- Cristina Popovici, Ilonka Saykova, Bartek Tylkowski. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de génie industriel, 4, 25-39.
- Cronquist A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. 34, No. 2, 268-270.
- Crozier A. (2003).** Classification and biosynthesis of secondary plant products: An overview. In: Goldberg G (ed) Plants: Diet and Health. British Nutrition Foundation, Chapman Hall, Londres, pp. 27-48.

-D-

- Dapkevicius A, Van Beek TA, Linssen JPH, Venskutions R. (1998).** Rapid spectroscopic screening for antioxidant activity in sage, thyme and oregano isolates with the B-carotene-linoleic acid model system. In Natural Product Analysis, Schreier P, Herderich M, Humpf H-U, Schwab W (eds). Vieweg: Braunschweig; 235-237.
- D'abrosca D, Pacifico S, Cefarelli G, Mastellone C, Fiorentino A. (2007).** 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activit.104, 1333-1337.
- De Faria S, Lewis G, Sprent J, Sutherland J. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. New Phytologist 111 : 607-619.
- Dewick, P. M. (1993).** Isoflavonoïds. The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London pp.117-238.
- Dey P. M, Harborne J. B, (1991).** Methods in plant biochemistry. Volume 7. Terpenoids. Academic press.
- Di Carlo Giulia, Mascolo Nicola, Izzo Angelo A, Capasso Francesco. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sciences, 65(4): 337-353.
- Diallo Amadou. (2005).** Etude de la phytochimie et des activites biologiques de Syzygium guineense willd. (myrtaceae). Diplôme d'état pour le grade de docteur en pharmacie. P.16.
- Dieu Amandine. (2015).** Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs, pour obtenir le grade de docteur de l'université de LIMOGES.

Duran Ahmet, Uslu Nurhan, Doğan Bekir, Musa Özcan Mehmet, Çelik Mustafa. (2015). Antioxidant Activity and Phenolic Contents of 30 Selected Medicinal Plants, Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 21(2), 136-141.

Durieu de Maisonneuve, M.C, Bory de Saint-Vincent E. (1849). Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840-42, Botanique, Atlas [Atlas de la flore de l'Algérie], PL 84.

-E-

Estévez-Braun A, Gonnzalles A.G. (1997). Coumarine. Nat. Prod. Rep. 14, pp. 465-475.

-F-

Farag SF, Ahmed AS , Terashima K , Takaya Y, Niwa M. (2001). Isoflavonoids glucosides from *Dalbergia sissoo*. Phytochemistry 57, pp. 1263-1268.

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. p108-11.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr . Mémoire des Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p 64: 390-396.

Ferreria A, Proenca C, Serralheiro L.M.L, Aranjó M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. Journal of Ethnopharmacology, 108 : 31-37.

Finotti E, Majo DD. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. Nahrung/Food ; 47: 186-7.

Fouché J, Maquet A, Hambuchès K. (2000). Les plantes médicinales, de la plante au médicament ; Observation du Monde des plantes Sart-Tilman.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. Ann Rev Biochem 64: 97-112.

-G-

Gaidi G, Correira M, Chauffert B, Beltramo J-L, Wagner M, Lacaille-Dubois, M-A. (2002). Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. Planta Med., 68, 70-72.

Gaoussou Timité. (2012). Isolement et caractérisation des saponosides de plantes de la famille des Alliaceae, Caryophyllaceae et Polygalaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Université de Bourgogne. pp 13, 21.

Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12 : 15–24.

Giachi I, Manunta A, Morelli I, Pistelli L. (2002). Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 801–803.

Gođevac Dejan, Zdunić Gordana, Šavikin Katarina, Vajs Vlatka, Menković Nebojša. (2008). Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro *Fitoterapia* 79 185–187.

Gülçin I, Küfrevioğlu Ö. I, Oktay M, Büyükkuroğlu M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 205-215.

Gülçin İlhami. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86:345–391.

-H-

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

Harborne J. B. (1973). *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, Ltd., London, pp. 49-188.

Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol, Therapeutics*, 96, 67-202.

Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

Hayashi K, Huang H, Hiraoka N, Ikeshiro Y. (1997). Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. *Planta Med.* 63(2), 102-105.

Heywood V. H. (1996). *Les Plantes à Fleurs - 306 Familles de la Flore Mondiale*. Editions Nathan, Paris, pp. 149-152.

Hostettmann K, Marston A. (1995). *Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products)*. Cambridge : Cambridge University Press.

Huguet A.I, Del Carmen Recio M, Manez S, Giner R.M, Rios J.L. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur. J. Pharmacol.* 410, 1, pp 69-81.

Husain S. R, Cillard J, Cillard P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, 26, 2489-2492.

Huxtable R. J. (1990). Activation and pulmonary toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids, *Pharmac. Ther.*, 47, pp. 371-389.

-I-

Ibraheim Z. Z, Khalifa A. A. (2000). *Bull. Pharm. Sci.* 23 (2), pp. 177-186.

Ichai Carole, Quintard Hervé, Orban Jean-Christophe. (2011). Désordres métaboliques et reanimation. Springer pp. 427-439.

Igor Passi L B. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Thèse Pharmacie, Bamako; 133 P.

-J-

Jesus A.R, C.Dias, Matos A.M, Almeida R.F.M, Viana A.S, Marcelo F, Ribeiro R. T, Macedo M. P, Airoidi C, Nicotra F, Martins A, Cabrita E. J, JimenezBarbero J, P.Rauter A. (2014). Exploiting the Therapeutic Potential of 8-β-D-Glucopyranosylgenistein : Synthesis, Antidiabetic Activity and Molecular Interaction with IAPP and Amyloid peptide β(1-42), *J.Med.Chem.*,57.

-K-

Kadri Adel, Zarai Zied, Békir Ahmed, Gharsallah Néji, Damak Mohamed, Gdoura Radhouane. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10(19): 3908–14.

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550–557.

Keeler R F. (1989). Quinolizidine alkaloids in Range and Grain Lupins in « Toxicants of Plant Origin » (Cheeke P. R. éd.), vol.1 : Alkaloids, pp. 133-168, CRC Press, Boca Raton.

Kerwin, S. M. (2004), Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer agents*, 4, 263-272.

Kristina wählälä, Somdatta deb, Tapio hase. (2013). Isoflavones: chemistry, analysis, function and effects. The structure of isoflavones by 1D and 2D homonuclear and heteronuclear NMR Spectroscopy. *Food and nutritional components*, (5), 94-114.

Kubola J, Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110(4): 881-8.

Kuzuhara H, Nishiyama S, Minowa N, Sasaki K, Omoto S. (2000), Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Eur J Pharmacol*, 391(1- 2), 175-181.

-L-

Lacaille-Dubois M. A. (1999). Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner H, editor. Immunomodulatory agents from plants. Switzerland (Basel): Birkhäuser Verlag, 1 243-272.

Lacaille-Dubois M. A. (2000). Biologically and Pharmacologically active saponins from plants: recent advances in Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal plants. Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 205.

Lacaille-Dubois M.-A. (2005). Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-ur-Rahman (Ed.). *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32,209-246.

Lacaille-Dubois M.-A, Wagner H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 2, 363-386.

Lacaille-Dubois M.-A, Wagner H. (2000). In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry Vol. 21, Elsevier: Amsterdam, 633-687.

Lazurevskii, G.V, Terntieva I. V, Shamshurine A. A. (1966). *Prakticheskie raboty po khimii prirodnyx soedinenii*. Moscou, 335. (traduit du russe).

Levrant J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. (2003). Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 549-58.

L'herbier de Gérard de Belair. Famille des Leguminosae. Genre Genista. (2015) [Consulté le 05/03/2016]. Disponible à partir de : <http://gdebelair.com/tax/familegu.html#Genista>.

Li L.N, She H, Kamigoori K, Miyoshi T. (1997). Japanese Patent, Jp 01, pp 233, 296. *Chemical Abstracts* 112, 84162W; 1989 dans Mahato.

Li H-B, Wong C-C, Cheng K-W, Chen F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41: 385–390.

Lograda T, Chaker A.N, Chalard P, Ramdani M, Chalchat J.C, Silini H, Figueredo G. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil Of *Genista numidica* Spach. And *G.saharae* Coss et Dur. *Asian Journal of Plant Scientifices* 8 (7): 495-499.

Luthar. Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seed (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum*, 12: 36-42.

-M-

Maire R. (1987). La flore de l'Afrique du Nord. Les légumineuses, Le chevalier Ed. Paris XVI.

Manach Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, Liliana Jiménez. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability, *American journal for Clinical Nutrition*, 79:727– 747.

Manitto P, (1981). Biosynthesis of natural products. John Willey et sons. New York.

Mann J. (1987). Secondary metabolism, édition. 2, Clarendon press, Oxford.

Marston A. (2011). *Journal of Chromatography A*, 1218, 2676-2683.

Mekkiou R, Seghiri R, Boumaza O, Sarri D, Chebbah K, Benayache S, Benayache F, Bermejo J. (2012). secondary metabolites from *Genista ferox*, *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (4), 710-711.

Meyer B.N, Ferrigni N.R, Putnam J.E, Jacobsen L.B, Nichols D.E, McLaughlin J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31–34.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *pharmacological reviews*, 52:673–751.

Middleton JR. E, Chithan K. (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology : Implications for immunity, inflammation and cancer, *The flavonoids—Advances in research since 1986*, Chapter: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, Publisher: Chapman & Hall, London, U.K. 1994, 676 pp., Editors: J. B. HARBORNE, pp.619-652.

Moghadasian MH. (2000). Pharmacological properties of plant sterols. In vivo and in vitro observations. *Life Sciences.* 67, pp 605-615.

Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* 26 (2): 211-219.

Muhammad S. A, Faman A, Vqai U. A. (2001). Unusual chemical constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae), *Turk. J. Chem.* 25, pp. 107-112.

-N-

Narayane K. R, Reddy M. S, Chaluvadi M. R. (2001). Bioflavonoides classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology, 33 : pp. 2-16.

N'guessan K. (2008). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles chez les peuples Abbe et Krobou du Département d'Agboville (Côte-d'Ivoire). Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles. Université de Cocody-Abidjan, 235.

-O-

Osborn A.E, Haralampidis K. (2002). Triterpenoid Saponin Biosynthesis In Plants. Recent Advances in Phytochemistry. 36 : 81–93.

Ozçelik B, Kartal M, Orhan I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. Pharm. Biol. 49, 396–402.

Özyürek Mustafa, Kubilay Güçlü, Tütem Esmâ, Kevser Sözgen Başkan, Erol Erçag, S.Esin çelik, Baki Safa, Yildiz Leyla, Karaman Seyda, Apak Resat. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology, CRITICAL REVIEW, 3, 2439.

-P-

Peirs Céline. (2005). contribution à l'étude phytochimique de *Galega officinalis* L. (Fabaceae), Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Spécialité : Sciences des Agroressources; pp 75.

Perez Gutierrez R.M. et Vargas S. R. (2002). Triterpenes from *Agarista mexicana* as Potential Antidiabetic Agents. Phytother. Res. 16, pp 55-58.

Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Res Int; 39: 791-800.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Cœur, Poumons, 4, (5).

Pistelli L, Giachi I, Potenz D, Morselli I. (2000). A New Isoflavone from *Genista corcica*. Journal of Natural Products, 63, pp. 504-506.

Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Manumata A. (1998). Flavonoids from *Genista ephedroides*. Journal of Nat. Prod/, 61 (11), 1404-1406.

Pistelli L, Bertoli A, Giachi I, Morelli I, Rubiolo P, Bicchi C. (2001). Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. Biochemical Systematics and Ecology, 29. 137-141.

Plantes botanique. Les fabaceae. (2012) [Consulté le 19/02/2016]. Disponible à partir de : http://www.plantes-botanique.org/famille_fabaceae

-Q-

Quezel P, Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I .C.N.P.S. Paris.

Quezel P, Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II .C.N.P.S. Paris.

Quignard ELJ, Pohlit AM, Nunomura SM, Pinto ACS, dos Santos EVM, de Morais SKR, Alecrim AM, Pedrosa ACS, Cyrino BRB, de Melo CS, Finney EK, Gomez EO, Souza KS, de Oliveira LCP, Don LC, e Silva LFR, Queiroz MMA, Henrique MC, dos Santos M, Pinto PS and Silva SG. (2003). Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazon.* 33: 93-104.

-R-

Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants, *Phytochemical Analysis* 2: 199-203.

Rahman A. U. (2005). Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products. Part K, Elsevier, USA.

Rainova L, Nakov N, Bogdanova S, Minkov E, Staneva- Stoytcheva D. (1988). Ulceroprotective Activity of the Flavonoids of *Genista rumelica* Vel, *Phytotherapy Research*, 2, (3).

Ramos Sonia. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, nutritional biochemistry. 18: 427–442.

Rauter AP, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro LM, Araújo ME, Borges C, Justino J, Silva FV, Goulart M, Thomas-Oates J, Rodrigues JA, Edwards E, Noronha JP, Pinto R, Mota-Filipe H. (2009). Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 384–393.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9/10): 1231-1237.

Recio M.C, Giner R.M, Manez S, Rios J.L. (1995). Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 61, 2, pp 182-185.

Rensen I. V, Wray V, Witte L, Canto P, Greinwald R, Veen G, Veit M, Czygan F.C. (1994). Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. *Phytochemistry*, 35, 421-424.

Rice-Evans C, Miller N.J. (1994). Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods in Enzymology*. 234: 279-293.

Rice-Evans C, Miller N.J, Bowell P.G, Bramley P.M, Pridham J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22: 375-383.

Richier S, Merle PL, Furla P, Pigozzi D, Sola F, Allemand. D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochim Biophys Acta* 1621: 84-91.

Roginsky V, Lissi EA. (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 92:235–254.

-S-

Sanchez-Moreno C, Larrauri Jose A, Saura-Calixto F, (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76(2): 270-276.

Shaiq ALI M, Farman A, Viqar Uddin A, (2001). Unusual Chemical Constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turk J Chem*. 25. 107-112.

Sparg S. G, Light M. E, Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94:219-243.

Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmoned D. (2002). *Botanique systématique des plantes à fleur*. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH Lausanne.

-T-

Terpinc P, Bezjak M, Abramovic H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115 : 740-744.

Tosun F, Akyuz Kizilay C, Tosun A.U, (2009). Flavonoids and isoflavonoids from *Genista sessilifolia* growing in Turkey. *Chem. Nat. Compd.* 45, 83–84.

Tosun F, Tanker M, Ozden T, Tosun A. (1987). Alkaloids of *Genista involucre* and *Genista albida*. *Planta Medica*, 58, 499-505.

Toubal Oumessaad., Abdelghani Djahoudi and Amel Bouzabata. (2011). Preliminary Studies and Antimicrobial Evaluation of the Aerial Parts of *Genista numidica ssp. Numidica*. Journal of Life Sciences 5, 954-959.

Toubal. O. (1998). Prunetum aviae, Genistetum numidica, Chamaeoropetum humili, 03 associations qui caractérisent la végétation numidienne (Edough N-E Algérie. Itinera Geobotanica 10 : 213-226.

Tu Y.C, Lian T.W, Yen J.H, Chen Z.T, Wu M.J. (2007). Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. J. Agric. Food Chem., 55(24), 9969-9976.

-U-

US FDA (2000). 21 CFR Pt 101 Food labelling: Health Claims, plant sterol/stanol esters and coronary heart disease. *Food Reg*, 65, 54685-54731.

-V-

Verdrengh M, Collins LV, Bergin P, Tarkowski A. (2004). Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. *Microbes Infect.* 6 (1): 86-92.

Vigor C, Vercauteren J, Montels J. (2011). les substances naturels dans la chaîne du médicament, 48, 29-30.

Vincken J.-P, Heng L, De Groot A, Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry*, 68:275–297.

-W-

Wachter G. A, Valcic S, Franzblau S. G, Suarez E, Timmermann B. N. (2001). Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *Journal of Natural Products*, 64, 37.

Wojciechowski M.F, Lavin M, Sanderson M.J. (2004). A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 11, 1846-2004.

Woodman Owen L, Chan Elsa CH. (2004). Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 786-790.

-Y-

Yaacoub R. (2009). Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).

Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal Sci.* 17(5):599-604.

Etude phytochimique et biologique de plante médicinale Algériennes du Genre *Genista* (Fabaceae)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une espèce du Genre *Genista* de la famille Fabaceae ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, antibactérienne et cytotoxique des extraits végétaux et des produits isolés. Cette plante endémique de l'Algérie n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique.

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et CC) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) de 2 métabolites secondaires de nature flavonoïdique (GN1), et stéroïdique (GN2).

Les extraits de la plante ainsi que le produit isolé GN1 ont manifesté un grand pouvoir antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS, CUPRAC et le test de Blanchiment de Béta carotène. L'extrait chloroformique a montré également une activité antibactérienne contre deux souches bactérienne de Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*).

Les deux extraits méthanolique et chloroformique ont montré une cytotoxicité contre les larves de l'artémia. Les résultats obtenus sont très promotrices pour l'utilisation de cette plante dans la médecine moderne.

Mots clés : Fabaceae, *Genista*, screening phytochimique, activité antioxydante, cytotoxicité, activité antibactérienne, RMN, HPLC, VLC.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques.

Jury d'évaluation :

Président du jury : GHERBOUDJ Ouissem MCB. UFM Constantine,

Rapporteur : BOUTAGHANE Naima MCB. UFM Constantine,

Examineur : SEMRA Ilhem MAA. UFM Constantine.

Date de soutenance : 09/06/2016