



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



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département : Biochimie et Biologie  
Cellulaire Et Moléculaire

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم: الكيمياء الحيوية و علم الخلوي والجزيئي

## Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** *Biochimie appliqué*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

# Valorisation d'une espèce de la famille des Rosaceae

---

Présenté par : *DIFALLAH nouha*

Le : 10/06/2024

*BENRABEH soundous*

**Jury d'évaluation:**

|                |   |                         |
|----------------|---|-------------------------|
| Présidente :   | M <sup>me</sup> . <i>BENSARI Souheir</i>  | MCB. UFM Constantine 1. |
| Encadrante :   | M <sup>me</sup> . <i>KHALFALLAH Assia</i> | MCA. CUM-Mila.          |
| Examinatrice : | M <sup>me</sup> . <i>BOUSETLA Ahlem</i>   | MCA. UFM Constantine 1. |

Année universitaire  
2023/2024

# *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier **Allah** le Tout-Puissant de nous avoir donné la santé et la volonté pour bien accomplir ce labeur.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme le Professeur KAABOUCHE Zahia**, Directrice du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire et nous avoir permis de réaliser ce mémoire dans un cadre de recherche stimulant et enrichissant.*

*Nous tenons également à remercier **Dr. KHALFALAH Assia**, notre encadrante, pour sa guidance précieuse, ses conseils avisés, sa disponibilité constante et ses encouragements qui ont contribué à notre progression au long de ces mois.*

*Nous tenons à remercier également **Pr. BOUTEGHANE Naima**, pour sa gentillesse, sa bienveillance et sa confiance en nous, nous vous souhaitons une bonne santé et plus de réussites.*

*Nous sommes reconnaissantes envers **Dr. BENSOUICI Chawki**, chef du laboratoire de biochimie au (CRBT), pour son aide inestimable, ses efforts et sa disponibilité.*

*Nous souhaitons également remercier les membres du jury **Dr. BENSARI Souheir** et **Dr. BOUSETLA Ahlem** pour l'intérêt qu'elles ont porté à nos travaux en acceptant d'examiner notre mémoire et de l'enrichir par leurs propositions*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire (CRBT) et (LOST), en particulier à **M<sup>elle</sup> Hadjer**, pour sa grande patience, sa disponibilité et ses conseils précieux au long de nos travaux pratiques.*

*A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, nous exprimons notre profonde gratitude.*

# **Dédicace**

*Je dédie ce travail ...*

*À mes chers parents, Djamel et Hakima, qui ont toujours été là pour moi, pour leurs encouragements, leur tendresse, leur disponibilité et leurs sacrifices durant toutes mes années d'études. C'est grâce à eux que je suis arrivée à cette étape de ma vie. Je prie Dieu de vous accorder santé, succès et bonheur*

*À mes très chers frères, Kouteiba et Abdelmouiz,*

*A mes sœurs, Nada et Israa,*

*À mon seul oncle Mohamed, sa femme et ses enfants,*

*Je vous remercie pour tout l'encouragement, le respect et le soutien moral, la tendresse et la gentillesse dont vous m'avez toujours entouré.*

*Que Dieu vous accorde santé, succès et bonheur.*

*À mes belles amies Amina, Maya, Yasmine, Isra, Nourhane, Anfel et Darine, Merci d'avoir été à mes côtés dans les moments difficiles. Merci pour l'ambiance que nous avons vécue ensemble dans les moments de bonheur, de tristesse et de stress. Je suis incroyablement chanceuse de vous avoir à mes côtés.*

*Votre présence a rendu les succès encore plus savoureux.*

*Je tiens également à remercier mon amie Roumaïssa pour sa gentillesse, ses conseils, sa patience, sa disponibilité et ses encouragements.*

*À mon binôme maya, dès le premier jour, j'ai su que notre binôme était quelque chose de spécial. Je vous remercie sincèrement pour votre contribution précieuse à la réussite de ce travail. Je suis incroyablement chanceuse d'avoir partagé ce parcours avec toi. Je chéris notre amitié plus que les mots ne peuvent le dire, et je sais que nous resterons amies pour toujours.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toute personne, qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**nouha**

# *Dédicace*

*C'est avec une profonde gratitude et de sincères mots, que je dédie ce modeste travail :*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas, ma mère **Samia** qui m'apporte son appui durant toutes mes années d'études, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. Le bonheur de ma vie mon cher père **Mahmoud** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études pour son sacrifice ses conseils de ses encouragements.*

*À mon frère **Aymen** pour tout le soutien, l'amour, leur présence dans ma vie.*

*À mon cher binôme, Ma douce amie **Nouha**, merci pour ta gentillesse et ta générosité sans faille, merci pour ton soutien indéfectible et pour tout ce que tu as fait pour contribuer à la réussite de ce travail. Ton aide précieuse et ton amitié sincère ont été des moteurs essentiels tout au long de cette aventure. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés.*

*À ma meilleure amie, ma copine de cœur, qui était toujours disponible à l'écoute, qui a partagé avec moi les peines et les regrets, de très précieux d'avoir quelqu'un de si attentif et compréhensif. Merci de me prêter ton épaule : ma copine **Ikram**.*

*À mes chères amies **Amina, Isra, Yasmine, Nounou, Darine**, pour l'amitié qui nous a unies et les souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaité une vie pleine de santé et de bonheur.*

*À mes cousines **Meriem, Sara, Bessema, Rania, Chaima, Kenza, Malak, Fatima, Ranime, Tasnime, Ghada** Vous êtes plus que des cousines pour moi, vous êtes mes meilleures amies, mes confidentes et les personnes sur lesquelles je peux toujours compter.*

*Je remercie toute les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

**Soundous**

## *Liste des abréviations*

**A** : Absorbance  
**A<sub>0,5</sub>** : Concentration à A=0,5  
**ABTS** : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)  
**AcOEt** : Acétate d'éthyle  
**AH** : Antioxydant donneur d'hydrogène  
**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium  
**CC** : Chromatographie sur colonne ouverte  
**CCM** : Chromatographie sur couche mince  
**CD<sub>3</sub>OD** : Méthanol deutéré  
**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme  
**CI<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition à 50%  
**d** : Doublet  
**dd** : Doublet de doublets  
**DPPH** : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl  
**EAG** : Equivalent d'acide Gallique  
**EQ** : Equivalent de Quercétine  
**EOR** : Espèces oxygénées réactives  
**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Acide borique  
**HCl** : Acide chlorhydrique  
**Hz** : Hertz  
**J=Hz** : Constante de couplage exprimée en Hertz  
**LOST** : Laboratoire d'Obtention de Substances  
**m** : Multiplet  
**MeOH** : Méthanol  
**ml** : Millilitre  
**NaOAc** : Acétate de sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de sodium  
**nm** : Nanomètre  
**ppm** : parties par million  
**PR** : Pouvoir réducteur  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**RMN <sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone  
**RMN <sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton  
**RO•** : Radical alkoxy  
**ROO•** : Radical peroxy  
**ROOH** : Hydroperoxyde  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**UV** : Ultra-violet  
**v/v** : Volume par Volume  
**δ** : Déplacement chimique

**$\delta\text{c}$**  : Déplacement chimique du carbone en ppm

**$\delta\text{H}$**  : Déplacement chimique du proton en ppm

**$\mu\text{l}$**  : Microlitre

## *Liste des tableaux*

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1:</b> Les différentes familles des plantes médicinales .....  | 3  |
| <b>Tableau 2 :</b> Position systématique des Rosaceae .....   | 5  |
| <b>Tableau 3:</b> Description botanique des différentes parties des Rosaceae .....  | 6  |
| <b>Tableau 4 :</b> L'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du $R_f$ . .....                          | 14 |
| <b>Tableau 5 :</b> Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques. ....                        | 15 |
| <b>Tableau 6:</b> Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes. ....                                    | 16 |
| <b>Tableau 7 :</b> Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des différents réactifs. .... | 17 |
| <b>Tableau 8 :</b> Déplacements chimiques des protons du noyau A .....  | 18 |
| <b>Tableau 9 :</b> Déplacements chimiques des protons du noyau B .....  | 19 |
| <b>Tableau 10 :</b> Résultats de séparation par CC de l'extrait acétate d'éthyle. ....  | 27 |
| <b>Tableau 11 :</b> Résultats du regroupement final des fractions. ....   | 28 |
| <b>Tableau 12 :</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction $f_2$ . ...                         | 29 |
| <b>Tableau 13 :</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction $f_4$ . ...                         | 29 |
| <b>Tableau 14 :</b> Comportement chromatographique du produit $P_1$ . ....  | 37 |
| <b>Tableau 15 :</b> Données de la série spectrale UV-visible du produit $P_1$ . ....  | 37 |
| <b>Tableau 16 :</b> Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H (250MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit $P_1$ . ....              | 40 |
| <b>Tableau 17 :</b> La teneur en composés phénoliques. ....   | 43 |
| <b>Tableau 18 :</b> La teneur en flavonoïdes. ....  | 45 |
| <b>Tableau 19 :</b> Pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents extraits. ....  | 47 |
| <b>Tableau 20 :</b> Pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents extraits. ....  | 48 |
| <b>Tableau 21 :</b> Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits étudiés. ....  | 50 |
| <b>Tableau 22:</b> Absorbance du complexe Fe <sup>+2</sup> – phenanthroline. ....   | 51 |

## *Liste des figures*

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1:</b> Carte de répartition géographique de la famille des Rosaceae.....                                 | 5  |
| <b>Figure 2:</b> Une coupe transversale d'une fleur de Rosaceae.....   | 7  |
| <b>Figure 3 :</b> Quelques espèces de la famille des Rosaceae .....  | 8  |
| <b>Figure 4 :</b> La structure chimique de quelques composés de type alcaloïdes.....                               | 9  |
| <b>Figure 5 :</b> La structure chimique de quelques composés de type terpénoïdes. ....                             | 10 |
| <b>Figure 6 :</b> La structure chimique de quelques composés phénoliques.....                                      | 10 |
| <b>Figure 7:</b> Structure de base des flavonoïdes.....  | 11 |
| <b>Figure 8:</b> Classes et sous-classes de flavonoïdes.....   | 12 |
| <b>Figure 9 :</b> Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes. ....   | 16 |
| <b>Figure 10:</b> Mécanismes d'action des antioxydants.....  | 20 |
| <b>Figure 11:</b> Classification des antioxydants.....   | 21 |
| <b>Figure 12:</b> Mécanisme de réaction du (DPPH) avec l'antioxydant.....  | 22 |
| <b>Figure 13:</b> Formation du radical ABTS <sup>•+</sup> .....  | 23 |
| <b>Figure 14:</b> Schéma sur la réaction de test FRAP .....  | 23 |
| <b>Figure 15:</b> Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> . ....  | 24 |
| <b>Figure 16 :</b> Différentes étapes de l'extraction de la plante étudiée.....                                    | 26 |
| <b>Figure 17 :</b> Schéma résumant les étapes de séparation de l'extrait acétate d'éthyle. ....                    | 30 |
| <b>Figure 18 :</b> Série spectrale UV- Visible du produit <b>P<sub>1</sub></b> .....                               | 39 |
| <b>Figure 19 :</b> spectre RMN <sup>1</sup> H (250 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du produit <b>P<sub>1</sub></b> . .... | 41 |
| <b>Figure 20 :</b> Photos prises lors du dosage de polyphénols totaux. ....  | 42 |
| <b>Figure 21 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. ....   | 42 |
| <b>Figure 22 :</b> Histogramme présente les teneurs en polyphénol.....   | 43 |
| <b>Figure 23 :</b> Photo prise lors du dosage de flavonoïdes. ....   | 44 |
| <b>Figure 24:</b> Courbe d'étalonnage de la Quercétine. ....   | 44 |
| <b>Figure 25 :</b> Histogramme présente les teneurs en flavonoïde. ....  | 45 |
| <b>Figure 26 :</b> Photo prise lors du dosage de l'activité anti radicalaire DPPH. ....                            | 46 |
| <b>Figure 27 :</b> Les valeurs des CI <sub>50</sub> du test DPPH. ....   | 47 |
| <b>Figure 28 :</b> Photos prise lors de dosage de l'activité ABTS <sup>•+</sup> .....                              | 48 |
| <b>Figure 29 :</b> Les valeurs des CI <sub>50</sub> du test ABTS.....  | 49 |
| <b>Figure 30:</b> Photos prise lors de dosage de l'activité FRAP.....  | 49 |
| <b>Figure 31 :</b> Les valeurs des A <sub>0,5</sub> du test FRAP. ....   | 50 |



**Figure 32:** Photos prise lors de dosage de l'activité  $\text{Fe}^{2+}$  -phénanthroline. ....51

**Figure 33 :** Les valeurs des  $A_{0,5}$  du test  $\text{Fe}^{2+}$  -phénanthroline.....52

## ***Table des matières***

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations, des tableaux et des figures.

Introduction générale .....1

### **Chapitre I : Aperçu bibliographique**

I. Les plantes médicinales : .....3

I.1. Introduction : .....3

I.2. Domaine d'utilisation : .....3

I.3. Les différentes familles des plantes médicinales : .....3

II. Présentation de la famille des Rosaceae : .....4

II.1. Généralité : .....4

II.2. Répartition géographique : .....4

II.3. Classification : .....5

II.4. Les caractéristiques des Rosaceae : .....6

II.5. L'exploitation des Rosaceae : .....7

II.6. Les métabolites des Rosaceae : .....9

III. Les flavonoïdes : .....11

III.1. Généralités sur les flavonoïdes : .....11

III.2. Structure des flavonoïdes : .....11

III.3. Classification des flavonoïdes : .....11

III.4. Fonctions des flavonoïdes : .....12

III.5. Séparation et purification des flavonoïdes : .....13

III.5.1. La chromatographie sur colonne (CC) : .....13

III.5.2. La chromatographie sur couche mince : .....13

III.6. Analyse structurale des flavonoïdes : .....14

III.6.1. Techniques d'identification de structure : .....14

|  |    |
|--|----|
| III.6.2. Facteur de retardement ( $R_f$ ) : .....                                      | 14 |
| III.6.3. La fluorescence sous lumière de Wood : .....                                  | 15 |
| III.7. Identification spectrale : .....  | 15 |
| III.7.1. Spectrophotométrie UV- Visible : .....  | 15 |
| III.7.2. Spectrométrie La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : .....                 | 18 |
| III.7.2.1. RMN proton (RMN $^1H$ ) : .....   | 19 |
| III.7.2.2. RMN carbone (RMN $^{13}C$ ): .....  | 19 |
| III.8. Analyse quantitative des composés phénoliques : .....                           | 19 |
| III.8.1. Dosage des polyphénols totaux : .....   | 19 |
| III.8.2. Dosage des Flavonoïdes : .....  | 19 |
| IV. L'activité antioxydante: .....   | 19 |
| IV.1. Introduction : .....   | 19 |
| IV.2. Mécanisme d'action : .....   | 20 |
| IV.3. Classification des antioxydants : .....  | 20 |
| IV.4. Principaux tests de l'activité antioxydante : .....                              | 21 |
| IV.4.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH): .....                          | 22 |
| IV.4.2. Le test ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) : .....      | 22 |
| IV.4.3. Le test FRAP (pouvoir antioxydant réducteur ferrique) .....                    | 23 |
| IV.4.4. Le test d'activité réductrice par formation de $Fe^{2+}$ -phénanthroline ..... | 24 |

## **Chapitre II: Matériels et méthodes**

|  |    |
|--|----|
| I. Etude phytochimique de la plante : .....                            | 25 |
| I.1. Matériel végétale.....  | 25 |
| I.2. Séparation chromatographique : .....                              | 27 |
| I.2.1. Séparation et purification de l'extrait acétal d'éthyle : ..... | 27 |
| I.2.1.1. Etude de la fraction $f_2$ : .....                            | 28 |
| I.2.1.2. Etude de la fraction $f_4$ : .....                            | 29 |
| II. Détermination du total polyphénols et flavonoïdes .....            | 31 |

|   |    |
|---|----|
| II.1. Dosage des polyphénols totaux .....   | 31 |
| II.1.1. Principe :.....   | 31 |
| II.1.2. Protocole :.....  | 31 |
| II.2. Dosage des flavonoïdes :.....   | 32 |
| II.2.1. Principe :.....   | 32 |
| II.2.1. Protocole : .....   | 32 |
| IV. Evaluation de l'activité antioxydante :.....  | 33 |
| IV.2. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH):.....  | 34 |
| IV.3. Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>+</sup> :.....                               | 35 |
| IV.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) : .....  | 35 |
| IV.5. L'activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline : ..... | 36 |

### **Chapitre III: Résultats et discussion**

|   |    |
|---|----|
| I. Elucidation structurale du produit <b>P<sub>1</sub></b> :..... | 37 |
| I.1. Comportement chromatographique :.....                        | 37 |
| I.2. Données spectroscopiques UV-Visible : .....                  | 37 |
| I.3. Données spectroscopiques RMN <sup>1</sup> H: .....           | 40 |
| II. Analyse quantitative des composés phénoliques :.....          | 42 |
| II.1. Dosage des polyphénols totaux : .....                       | 42 |
| II.2. Dosage des flavonoïdes :.....                               | 43 |
| III. Evaluation de l'activité antioxydante :.....                 | 45 |
| III.1. Test du DPPH:.....   | 46 |
| III.2. Test de l'ABTS :.....                                      | 48 |
| III.3. Test du FRAP :.....  | 49 |
| III.4. Test de phénantroline :.....                               | 51 |
| Références bibliographiques :.....                                | 54 |
| Conclusion générale .....   | 59 |



---

# *Introduction*

---



## Introduction générale

Depuis la nuit des temps, l'homme a consommé et utilisé les végétaux pour se nourrir, se soigner et construire des habitations, voire même s'habiller. Après des siècles d'observation et d'accumulation de connaissances, l'être humain a réussi à comprendre et à tirer profit des bienfaits des plantes pour sa santé. Cette science ancestrale, véritable médecine alternative, est connue sous le nom de phytothérapie ou médecine par les plantes. Elle est d'ailleurs la plus ancienne des médecines du monde.

Tout comme les médicaments chimiques, une plante médicinale possède des principes actifs responsables d'une action thérapeutique, mais également d'effets indésirables appelés toxicité.

Ces principes actifs, produits en grand nombre par les plantes, incluent notamment les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes [1].

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques extraits d'une variété de plantes vasculaires, comprenant plus de 8 000 composés distincts identifiés. De nombreuses études ont suggéré que les flavonoïdes présentent des activités biologiques, notamment des actions anti-allergéniques, antivirales, anti-inflammatoires et vasodilatatrices. Leur rôle dans les plantes inclut des fonctions telles que des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, photoréceptrices, attractives visuellement, répulsives pour les prédateurs et protectrices contre la lumière. Cependant, l'accent principal a été mis sur leur capacité antioxydante, qui provient de leur aptitude à réduire la formation des radicaux libres et à les neutraliser. [2]

L'objectif de cette étude était l'isolement et l'identification des métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes, d'une espèce de la famille des Rosaceae, ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante.

Ces travaux sont présentés dans ce mémoire qui est réparti en trois chapitres comme suit :

Le premier chapitre est consacré à un aperçu bibliographique qui comprend des informations générales sur les plantes médicinales, la famille des Rosaceae, les flavonoïdes, ainsi que l'activité antioxydante.

Le deuxième chapitre comprend le matériel et les méthodes décrivant l'extraction, la séparation et la purification des flavonoïdes, ainsi que les tests d'activité antioxydante que nous avons réalisés.

Le troisième chapitre comporte la discussion des résultats de l'étude phytochimique de l'espèce de la famille des Rosaceae, ainsi que des tests d'activité antioxydante. Ce manuscrit se termine par une conclusion générale.



---

# **Chapitre I**

## **Aperçu bibliographique**

---





## I. Les plantes médicinales :

### I.1. Introduction :

Le monde compte actuellement plus de 10000 espèces de plantes médicinales répertoriées. Elles se composent de tiges, de feuilles et de fleurs, et peuvent être cultivées ou se développer à l'état sauvage [3].

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques leur efficacité dépend de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces [4], ces composés, dont les métabolites secondaires, présentent des effets thérapeutiques distincts [5].

### I.2. Domaine d'utilisation :

Les plantes médicinales peuvent être utilisées de différentes manières, notamment en infusion, en décoction (après ébullition) ou par macération (trempage prolongé).

Ces plantes présentent de nombreux avantages dans divers domaines : alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Les pharmacies utilisent encore une forte proportion de plantes médicinales, La recherche a permis de découvrir de nouvelles molécules actives et matières premières dans les plantes pour la synthèse de médicaments. Ces produits sont utilisés en médecine conventionnelle pour diverses affections : en urologie, dermatologie, toux, ulcères d'estomac, désordres nerveux et pour les systèmes cardiovasculaires. Quant aux maladies du stress, des activités antioxydantes ont été prouvées avec le thé noir, le thé vert le cacao qui sont riches en composés phénolique [6].

### I.3. Les différentes familles des plantes médicinales :

Le tableau suivant présente le classement des plantes médicinales publiées sur Creapharma.ch par famille :

**Tableau 1:** Quelques familles des plantes médicinales [7].

| La famille   | Exemple de l'espèce   |
|--------------|---|
| Astéraceae   | <i>Achillea millefolii</i> , <i>Antemis nobilis</i> ...     |
| Rosaceae     | <i>Alchemilla vulgaris</i> , <i>Crataegus laevigata</i> ... |
| Gentianaceae | <i>Centaurium erythrea</i> , <i>Gentiana lutea</i> ...      |
| Malvaceae    | <i>Althae officinalis</i> , <i>Malva silvestris</i> ...     |

|                  |  |
|------------------|--|
| Solanaceae       | <i>Atropa beladonna (belladone), Datura stramonium ...</i> |
| Apiaceae         | <i>Apium graveolens, Carum carvi ...</i>                   |
| Lamiaceae        | <i>Mellissa officinalis , Mentha piperita ...</i>          |
| Liliaceae        | <i>Allium sativum, Allium ursinum ...</i>                  |
| Scrophulariaceae | <i>Verbasci phlomoides, Digitalis purpurea ...</i>         |
| Cupresaceae      | <i>Juniperus communis ...</i>                              |

## II. Présentation de la famille des Rosaceae :

### II.1. Généralité :

Les Rosaceae sont une famille de plantes à fleurs qui fait partie de l'ordre des Rosales. Elles comprennent environ 90 genres et plus de 3000 espèces [8] . Dans le sens étymologique, Rosaceae provient du mot latin rōsa, qui fait référence à la rose (fleur) et à l'huile rosat. En botanique, le suffixe "-aceae" est utilisé pour désigner les familles de plantes [9].

La famille des Rosaceae regroupe de nombreuses plantes vivaces, herbacées, arbustives, et arborées. Elle comprend de nombreuses espèces de cultures fruitières et de baies, telles que la pomme, la fraise, la poire, la pêche et la framboise. Les Rosaceae englobent aussi des plantes à huile essentielle comme la rose et l'amande [10].

### II.2. Répartition géographique :

Les Rosaceae sont une famille des plantes cosmopolite, présentes presque partout dans le monde, elles sont mieux représentées dans l'hémisphère Nord, plus précisément en Eurasie, en Amérique du Nord et en Asie. Quelques-unes sont issues de l'Afrique, de L'Angleterre ainsi que de l'Europe [11] .

Les Rosaceae ont réussi à s'ajuster à divers environnements de vie, ce qui explique la présence de petites plantes herbacées arctiques ou semi-désertiques telles que des buissons ou des arbres, tant en plaine qu'en montagne, et même dans les régions tropiques [12].



**Figure 1:** Carte de répartition géographique de la famille des Rosaceae [13].

### II.3. Classification :

Dans la classification actuelle, les Rosaceae forment une famille de l'ordre des Rosales. Cette famille est divisée en quatre sous-familles homogènes: Amygdales (famille du pêcher), Maloideae (famille du pommier), Rosoideae (famille du rosier) et Spiraeoideae (famille de la spirée) [14].

La position systématique des Rosaceae est représentée dans le tableau 02 :

**Tableau 2 :** Position systématique des Rosaceae [15].

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| Règne              | <b>Plantae</b>         |
| Embranchement      | <b>Spermatophyta</b>   |
| Sous Embranchement | <b>Angiospermae</b>    |
| Classe             | <b>Eudicotyledonae</b> |
| Sous Classe        | <b>Rosidae</b>         |
| Ordre              | <b>Rosales</b>         |
| Famille            | <b>Rosaceae</b>        |

#### II.4. Les caractéristiques des Rosaceae :

Les Rosaceae, famille de plantes dicotylédones, peuvent avoir un feuillage persistant ou caduc et par la présence d'épines chez de nombreuses espèces ligneuses. Ces épines peuvent être de deux types :

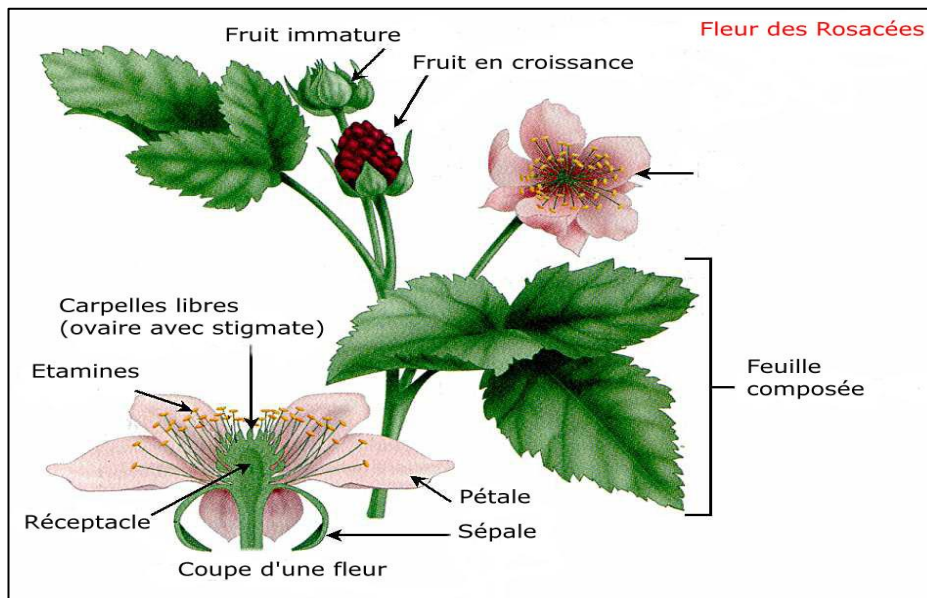
- Des épines épidermiques, comme chez le rosier ou la ronce.
- Des rameaux latéraux courts qui se dessèchent et deviennent rigides et piquants, comme chez le prunier.

Les espèces du genre Rosaceae se distinguent par plusieurs caractéristiques communes :

**Tableau 3:** Description botanique des différentes parties des Rosaceae [11] [12].

| Les parties de la plantes   | Description  |
|-----------------------------|--|
| <b>Feuilles</b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples, souvent munies des stipules et porter des glandes à nectar.</li> <li>• La composition des feuilles peut varier en nombre de folioles, allant de plusieurs folioles à une seule foliole. Certaines plantes ont évolué pour avoir une seule foliole fusionnée.</li> </ul>  |
| <b>Organisation florale</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les fleurs sont généralement de forme régulières et actinomorphes, solitaires ou regroupées en diverses dispositions.</li> <li>• Ils ont un calice de 5 sépales, parfois avec une épicalice, et 5 pétales libres ou plus.</li> <li>• La structure florale comprend un hypandium, qui est une structure en forme de plateau ou disque, typique des Rosaceae, porte plusieurs cercles de 5 étamines et un ou plusieurs carpelles libres.</li> </ul>                                 |
| <b>Fruits</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Le type de fruit dépend de la structure du réceptacle floral. Il peut s'agir d'un akène sec ou d'une drupe charnue.</li> <li>• les graines sans albumen et parfois ailées</li> </ul>  |
| <b>Reproduction</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La plupart des fleurs sont hermaphrodites (L'autofécondation est rare).</li> <li>• Les espèces de Rosaceae dépendent des insectes pollinisateurs pour la fertilisation croisée, tandis que certaines peuvent se reproduire de manière végétative, par stolons (fraisiers), rejets (framboisier) ou marcottage naturel (ronce).</li> <li>• Les graines sont dispersées par zoochorie : des animaux qui mangent ou déplacent les fruits et dispersent ainsi les graines.</li> </ul> |

La figure suivante montre une coupe transversale d'une fleur de Rosaceae :



**Figure 2:** Une coupe transversale d'une fleur de Rosaceae [16].

### II.5. L'exploitation des Rosaceae :

Les Rosaceae sont en effet essentielles pour notre alimentation, générant plus de 180 milliards de dollars par an en tant que plantes fruitières. Elles constituent un pilier de notre alimentation en offrant une variété de fruits riches en vitamines. La plupart des fruits consommés en climat tempéré appartiennent à la famille des Rosaceae. Par exemple, le genre *Prunus* produit des fruits tels que les abricots, les pêches, les cerises, les pruneaux et les amandes. Le genre *Fragaria* est responsable de la production des fraises. *Rubus* nous offre les framboises et les mûres. *Malus domestica* est à l'origine de la pomme, qui est le 3ème fruit le plus consommé au monde [12].

De nombreuses espèces de Rosaceae sont cultivées pour leurs belles fleurs, notamment les roses, Ils sont également utilisés en horticulture industrielle. D'autres Rosaceae comme la *Spiraea*, la *Potentille* et l'*Astible* sont également cultivées pour leur beauté. *Cotoneaster*, *Pyracantha* et *Prunus laurocerasus* sont utilisés pour la constitution de haies. Divers "arbres fruitiers", ainsi que les Fraises (*Fragaria*) sont cultivés sur de grandes surfaces : *Cerisiers*, *Pommiers*, *Poiriers*, *Cognassier*, *Pêchers*, *Pruniers* et *Amandier*, sont tous des Prunoïdées. Tandis que de nombreuses Rosaceae sont utilisées pour fabriquer des confitures (fraises, framboises, mûres des buissons), et des huiles [17].

Les Rosaceae ont également des usages médicaux, comme l'aubépine pour l'insomnie. La reine des prés (*Filipendula ulmaria*) est une plante aux propriétés anti-inflammatoires,

antiseptiques, aromatiques, astringentes, sudorifiques, diurétiques, stomachiques et antispasmodiques. Le capitule contient de l'acide salicylique, à partir duquel l'aspirine peut être synthétisée. Les parties souterraines des fraisiers, des potentilles, des spirées sont riches en tanin et employées comme astringent antidiarrhéique en médecine populaire. Une infusion froide de feuilles de laurier-cerise (*Prunus laurocerasus*) est utilisée comme antiseptique contre les infections oculaires. Le prunier d'Afrique (*Prunus africana*) est utilisé contre l'hypertrophie bénigne de la prostate. De plus, l'écorce est utilisée en médecine traditionnelle comme laxatif et pour traiter les douleurs d'estomac, et les feuilles sont utilisées comme inhalant contre la fièvre ou bues en infusion pour améliorer l'appétit. La décoction des feuilles et de branches d'*Adenostoma fasciculatum* est utilisée pour traiter les rhumatismes et comme antiseptique pour les parties du corps infectées, douloureuses ou enflées. L'écorce interne de *Sorbus americana* possède des propriétés astringentes et antiseptiques et est également utilisé comme purificateur de sang et stimulant de l'appétit. Une décoction de vigne entière de *Rubus ursinus* a été utilisée pour traiter les maux d'estomac, la diarrhée et une sensation générale de nausée [17] [18]. La figure suivante présente quelques espèces de fruits et de fleurs de la famille des Rosaceae :



*Pomme, Malus domestica*



*Prunellier, Prunus spinosa*



*Fraisier des bois, Fragaria vesca*



*Framboisier, Rubus idaeus*



*Filipendula ulmaria - Fruit*



*Amandier, Prunus dulcis*

**Figure 3 :** Quelques espèces de la famille des Rosaceae [19].

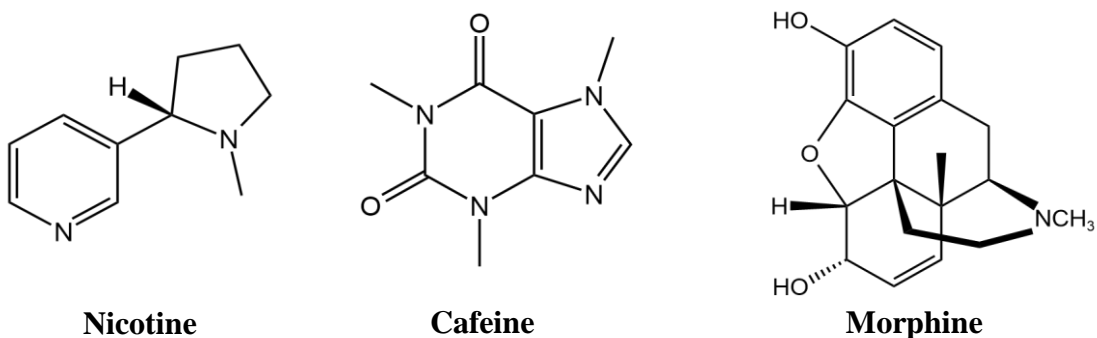
## II.6. Les métabolites des Rosaceae :

En biologie végétale, les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules. Les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites secondaires sont des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux, mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal.

Chaque végétal produit au moins une centaine de ces métabolites, classés dans trois catégories principales selon leurs structures : les alcaloïdes, les terpénoïdes, et les polyphénols, ou composés phénoliques [20].

### ➤ Les alcaloïdes :

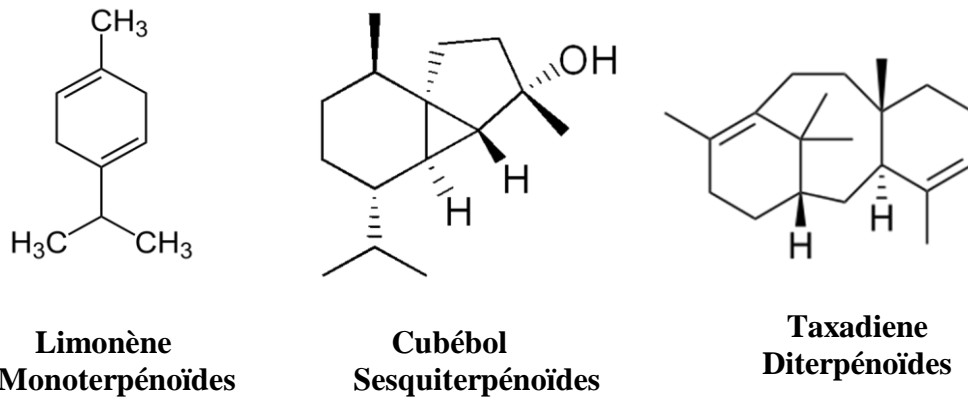
Les alcaloïdes sont d'origine naturelle, le plus souvent végétale. Ce sont des substances organiques azotés et basiques, doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tratrates, maliates,...) ou combinés à des tanins [21]. La figure suivante montre quelques structures des composés de type alcaloïdes :



**Figure 4 :** La structure chimique de quelques composés de type alcaloïdes.

### ➤ Les Terpénoïdes :

Les terpénoïdes, également appelés terpènes, constituent l'un des groupes les plus diversifiés. Ils sont synthétisés à partir de seulement deux précurseurs à cinq carbones: l'isopentényl diphosphate et le diméthylallyl diphosphate. Selon les structures, les terpénoïdes se divisent en différentes sous-classes, telles que les monoterpénoïdes (C10), les sesquiterpénoïdes (C15), les diterpénoïdes (C20). Ayant des applications dans les industries pharmaceutique et chimique [22]. La figure suivante montre quelques structures des composés de type terpénoïdes [23, 24] :

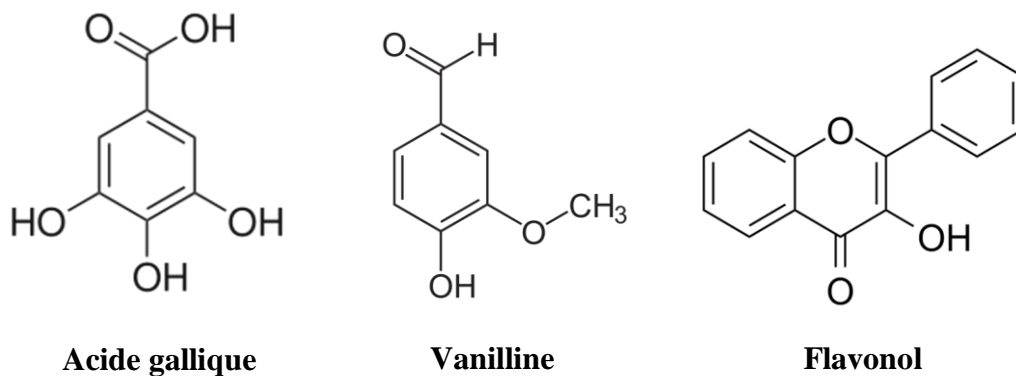


**Figure 5 :** La structure chimique de quelques composés de type terpénoïdes.

➤ **Les composés phénoliques :**

Les composés phénoliques sont les composants phytochimiques les plus importants des plantes, caractérisées par la présence d'un noyau benzoïque auquel un ou plusieurs groupes hydroxyles sont directement liés. Ils sont issus du métabolisme secondaire des végétaux et possèdent de nombreuses propriétés, notamment antioxydantes.

Les composés phénoliques les plus représentés sont les acides phénoliques, les phénols simples et les flavonoïdes [25]. La figure suivante démontre quelques structures des composés phénoliques :



**Figure 6 :** La structure chimique de quelques composés phénoliques.

Dans notre étude, nous sommes intéressés aux métabolites secondaires de type flavonoïdes.



### III. Les flavonoïdes :

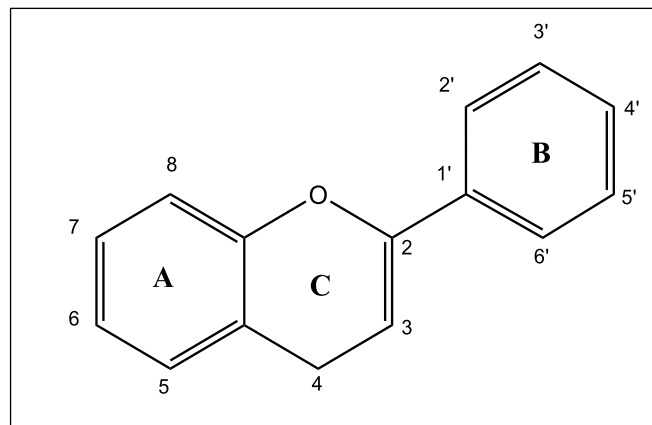
#### III.1. Généralités sur les flavonoïdes :

Les produits phytochimiques sont des molécules végétales qui protègent les humains contre de nombreuses maladies chroniques. Les flavonoïdes sont l'un des types de composés phénoliques les plus intéressants [26]. Ces composés se trouvent dans les fruits, les légumes, les céréales, l'écorce, les racines, les tiges, les fleurs, le thé [27]. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [28].

Les flavonoïdes sont désormais considérés comme un composant indispensable dans diverses applications nutraceutiques, pharmaceutiques, médicinales et cosmétiques [27]. En tant que métabolites secondaires des plantes, ils jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques et dans les réponses des plantes aux facteurs environnementaux [29].

#### III.2. Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques (cycles A et B), reliés par une chaîne linéaire à trois carbones qui forme un hétérocycle central de type pyrane (cycle C), formant une structure C6-C3-C6 (deux cycles en C6 reliés par une chaîne en C3) [30, 31] (**Figure 7**).



**Figure 7:** Structure de base des flavonoïdes.

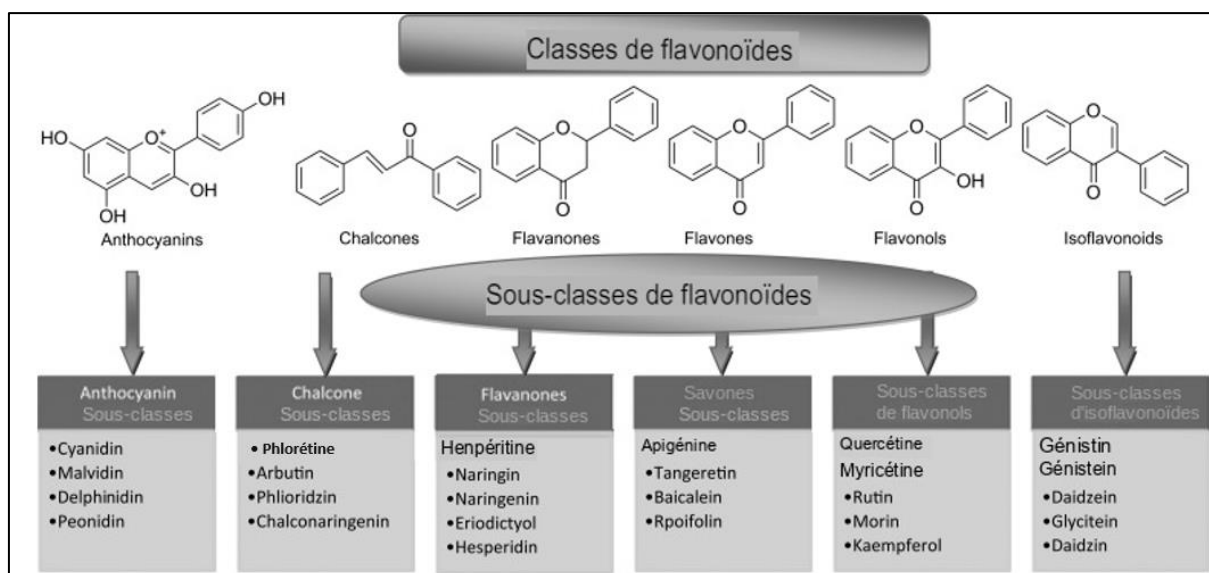
#### III.3. Classification des flavonoïdes :

La classification des flavonoïdes repose sur la position de liaison du cycle B au cycle C et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C :

- Isoflavones: Cycle B lié en position 3 du cycle C.
- Néoflavonoïdes: Cycle B lié en position 4 du cycle C.
- Flavonoïdes : cycle B lié en position 2.

Cette classe peut être subdivisée en plusieurs sous-classes sur la base des caractéristiques structurales du cycle C. Ces différentes catégories comprennent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanols ou catéchines, les anthocyanes et les chalcones.

La figure 8, illustre la classification des flavonoïdes avec des exemples pour chaque sous-groupe [27].



**Figure 8:** Classes et sous-classes de flavonoïdes.

### III.4. Rôle et bienfait des flavonoïdes:

#### ➤ *Chez les plantes*

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la reproduction des plantes en produisant les couleurs des fleurs qui attirent les pollinisateurs, et assure une protection essentielle contre les rayons ultraviolets B (UV-B), contribuant à la survie physiologique des plantes. De plus, ces composés régulent la croissance des plantes, protègent les plantes contre les herbivores [32, 33].

Les flavonoïdes ont également un rôle de protection contre les infections microbiennes, et participent à la défense contre les infections virales, agissant à différentes étapes du cycle de réplication virale [34].

#### ➤ *Chez l'homme*

Les flavonoïdes sont également importants pour la santé humaine. Les effets bénéfiques des fruits et des légumes sur le corps humain ont été attribués aux flavonoïdes et leurs fortes propriétés anti-oxydantes.

L'importance des flavonoïdes sur la santé a été traitée pour la première fois en 1936 par **Rusznayak** et **Szent-Gyorgyi**. Dans leur étude, il a été démontré que les flavonoïdes réduisent la perméabilité vasculaire, ont pour effet de renforcer l'élasticité et l'étanchéité des vaisseaux sanguins et assurent ainsi leur résistance, ainsi que l'action synergique des flavonoïdes avec la vitamine C dans le traitement du scorbut. Ces composés contribuent à réduire la formation de radicaux libres, protégeant ainsi l'organisme contre le stress oxydatif. De plus, les flavonoïdes ont la capacité de réguler la production d'acide arachidonique (AA), un acide gras qui se produit lors d'une inflammation. Certains sous-groupes de flavonoïdes ont une activité inhibitrice contre diverses infections bactériennes et virales, y compris le VIH-1. Les flavonoïdes ont également des effets anti-tumoraux sur divers cancers tels que les médulloblastomes, les cancers colorectaux, de l'estomac, des poumons et du sein [35].

### **III.5. Séparation et purification des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes généralement, constituent une part des mélanges complexes isolés des extraits des plantes ; donc des séparations et purifications sont nécessaires pour une analyse adéquate. La séparation des flavonoïdes est reposée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques [36].

#### **III.5.1. La chromatographie sur colonne (CC) :**

C'est une chromatographie d'adsorption : la migration des constituants résulte d'une succession d'adsorption et de désorptions sur la phase stationnaire. Cette technique est utilisée surtout pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes. Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire, comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide, et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant [37, 38].

#### **III.5.2. La chromatographie sur couche mince :**

La CCM est très utilisé pour l'analyse des flavonoïdes, Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, où la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants se déplaçant le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou une feuille de plastique semi-rigide ou d'aluminium. Les substances se déplacent à une vitesse qui varie en fonction de leur composition et de celle du solvant [39].

### III.6. Analyse structurale des flavonoïdes :

#### III.6.1. Techniques d'identification de structure :

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , etc...) et la spectrophotométrie UV-Visible qui donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur  $R_f$  dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles [38, 40].

#### III.6.2. Facteur de retardement ( $R_f$ ) :

Lors de la migration des composants de l'échantillon sur la plaque CCM, le facteur de retardement ( $R_f$ ) est déterminé pour chaque composant comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le produit}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

Ce facteur également appelé facteur de rétention ou valeur ( $R_f$ ), représente la vitesse caractéristique de déplacement d'un composant dans un mélange lorsque la phase mobile se déplace [41]. Ce facteur varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de la phase stationnaire, et la structure de flavonoïde lui-même (aglycone, glycosylé, différence de disposition des substituant sur le squelette flavonique) [42, 43].

Le tableau suivant démontre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$ :

**Tableau 4** : L'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$ .

| Structure flavonique                       | $R_f$  |
|--|--|
| <b>Augmentation des groupes hydroxyles</b> | $R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux. |
| <b>Méthylation des hydroxyles</b>          | $R_f$ augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux. |
| <b>Glycosylation</b>                       | $R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux  |

### III.6.3. La fluorescence sous lumière de Wood :

L'examen des substances flavoniques sous la lumière ultra violette (lumière de Wood) à la longueur d'onde de 365 nm, fournit des informations très importantes sur la configuration structurale de ces molécules. En effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution [44]. Le tableau 5 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [38] :

**Tableau 5 :** Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

| La fluorescence             | Les structures flavonique possibles              |
|-----------------------------|--|
| <b>Violette noire</b>       | Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxyflavone |
|                             | Flavonol avec 3-OR.                              |
|                             | Chalcones  |
| <b>Bleue</b>                | Flavone ou flavonol sans OH en 5.                |
|                             | Flavanone avec OH en 3 ou flavanol.              |
|                             | Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH                  |
| <b>Bleue-verte</b>          | Flavanone sans 5-OH                              |
| <b>Jaune-verte</b>          | Aurones  |
| <b>Jaune ou jaune terne</b> | Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH         |
| <b>Orange fluorescente</b>  | Isoflavones                                      |

### III.7. Identification spectrale :

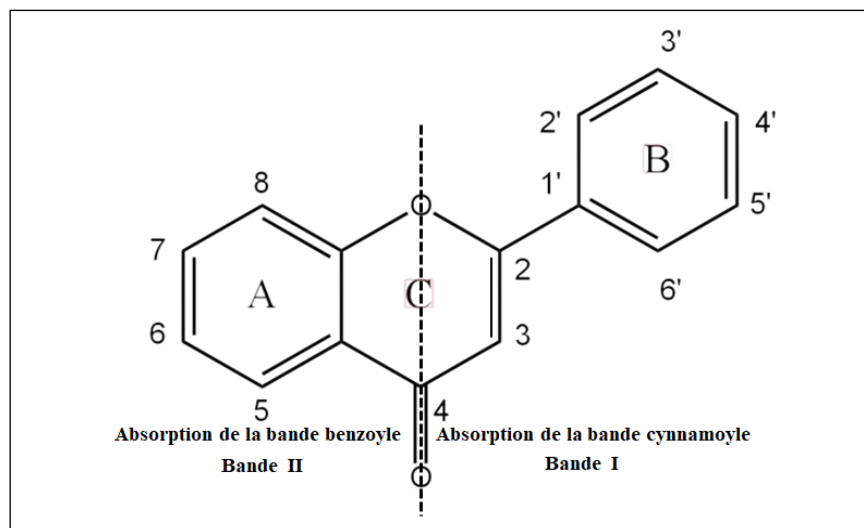
#### III.7.1. Spectrophotométrie UV- Visible :

C'est une technique qui permet de compléter les informations apportées par le comportement chromatographique et la fluorescence du produit à identifier. Elle est surtout utilisée pour une confirmation ou une identification grâce à la comparaison avec des spectres de référence [45].

Le spectre UV-visible permet l'identification du groupement chromophore d'un produit. Son principe repose sur l'enregistrement d'un spectre dans un environnement alcoolique.

Les flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption caractéristiques :

La bande II provenant du cycle A avec une d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le cycle A. Et la bande I provenant du cycle B avec un maximum entre 300-550 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> et le noyau B [21, 44].



**Figure 9 :** Les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.

Le tableau suivant montre la relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes :

**Tableau 6:** Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.

| Type de flavonoïdes                    | Bande I (nm) | Bande II (nm)               |
|--|--------------|-----------------------------|
| <b>Flavones</b>                        | 310-350      | 250-280                     |
| <b>Flavonols (3-OH libre)</b>          | 350-385      | 250-280                     |
| <b>Flavonols (3-OH substitué)</b>      | 330-360      | 250-280                     |
| <b>Isoflavones</b>                     | 310-330      | 245-275                     |
| <b>Flavanones et dihydroflavanols</b>  | 300-330      | 275-295                     |
| <b>Chalcones</b>                       | 340-390      | 230-270 faibles intensités  |
| <b>Aurones</b>                         | 380-430      | 230-270- faibles intensités |
| <b>Anthocyanidine et anthocyanines</b> | 465-560      | 270-280                     |

Les changements de l'absorbance en milieu alcoolique (méthanol), en présence de divers réactifs : NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc et H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fournissent de précieuses indications sur le

type structural, la nature et la position des substituants. Ces réactifs réagissent avec les groupements hydroxyles par formation des complexes qui se traduira sur le spectre UV-visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres, sur le squelette flavonique (**tableau 7**) [44].

**Tableau 7 :** Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des différents réactifs.

| réactifs   | $\lambda$ max (nm)  |   | Interprétation  |
|--|---|---|---|
|  | Bande I   | Bande II  |   |
| MeOH   | 304-350<br>352-385<br>328-357   | 250-280<br>250-280<br>250-280   | Flavone<br>Flavonol-3OH<br>Flavonol 3-OR                |
| NaOH   | +45 à +65<br>1- Stabilité d'intensité / MeOH<br>2- diminution d'intensité |   | OH en 4'<br><br>OR en 4' et OH en 3                     |
|  | L'intensité diminue avec le temps (décomposition)                         |   | 3',4' OH ou ortho di-OH sur A ou ortho di OH sur B      |
|  | Nouvelle bande/MeOH entre 320 à 335                                       |   | 7-OH  |
| NaOAc  |   | +5 à +20 déplacements diminuent en présence d'un substituant en 6 ou 8. | 7-OH  |
|  |   | Pas de déplacement ou très faible                                       | 7-OR  |
|  |   | Spectre qui se décompose avec le temps.                                 | 5, 6, 7-tri-OH ou 5, 7, 8-tri-OH                        |
| NaOAc+<br>H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>         | +12 à +36   |   | Ortho di-OH sur B                                       |
| AlCl <sub>3</sub>                                | Une seule bande entre 420-430.  |   | Ortho-di-OH sur B avec 5-OH                             |
| MeOH /<br>(AlCl <sub>3</sub> + HCl)              | +17 à +20   |   | 5-OH avec une oxygénation en 6.                         |
|  | +35 à +55   |   | 5-OH et 3-OMe   |
|  | +50 à +65   |   | OH en 3 avec ou sans OH en 5                            |
| AlCl <sub>3</sub> /<br>(AlCl <sub>3</sub> + HCl) | -20 à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360].                   |   | Ortho-di-OH sur B.                                      |
|  | -20 à -25   |   | Ortho-di-OH sur A et Ortho-di-OH sur B ou tri-OH sur B. |

### III.7.2. Spectrométrie La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  est maintenant une méthode bien établie pour l'analyse de la structure des flavonoïdes. La spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  fournissant des informations sur le squelette carboné de la molécule, peut être considérée comme complémentaire de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  puisqu'elle se rapporte plus étroitement à l'environnement structural du noyau flavonoïde. Dans le cas des aglycones, l'utilisation de la spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  peut ne pas être nécessaire pour les identifications structurales fines, mais c'est une méthode précieuse pour l'examen des glycosides complexes de flavonoïdes naturels [46].

#### III.7.2.1. RMN proton (RMN $^1\text{H}$ ) :

C'est une méthode qui informe sur l'environnement des protons flavoniques via la mesure des fréquences de résonance des protons correspondants qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm, elle permet de connaître [38, 47]:

- La position et le nombre de divers protons portés par le flavonoïde
- Le nombre de substituant méthoxyles portés par le squelette flavonique.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

Le spectre RMN du proton représente les pics de résonance des protons en fonction du déplacement chimique [48]. Les deux tableaux suivant représentent quelques déplacements chimiques des protons du noyau A et noyau B.

**Tableau 8** : Déplacements chimiques des protons du noyau A

| Nature du flavonoïde                | Protons du noyau A |          |                |          |                |          |
|-------------------------------------|--------------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
|                                     | H-5                |          | H-6            |          | H-8            |          |
|                                     | $\delta$ (ppm)     | $J$ (Hz) | $\delta$ (ppm) | $J$ (Hz) | $\delta$ (ppm) | $J$ (Hz) |
| 5,7 – OH                            | /                  | /        | 6.0-6.2 d      | 2.5      | 6.3-6.5 d      | 2.5      |
| 5-OH ,7OR (R= Gluc)                 | /                  | /        | 6.2-6.4 d      | 2.5      | 6.5-6.9 d      | 2.5      |
| 7-OR (R=H , sucre)                  | 8.0 d              | 9        | 6.7-7.1<br>dd  | 9.0 -2.5 | 6.7-7.0 d      | 2.5      |
| 5, 6 ,7-OR<br>5,7,8-OR (R=H ,sucre) |                    |          | 6.3s           |          | 6.3s           |          |



**Tableau 9 :** Déplacements chimiques des protons du noyau B

| Nature du flavonoïde | Protons du noyau B                     |        |  |         |
|----------------------|--|--------|--|---------|
|                      | (H <sub>2</sub> ' , H <sub>6</sub> ' ) |        | (H <sub>3</sub> ' , H <sub>5</sub> ' ) |         |
|                      | δ (ppm)                                | J (Hz) | J (Hz)                                 | δ (ppm) |
| Flavone (4'-OR)      | 7.7-7.9 d                              | 8.5    | 6.5-7.1d                               | 8.5     |
| Flavonol ( 4'-OR)    | 7.9-8.1 d                              | 8.5    | 6.5-7.1d                               | 8.5     |

**III.7.2.2. RMN carbone (RMN <sup>13</sup>C):**

Elle donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telle que [38, 49]:

-Le nombre total des atomes de carbone du composé flavonoïque ainsi que leur environnement.

-La connaissance du type des liaisons –C ou –O des sucres.

**III.8. Analyse quantitative des composés phénoliques :**

L'analyse quantitative des composés phénoliques est une étape essentielle dans la caractérisation des extraits de plantes et des produits naturels. Elle permet de déterminer avec précision la quantité de ces composés. Cette information est essentielle pour évaluer la qualité et l'efficacité des produits, offrant ainsi des informations cruciales pour la recherche en phytochimie [50].

**III.8.1. Dosage des polyphénols totaux :**

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg d'EAG/g MVS) [51].

**III.8.2. Dosage des Flavonoïdes :**

La concentration des flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg d'EQ/g MVS) [51].

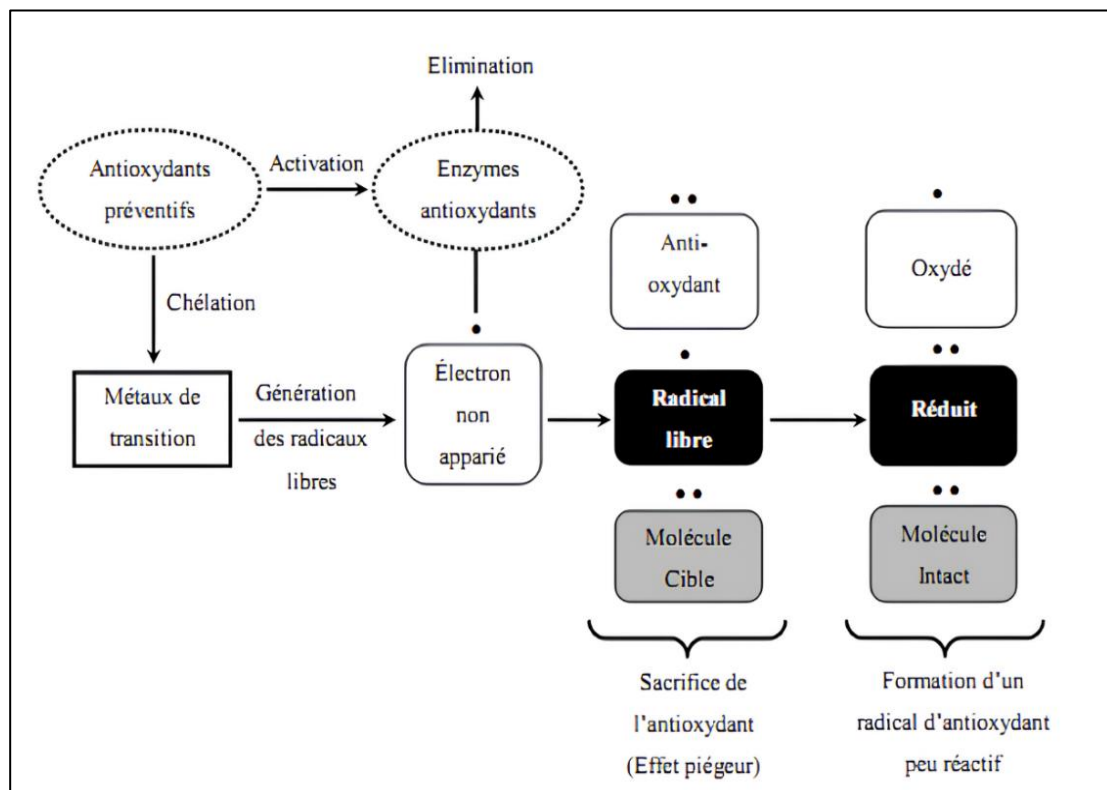
**IV. L'activité antioxydante:****IV.1. Introduction :**

Les antioxydants sont des molécules qui participent à la prévention de la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (effet préventif) ou à leur neutralisation avant qu'elles ne puissent léser les cellules. Elles combattent les radicaux libres dans notre organisme [52]. Ces molécules instables, dont la présence est inévitable, sont

nécessaires en petite quantité pour lutter contre les microbes et les virus. Cependant, un excès de radicaux libres peut avoir des conséquences notables sur la santé, telles que la dégénération des cellules, les infections et l'apparition de maladies comme le cancer. Les antioxydants peuvent aider à protéger contre ces dommages en empêchant la prolifération des radicaux libres [53].

**IV.2. Mécanisme d'action :**

Les antioxydants agissent par différents mécanismes pour neutraliser les radicaux libres. Ces mécanismes incluent l'élimination des radicaux libres en leur cédant un électron pour les convertir en une forme stable, l'activation des enzymes antioxydants capables de les décomposer en molécules moins nocives, la chélation des métaux de transition et la prévention de la formation de radicaux libres [54].



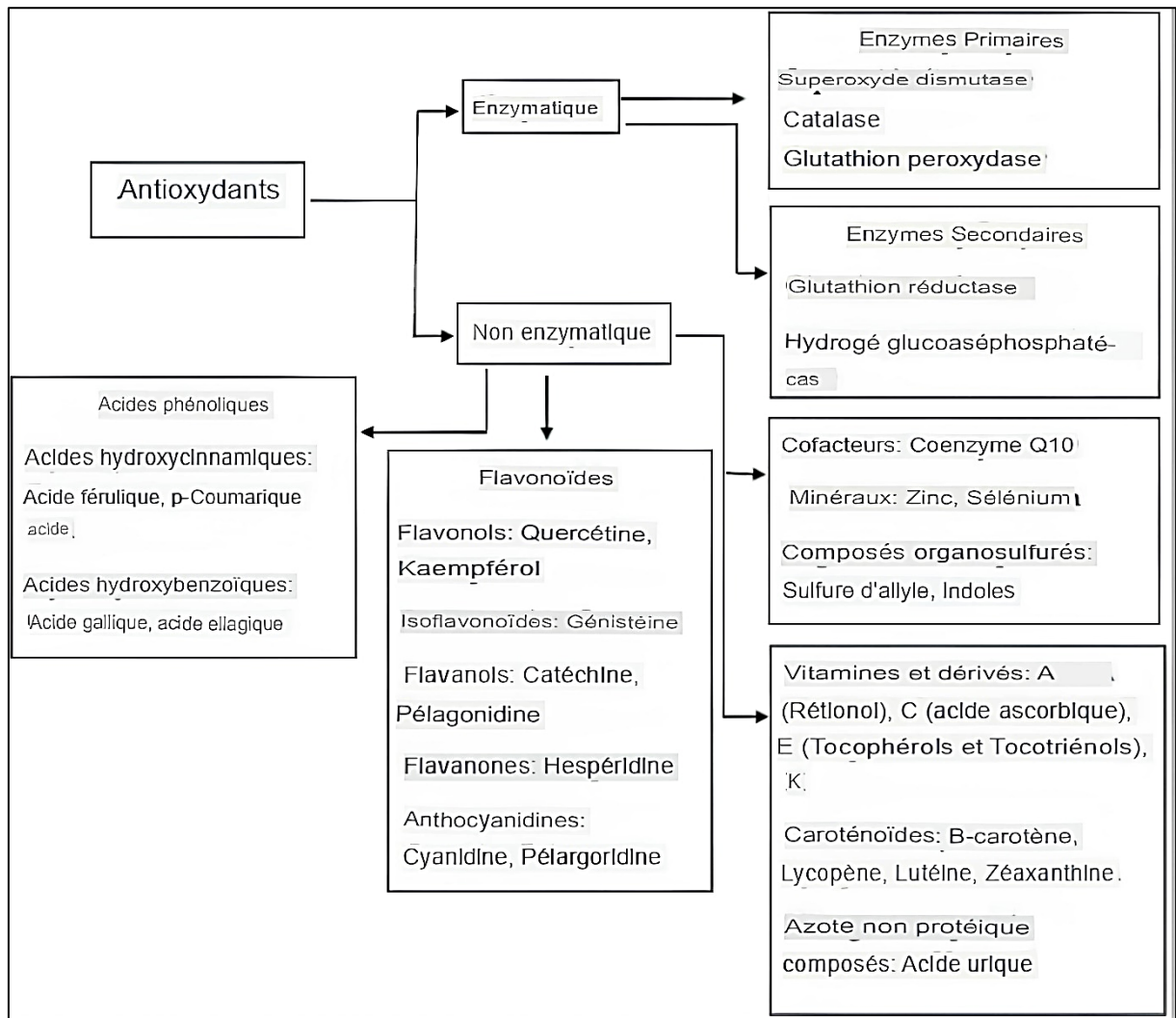
**Figure 10:** Mécanismes d'action des antioxydants.

**IV.3. Classification des antioxydants :**

Les antioxydants peuvent être classés selon leur mécanisme d'action en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les antioxydants enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Les antioxydants non enzymatiques peuvent être classés en plusieurs groupes :

- Vitamines : Vitamine C (acide ascorbique), vitamine E (tocophérol) et bêta-carotène...
- Minéraux : Zinc et sélénium
- Polyphénols : ils comprennent les flavonoïdes, les anthocyanes et les acides phénoliques.

D'autres antioxydants non enzymatiques comprennent le glutathion, l'acide urique et la coenzyme Q10 (**figure 11**) [55].



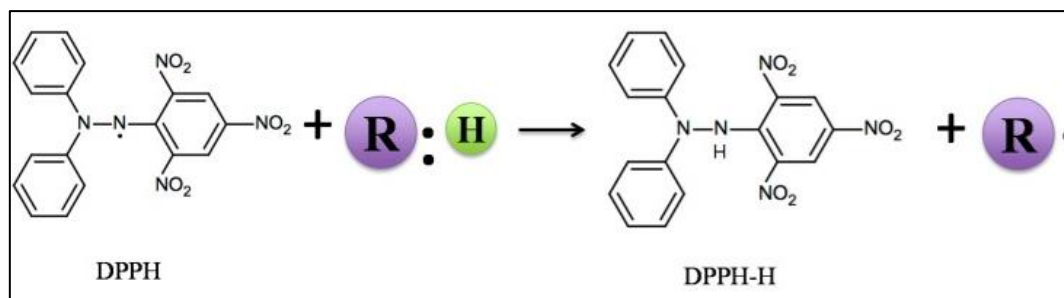
**Figure 11:** Classification des antioxydants.

**IV.4. Principaux tests de l'activité antioxydante :**

Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer la capacité antioxydante. Leur principe de fonctionnement se base sur les réactions fondamentales impliquant des réactions d'oxydo-réduction. La majorité des méthodes d'évaluation des antioxydants peuvent être classées en deux catégories : les analyses basées sur les réactions de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) et les analyses basées sur le transfert d'électrons (ET) [56].

#### IV.4.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH):

Ce test consiste à réduire une solution alcoolique du radical DPPH (de couleur violette) en présence de l'antioxydant donneur d'hydrogène (AH), conduisant à la formation de la forme non radicalaire DPPH-H. Au cours de la réaction, cette réduction s'accompagne d'un changement de couleur, du violet au jaune.



**Figure 12:** Mécanisme de réaction du (DPPH) avec l'antioxydant.

R:H = piègeur de radicaux antioxydants ; R = radical antioxydant [57].

#### IV.4.2. Le test ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonat)) :

ABTS forme également un radical libre relativement stable, qui décolore sous sa forme non-radicalaire. Dans cette méthode, Ce radical est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium pour donner une solution colorée en vert bleu. Après une période de temps fixe le reste ABTS<sup>•+</sup> est quantifié par spectrophotométrie à 734 nm. Le spectrophotométrique analyse de l'activité de piégeage ABTS<sup>•+</sup> déterminé selon la méthode de **Re et al** [58].

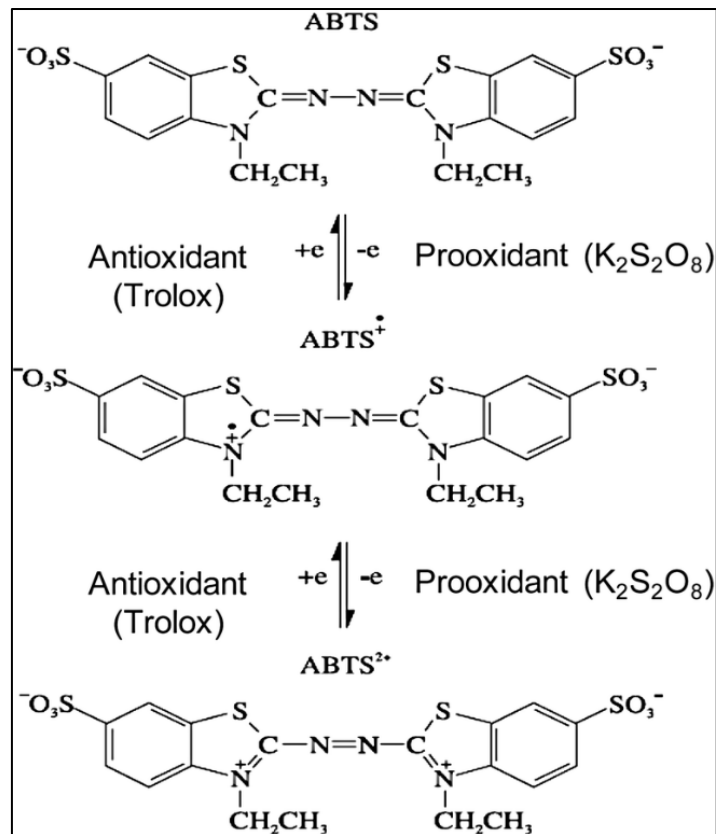


Figure 13: Formation du radicale ABTS<sup>•+</sup> [59].

#### IV.4.3. Le test FRAP (pouvoir antioxydant réducteur ferrique)

Cette méthode permet de déterminer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans un complexe ferricyanure, tel que le ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Par conséquent, le Fe<sup>2+</sup> peut être quantifié en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm.

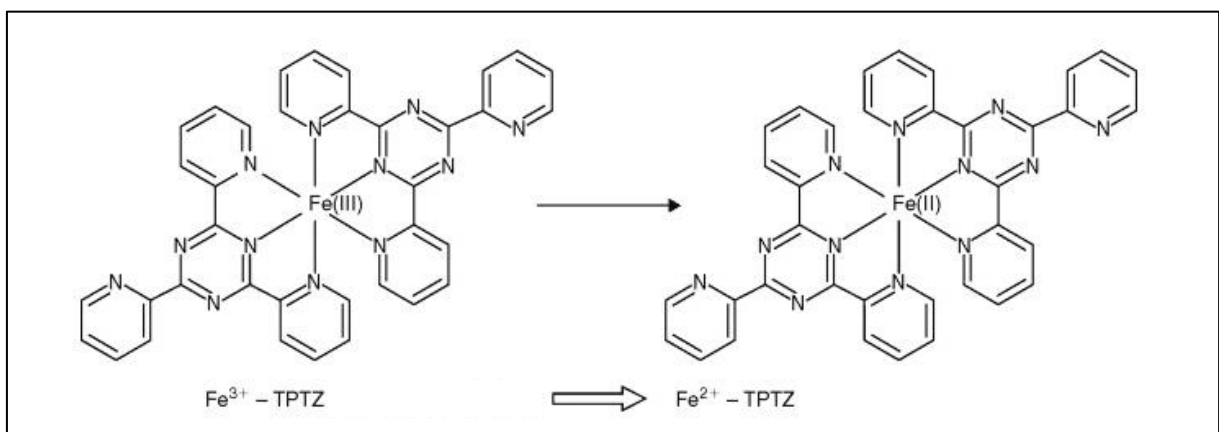
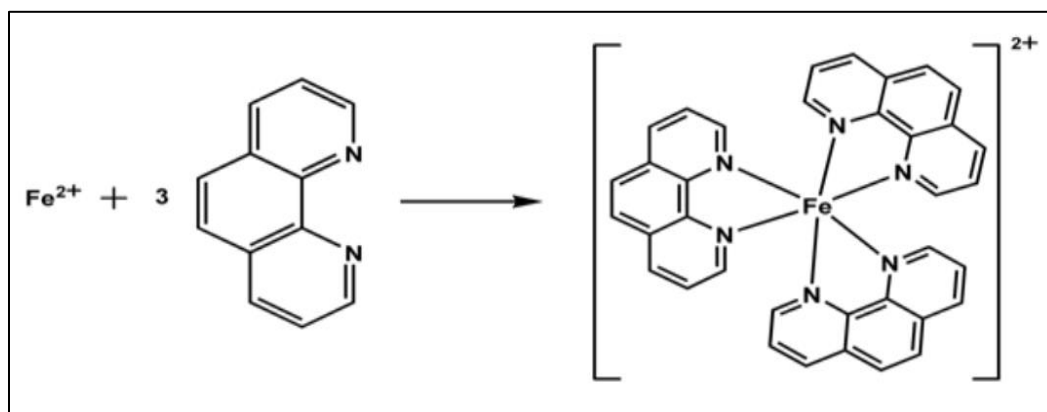


Figure 14: Schéma sur la réaction de test FRAP [60].

TPTZ : ferric2,4,6-tripyridyl-s-triazine. Fe<sup>2+</sup>: Ions ferreux. Fe<sup>3+</sup>: Ions ferriques.

#### IV.4.4. Le test d'activité réductrice par formation de $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline

Cette activité est basée sur la réaction de l'ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) avec la 1,10-phénanthroline pour donner un complexe de triphénanthroline rouge-orange. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de  $\text{Fe}^{2+}$  présente, qui est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm [61].



**Figure 15:** Formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ .



---

# **Chapitre II**

## **Matériel et Méthodes**

---



## I. Etude phytochimique de la plante :

### I.1. Matériel végétale

Notre travail concerne des extraits d'une plante de la famille des Rosaceae qui a été récoltée dans la région de Constantine au mois de Mai 2021. La plante a été mise à notre disposition par l'équipe de recherche du laboratoire d'obtention des substances thérapeutique (L.O.S.T).

Les extraits sont préparés comme suit:

Après le séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été broyées et pesées (679 g). Cette dernière a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (EtOH/ H<sub>2</sub>O, 7/3, v/v) pendant 24 heures, trois fois successivement à température ambiante.

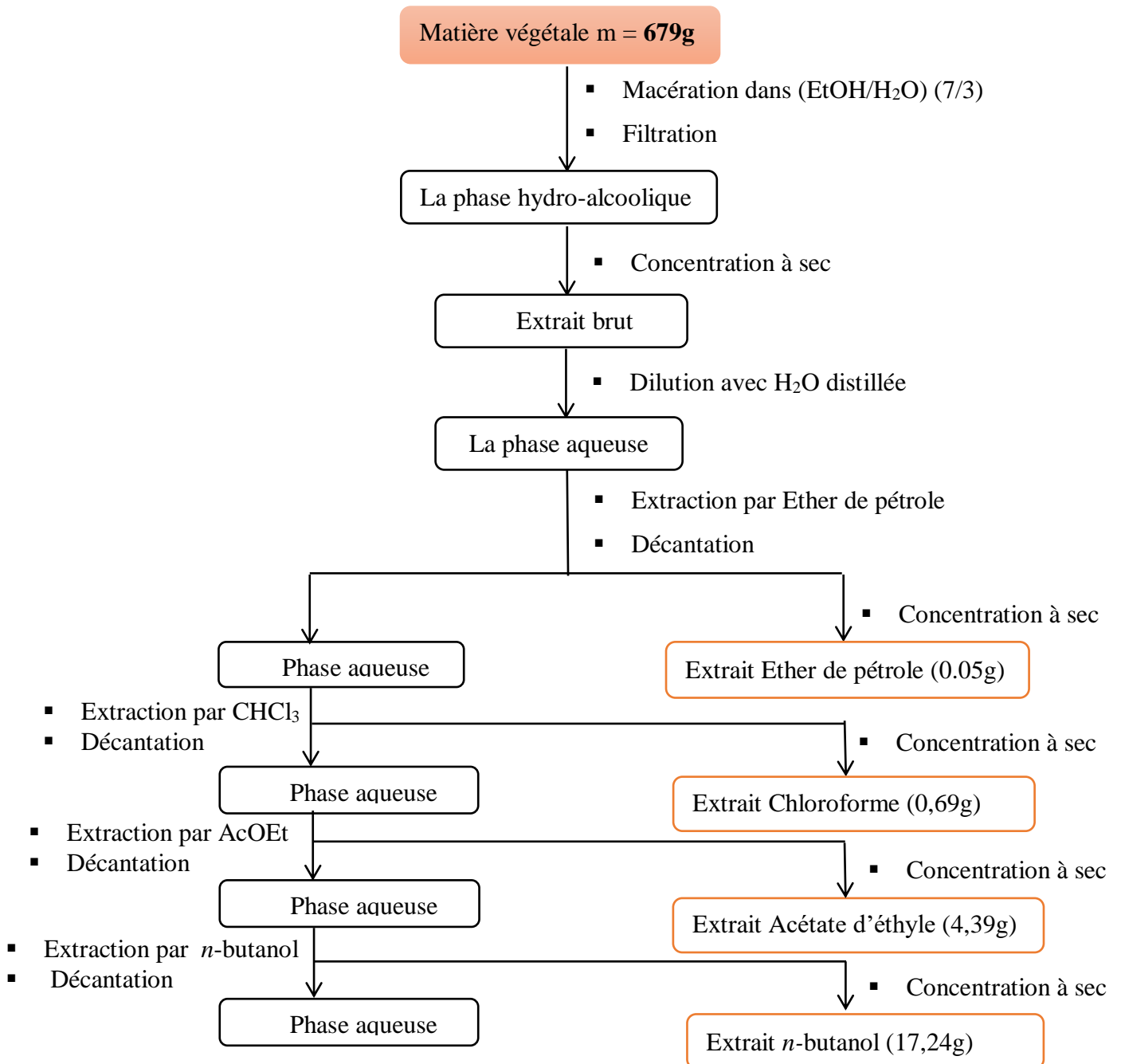
Après filtration, le filtrat a été concentré sous vide à une température n'excédant pas 40°C. L'extrait brut obtenu a ensuite été dilué dans de l'eau distillée et laissé au repos à froid pendant 24 heures.

La phase aqueuse résultante a été fractionnée par extractions liquide/liquide successives au moyen de quatre solvants de polarité croissante (éther de pétrole (3 x 350 ml), chloroforme (3 x 350 ml), acétate d'éthyle (3 x 350 ml) et *n*-butanol (3 x 350 ml)). Les phases organiques obtenues ont été évaporées sous vide et pesées pour donner :

- L'extrait Ether de pétrole (0,05 g).
- L'extrait Chloroforme (0,69 g).
- L'extrait Acétate d'éthyle (4,39 g).
- L'extrait *n*-butanol (17,24 g).

Le schéma suivant résume les différentes étapes de l'extraction de la plante étudiée :





**Figure 16 :** Différentes étapes de l'extraction de la plante étudiée.

## I.2. Séparation chromatographique :

L'ensemble des extraits ont subi des tests chromatographiques analytiques sur couche mince avec divers systèmes d'élution dont le but est d'avoir les empreintes des composés flavoniques et pour mettre au point le bon système de séparation en chromatographie de colonne.

Notre choix s'est porté sur celui de l'extrait acétate d'éthyle qui est moyennement riche en flavonoïdes.


### I.2.1. Séparation et purification de l'extrait acétal d'éthyle :

3.5 g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissous dans le minimum de méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de silice. Le mélange est ensuite séché sous vide puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système dichlorométhane-méthanol, en commençant par le dichlorométhane pur et en augmentant progressivement la polarité par l'addition du méthanol.

Des fractions de 25 ml ont été collectées et suivies par CCM de gel de silice, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées dans un mélange de l'acide sulfurique, l'acide acétique et de l'eau. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Résultats de séparation par CC de l'extrait acétate d'éthyle.

| N° de fraction | Système d'élution                 |        |
|----------------|-----------------------------------|--------|
|                | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> % | MeOH % |
| 1-12           | 100                               | 0      |
| 13-19          | 99                                | 1      |
| 20-58          | 98                                | 2      |
| 59-73          | 97                                | 3      |
| 74-80          | 96                                | 4      |
| 81-155         | 94                                | 6      |
| 156-162        | 90                                | 10     |
| 163-177        | 80                                | 20     |
| 178-190        | 60                                | 40     |
| 191-200        | 0                                 | 100    |



Les fractions ayant une composition similaire, comme indiqué par les résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) et éluées à travers divers systèmes, sont regroupées (**tableau 11**).

**Tableau 11** : Résultats du regroupement final des fractions.

| N° de fraction | Nom de fraction | Observation         |
|----------------|-----------------|---------------------|
| 1-26           | f <sub>1</sub>  | Trace               |
| 27-34          | f <sub>2</sub>  | Mélange séparable   |
| 35-56          | f <sub>3</sub>  | Mélange inséparable |
| 57-75          | f <sub>4</sub>  | Mélange séparable   |
| 76-88          | f <sub>5</sub>  | Mélange inséparable |
| 89-113         | f <sub>6</sub>  | Mélange séparable   |
| 114-123        | f <sub>7</sub>  | Mélange séparable   |
| 124-136        | f <sub>8</sub>  | Mélange inséparable |
| 137-150        | f <sub>9</sub>  | Mélange inséparable |
| 151-172        | f <sub>10</sub> | Mélange inséparable |
| 173-185        | f <sub>11</sub> | Mélange inséparable |
| 186-190        | f <sub>12</sub> | Mélange de produits |
| 191-200        | f <sub>13</sub> | Mélange inséparable |

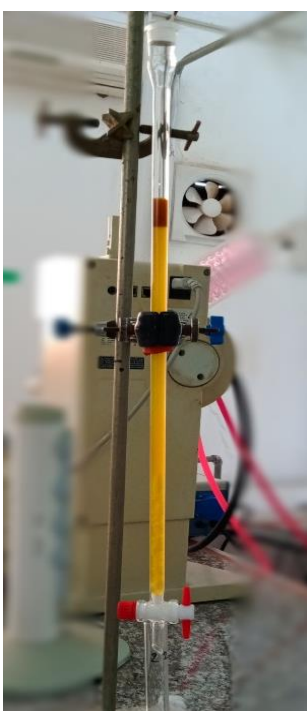
Parmi les fractions obtenues, nous avons étudié celles qui sont simples et séparables. Nous avons sélectionné deux fractions, à savoir f<sub>2</sub> et f<sub>4</sub>, pour une analyse approfondie .

#### I.2.1.1. Etude de la fraction f<sub>2</sub> :

Une masse de 50 mg de cette fraction a subi une deuxième séparation par colonne chromatographique sur gel de silice normal éluee par un système isocratique (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt : 8/2 : v/v), des fractions de 5.0 ml ont été collectées et suivies par chromatographie sur couche mince. Ce qui nous a permis de séparer le produit P<sub>1</sub> sous forme d'un précipité jaune à l'état pur. Les résultats sont reportés dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction  $f_2$ .

| N° lot | Nom de fraction | Observation  |
|--------|-----------------|--|
| 1-4    | $f_{2-1}$       | Traces   |
| 5-10   | $f_2$           | Produit pure <b>P<sub>1</sub></b><br>(précipité jaune) |
| 11-23  | $f_{2-3}$       | Mélange de produits                                    |
| 24-29  | $f_{2-4}$       | Mélange de produits                                    |


**I.2.1.2. Etude de la fraction  $f_4$  :**

Cette fraction a été séparée par colonne de gel de silice, l'élution a été réalisée par le système isocratique (Cyclohexane/ AcOEt : 5/5 : v/v); le fractionnement a été réalisé chaque 5.0 ml. Le suivi des différentes fractions est effectué par chromatographie CCM.

La progression de cette colonne est donnée dans le tableau 13 :

**Tableau 13** : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction  $f_4$ .

| N° lot | Nom de fraction | Observation   |
|--------|-----------------|---|
| 1-9    | $f_{4-1}$       | Mélange de produits                                 |
| 10-17  | $f_{4-2}$       | Produit pure <b>P<sub>2</sub></b> (cristaux jaunes) |
| 18-34  | $f_{4-3}$       | Mélange de produits                                 |
| 35-42  | $f_{4-4}$       | Mélange de produits                                 |
| 43-62  | $f_{4-5}$       | Produit pure <b>P<sub>3</sub></b>                   |
| 63-70  | $f_{4-6}$       | Traces  |

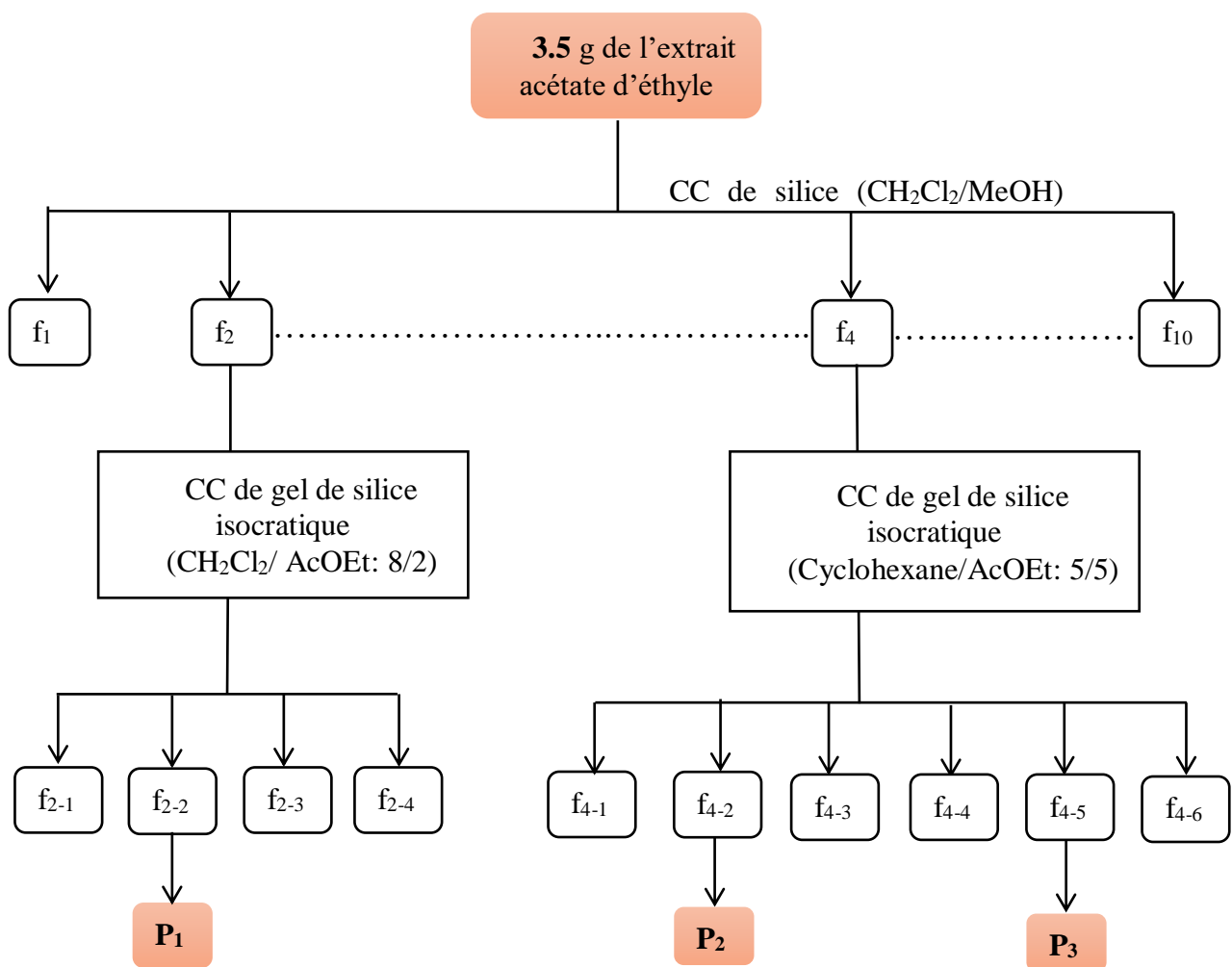
- *Traitement de la sous fraction  $f_{4-2}$*

Pour la sous fraction  $f_{4-2}$ , nous avons observé la formation des cristaux fins de couleur jaune que nous avons lavé et séché pour obtenir le produit  $P_2$  à l'état pur.

- *Traitement de la sous fraction  $f_{4-5}$*

La sous fractions  $f_{4-5}$  montre une mono-tâche sur la plaque CCM de coloration jaune, sous la lumière UV 356 nm, a donné un produit  $P_3$  à l'état pur.

La figure 17 résume les différentes étapes de séparation de l'extrait acétate d'éthyle.



**Figure 17** : Schéma résumant les différentes étapes de la séparation de l'extrait acétate d'éthyle.

## II. Détermination des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

### II.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [62] selon la méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et al [63].

#### II.1.1. Principe :

Les polyphénols sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

#### II.1.2. Protocole :

- **Préparation de Carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7, 5% :**

7,5 grammes de  $Na_2CO_3$  sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

- **Préparation d'échantillon:**

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de Méthanol.

- **Préparation de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois :**

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10 ml avec l'eau distillée.

- **Procédure :**

Dans une microplaque à 96 puits, 20  $\mu$ l de chaque extrait de notre plante (1 mg/ml) ont été mélangés avec 100  $\mu$ l de FCR dilué 10 fois (1:10) et 75  $\mu$ l de solution de carbonate de sodium à 7,5 % ( $Na_2CO_3$ ). Le blanc est parallèlement préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol. Après 2 h d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm dans le lecteur de microplaque.

Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax$ ), réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait).

- **Courbe d'étalonnage :**

On prend 1 mg de l'acide gallique et on le dissolvé dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S1 (200 $\mu$ g /ml). A partir de cette dernière, une série de solutions filles est ainsi

préparée par dilution, de concentrations allant de 25 à 200 µg/ml. Les dilutions sont préparées comme suit :

25µg/ml → 25µl de S1+ 175µl de MeOH

50 µg /ml → 50µl de S1+ 150µl de MeOH

75µg/ml → 75µl de S1+ 125µl de MeOH

100µg/ml → 100µl de S1+ 100µ de MeOH

125µg /ml → 125µl de S1+ 75µl de MeOH

150µg /ml → 150µl de S1+ 50µl de MeOH

175 µg /ml → 175µl de S1+ 25µl de MeOH

200µg /ml → 200µl de S1

Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

## II.2. Dosage des flavonoïdes :

### II.2.1. Principe :

Le dosage des flavonoïdes des extraits est déterminé en utilisant la méthode décrit par **Topçu et al** [64] avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits .cette méthode est basée sur la formation d'un complexe stable entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes.

### II.2.2. Protocole :

- **Préparation des solutions:**

-Pour 1M Potassium acétate ( $CH_3COOK$ ) on dissolvé 9.80 g de ( $CH_3COOK$ ) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution.

-Pour 10% nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3, 9H_2O$ ) on pèse 10g de ce produit dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de l'échantillon:**

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution.

Une microplaque à 96 puits a été remplie avec 50 µl de chaque extrait de notre plante puis 130 µl de méthanol (MeOH) ont été ajouté. Ensuite 10 µl de la solution de potassium acétate ( $CH_3COOK$ ) et 10 µl de la solution de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3, 9H_2O$ ) ont été ajouté.

Le blanc est parallèlement préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Après l'incubation pendant 40 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée dans le Lecteur de microplaque à 415 nm.

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax$ ), réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la Quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'équivalents la concentration par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

- **Courbe d'étalonnage :**

On prend 1 mg de la Quercétine et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution S2 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A partir de cette dernière, une série de solutions filles est ainsi préparée par dilution, de concentrations allant de 25 à 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les dilutions sont préparées comme suit :

|                              |        |   |
|------------------------------|--------|---|
| 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$   | —————> | 25 $\mu\text{l}$ de S2+ 175 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 50 $\mu\text{g} /\text{ml}$  | —————> | 50 $\mu\text{l}$ de S2+ 150 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$   | —————> | 75 $\mu\text{l}$ de S2+ 125 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  | —————> | 100 $\mu\text{l}$ de S2+ 100 $\mu$ de MeOH        |
| 125 $\mu\text{g} /\text{ml}$ | —————> | 125 $\mu\text{l}$ de S2+ 75 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 150 $\mu\text{g} /\text{ml}$ | —————> | 150 $\mu\text{l}$ de S2+ 50 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 175 $\mu\text{g} /\text{ml}$ | —————> | 175 $\mu\text{l}$ de S2+ 25 $\mu\text{l}$ de MeOH |
| 200 $\mu\text{g} /\text{ml}$ | —————> | 200 $\mu\text{l}$ de S2                           |

Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

### III. Evaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon. Au cours de cette étude, l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par l'application de quatre techniques chimiques à savoir : le radical 2,2diphényl1-1-picrylhydrazyl (**DPPH**), le test de L'acide 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (**ABTS**), l'activité du pouvoir réducteur du fer (**FRAP**) et l'activité de réduction par la formation du complexe **Fe<sup>+2</sup>- phénantroline**.



Avant de commencer, nous diluons nos extraits après l'extraction pour créer sept concentrations différentes, allant de la plus forte à la plus faible. Ensuite, nous transférons ces solutions diluées dans des tubes Eppendorf.

L'acide ascorbique et le Trolox, reconnus pour leurs puissantes propriétés antioxydantes, servent des standards de référence dans notre étude.

### **III.1. Test du DPPH (2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl):**

L'évaluation de l'effet antioxydant des extraits envers le radical DPPH est réalisée selon la méthode de **Blois (1958)** [58].

- **Protocol :**

- ✓ **Préparation du DPPH**

On dissout 4 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol. Le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à T = -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est de 0,7 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

- ✓ **Préparation des solutions mères :**

On mélange 1 mg de chaque extrait, avec 1 ml de MeOH absolu dans un Eppendorf.

- ✓ **Procédure**

On dépose 40 µl d'extrait dilué dans 1 ml de méthanol sur une microplaque à 96 puits. On ajoute ensuite 160 µl de DPPH à chaque puits. Parallèlement, on prépare un blanc de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol. On mélange 40 µl du méthanol avec 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH.

Après incubation pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH selon la formule :

$$I (\%) = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

I (%) : pourcentage d'inhibition.

AC : Absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif).

AE : Absorbance en présence de l'extrait.

### III.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup> :

Ce test est déterminé selon la méthode de **Re et al** [65].

- **Protocol :**

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$  : On mélange les deux produits en solution aqueuse et on les met à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. On ajuste l'absorbance de la solution ainsi obtenue par dilution avec de l'éthanol ou de l'eau à  $0,700 \pm 0,020$  à 734 nm avant l'usage.

- ✓ **Procédure**

Pour chaque échantillon, on dépose 40  $\mu$ l d'extrait sur une microplaque à 96 puits. Ensuite, on ajoute 160  $\mu$ l d'ABTS à chaque puits. En parallèle, on prépare un blanc de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol. On mélange 40  $\mu$ l de méthanol avec 160  $\mu$ l d'une solution méthanolique d'ABTS.

Après 10 minutes d'incubation, on mesure l'absorbance à 734 nm.

### III.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) :

L'activité du pouvoir réducteur est déterminée par la méthode de **Oyaizu et al (1986)** [66].

- **Protocole :**

- ✓ **Préparation des solutions:**

1. Acide trichloroacétique (TCA) à 10%: On dissout 1 g de TCA dans 10 ml d'eau distillée.
2. Potassium ferricyanure ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%: On dissout 1 g de  $K_3Fe(CN)_6$  dans 100 ml d'eau distillée.
3. Chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) à 0,1%: On dissout 0,1 g de  $FeCl_3$  dans 100 ml d'eau distillée.

- ✓ **Procédure**

La solution des extraits à différentes concentrations (10  $\mu$ l) a été déposée dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Puis on ajoute 40  $\mu$ l d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50  $\mu$ l d'une solution de potassium ferricyanure  $K_3Fe(CN)_6$  (1%). Par la suite, les mélanges sont incubés à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50  $\mu$ l de TCA, 40  $\mu$ l de  $H_2O$  et 10  $\mu$ l de  $FeCl_3$  sont rajoutés au milieu réactionnel.

Parallèlement, Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol. Les absorbances ont été mesurées à 700 nm et les résultats ont été calculés comme  $A_{0,5}$  (concentration en  $\mu$ g/ml correspondante à l'absorbance à 0,50 nm).

### III.4. L'activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ - phénantroline :

L'activité de réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthrolinea été déterminée par la méthode de **Szydłowska-Czerniak** [67].

- **Protocol :**

- ✓ **Préparation des solutions:**

1. Phénanthroline 0,5 % : On dissout 0,05 g de 1,10-phénanthroline dans 10 ml de (MeOH).
2. Ferric chloride  $\text{FeCl}_3$  à 0.2% : On dissout 0,02 g de  $\text{FeCl}_3$  dans 10 ml ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

- ✓ **Procédure**

Dans une microplaque à 96 puits : 10 $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations, 50 $\mu\text{l}$  de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), 30 $\mu\text{l}$  de phénanthroline et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol. Incuber le mélange réactionnel dans l'obscurité pendant 20 minutes à 30°C et mesurer l'absorbance du mélange réactionnel à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



---

# **Chapitre III**

## **Résultats et Discussion**

---



## I. Elucidation structurale du produit P<sub>1</sub> :

L'identification du produit P<sub>1</sub> isolé a été basée sur ses propriétés chromatographiques (Fluorescence sous lumière de Wood et R<sub>f</sub>) et ses analyses spectrales : UV-visible et RMN<sup>1</sup>H.

### I.1. Comportement chromatographique :

**Tableau 14** : Comportement chromatographique du produit P<sub>1</sub>.

| <i>Systeme</i>                    | <i>SI</i> |
|-----------------------------------|-----------|
| R <sub>f</sub>                    | 0,56      |
| Fluorescence sous lumière de Wood | Jaune     |

**SI** : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ AcOEt) (8/2), (phase stationnaire gel de silice normal).

### I.2. Données spectroscopiques UV-Visible :

L'ensemble des données de la série spectral UV-visible du composé P<sub>1</sub> est rapporté dans le (tableau 15) qui résume les enregistrements des spectres effectués dans le MeOH en présence d'une série des réactifs.

**Tableau 15** : Données de la série spectrale UV-visible du produit P<sub>1</sub>.

| Réactifs                               | Bande I<br>$\lambda_{\max}$ (nm) | Bande II<br>$\lambda_{\max}$ (nm) | Interpretation   |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| MeOH                                   | 362                              | 266                               | <b>Flavonol (3-OH)</b>                                 |
| NaOH                                   | 414                              | 279                               | <b>4'-OH</b>   |
| NaOAc                                  | 385                              | 275                               | <b>7-OH</b>  |
| NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 364                              | 270                               | <b>Pas d'Ortho di-OH sur le cycle B</b>                |
| AlCl <sub>3</sub>                      | 424                              | 270                               | <b>Pas d'Ortho di-OH sur le cycle B</b><br><b>5-OH</b> |
| AlCl <sub>3</sub> +HCl                 | 424                              | 269                               |  |

### ➤ Interprétation

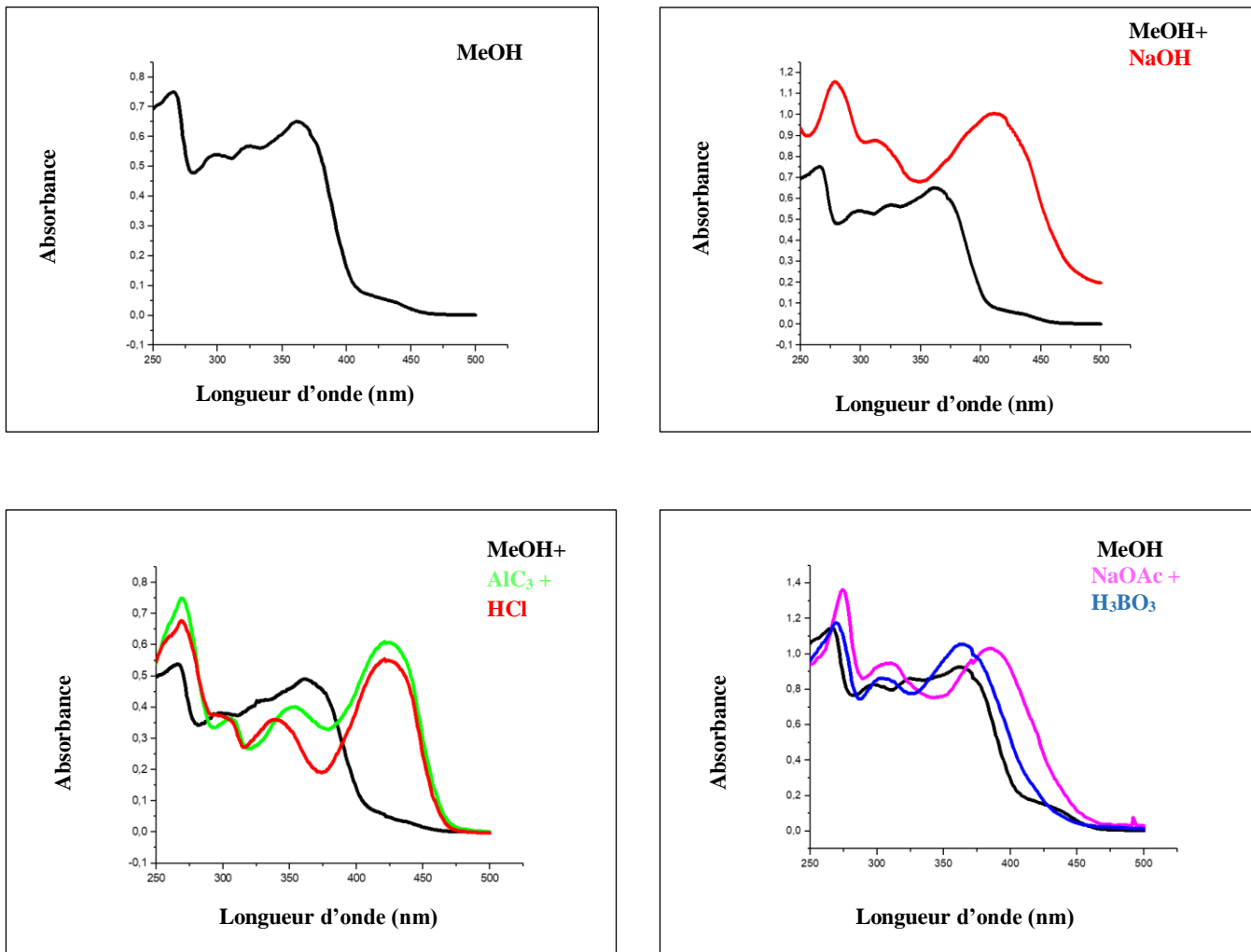
- Le comportement chromatographique dans le système (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ AcOEt) (8/2) et la fluorescence jaune sous la lumière de Wood indiquent que le composé **P<sub>1</sub>** est un flavonoïde aglycone de type flavonol (3-OH). Ceci est confirmé par le spectre UV enregistré dans le méthanol (**figure 17**), qui donne deux bandes d'absorption l'une à  $\lambda_{\max} = 362 \text{ nm}$  (bande I) et l'autre à  $\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}$  (bande II).

- Un déplacement bathochrome de  $\Delta\lambda = + 52 \text{ nm}$  pour la bande I, observé après l'ajout de NaOH avec une augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, indique la présence d'un OH libre en position 4'.

- Le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc montre un déplacement bathochrome de la bande II de  $\Delta\lambda = + 9 \text{ nm}$  par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, indique ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

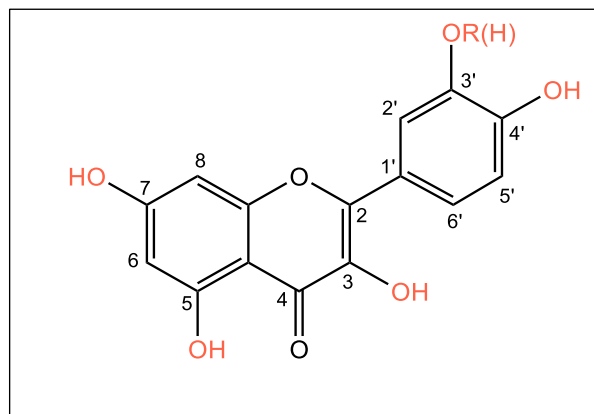
- Un déplacement bathochrome de  $\Delta\lambda = + 62 \text{ nm}$  de la bande I, observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié (AlCl<sub>3</sub> + HCl), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

- L'absence d'un effet hypsochrome de la bande **I** après l'addition de HCl au système (MeOH+AlCl<sub>3</sub>), indique l'absence d'un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B. Ceci est confirmé par le faible déplacement de la bande I de  $\Delta\lambda = + 2 \text{ nm}$ , en comparant le spectre (MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) avec le spectre enregistré dans le méthanol.



**Figure 18 :** Série spectrale UV- Visible du produit **P1**.

Ces données permettent de proposer la structure partielle du produit **P1** comme étant un flavonol (3-OH), possédant des groupements hydroxyles en positions 5,7 et 4' avec ou sans présence d'un substituant en position 3'.



### I.3. Données spectroscopiques RMN<sup>1</sup>H:

Le tableau résume les données spectroscopiques RMN<sup>1</sup>H du produit **P<sub>1</sub>**.

**Tableau 16 :** Données spectroscopiques RMN<sup>1</sup>H (250MHz, CD<sub>3</sub>OD) du produit **P<sub>1</sub>**.

| Déplacement Chimique (ppm) | Intégration | Multiplicité  | Constante de couplage <i>J</i> (Hz) | Attribution        |
|----------------------------|-------------|---------------|-------------------------------------|--------------------|
| 7.90                       | 2H          | Doublet large | -                                   | H <sub>2',6'</sub> |
| 6,72                       | 2H          | Doublet large | -                                   | H <sub>3',5'</sub> |
| 6,20                       | 1H          | Pic large     | -                                   | H <sub>8</sub>     |
| 5.98                       | 1H          | Pic large     | -                                   | H <sub>6</sub>     |

#### ➤ Interprétation:

L'examen du spectre RMN<sup>1</sup>H du produit **P<sub>1</sub>** montre la présence de :

- Deux signaux sous forme d'un doublet large d'intégration 2H à  $\delta = 7.90$  ppm et  $\delta = 6,72$  ppm (un couplage de type Ortho) attribuable successivement aux protons H<sub>2',6'</sub> et H<sub>3',5'</sub>, respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.
- Deux signaux sous forme d'un pic large d'intégration 1H (un couplage de type méta), apparaît à  $\delta = 6,20$  ppm et l'autre à 5.98 ppm, attribués respectivement aux protons H<sub>8</sub> et H<sub>6</sub>. Indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.



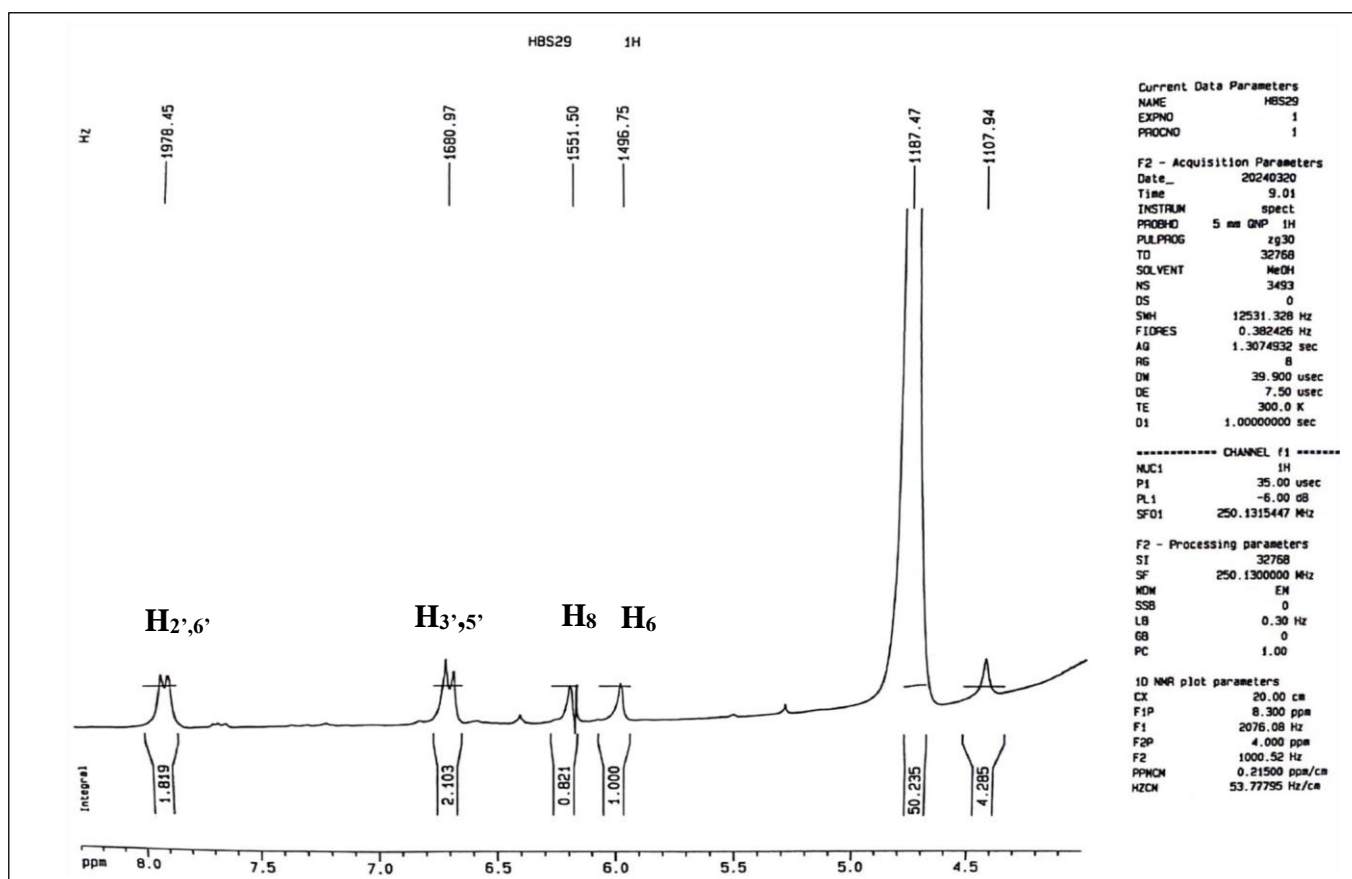
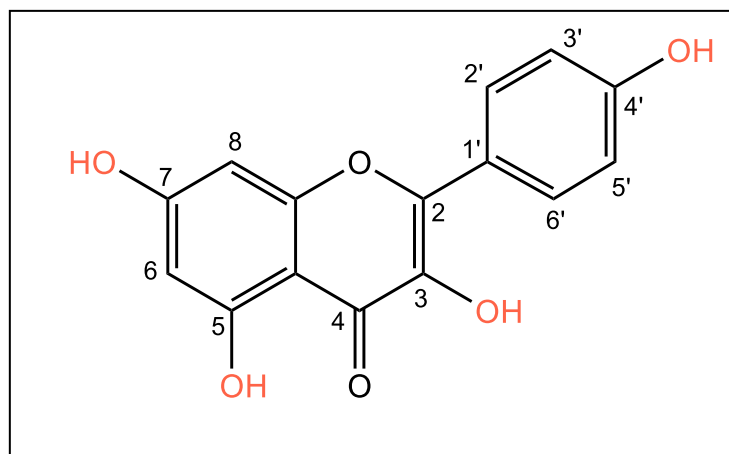


Figure 19 : spectre RMN<sup>1</sup>H (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du produit P<sub>1</sub>.

Ces résultats nous permettent d'identifier la structure finale du produit P<sub>1</sub> qui correspond au kaempferol.

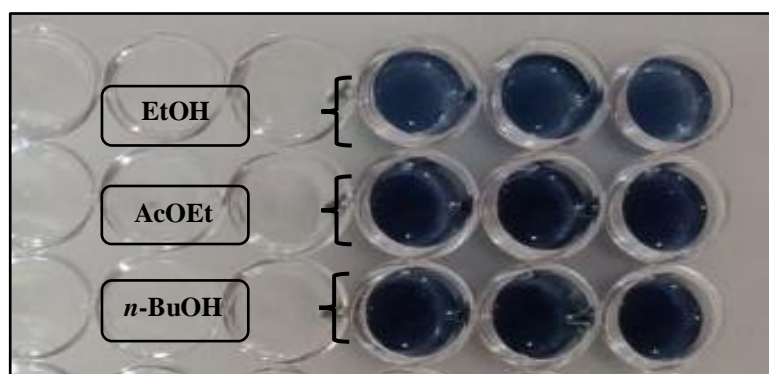


Kaempferol

## II. Analyse quantitative des composés phénoliques :

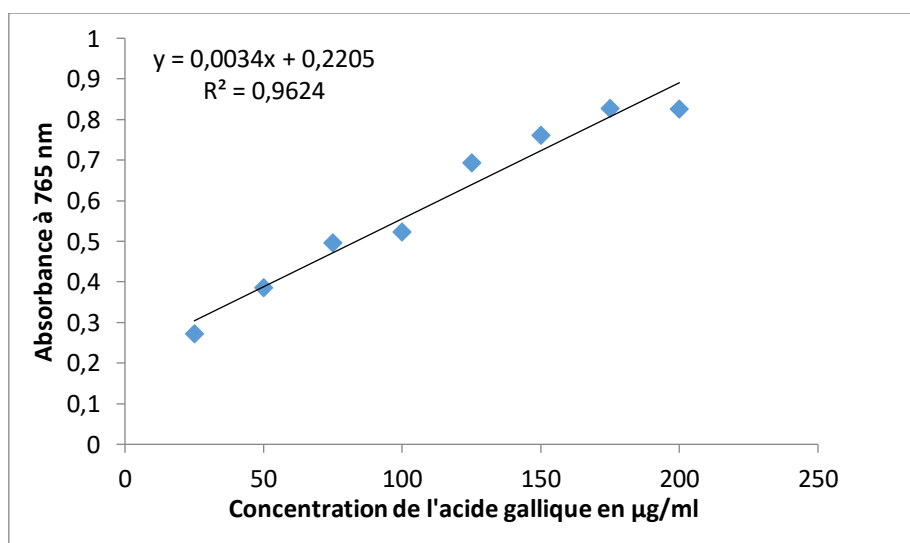
### II.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par **Muller et al.** Cependant une couleur bleu foncé est observée dans tous les extraits comme résultats, comme indiqué par nos résultats. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des polyphénols. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm.



**Figure 20 :** Photo prises lors du dosage de polyphénols totaux.

La teneur en polyphénols est exprimée en microgramme équivalent en acide gallique par millilitre de l'extrait, les résultats ont été déterminés graphiquement à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ayant l'équation suivante :  $y=0,0034x+0,2205$  avec  $R^2=0.9624$ . La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 21.

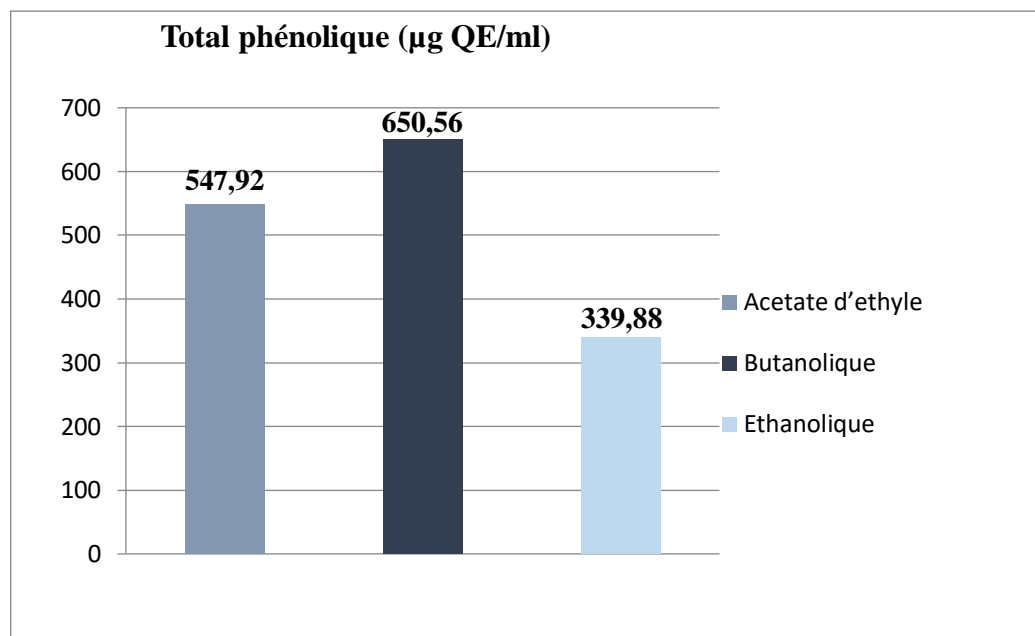


**Figure 21 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats sont présentés dans le tableau 17 et la figure 22 :

**Tableau 17** : La teneur en composés phénoliques.

| Extrait          | Total phénolique ( $\mu\text{g QE/ml}$ ) |
|------------------|--|
| Acetate d'éthyle | $547,92 \pm 17,07$                       |
| butanolique      | $650,56 \pm 43,67$                       |
| hydroéthanolique | $339,88 \pm 23,41$                       |



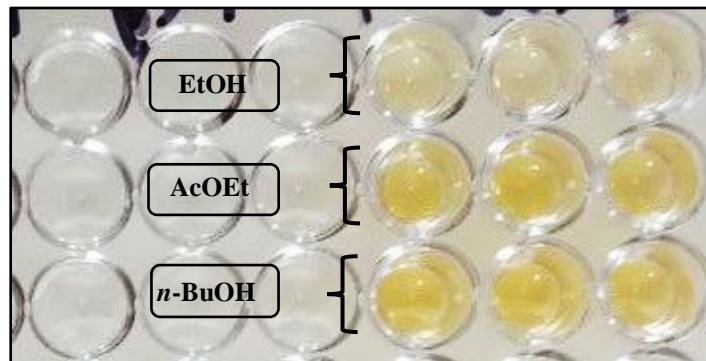
**Figure 22** : Histogramme présente les teneurs en polyphénol.

Les résultats du dosage révèlent que les trois extraits acétate d'éthyle, butanolique et hydroéthanolique possèdent une quantité de polyphénols avec une teneur de  $547.92 \pm 17.07$ ,  $650.56 \pm 43,67$  et  $339.88 \pm 23.41 \mu\text{g EAG/ml}$  respectivement. Ces résultats indiquent que les extraits étudiés sont très riches en polyphénols comparée à ceux des polyphénols trouvés dans l'extrait de thé vert ( $400 \mu\text{g /g}$ ) [67].

## II.2. Dosage des flavonoïdes :

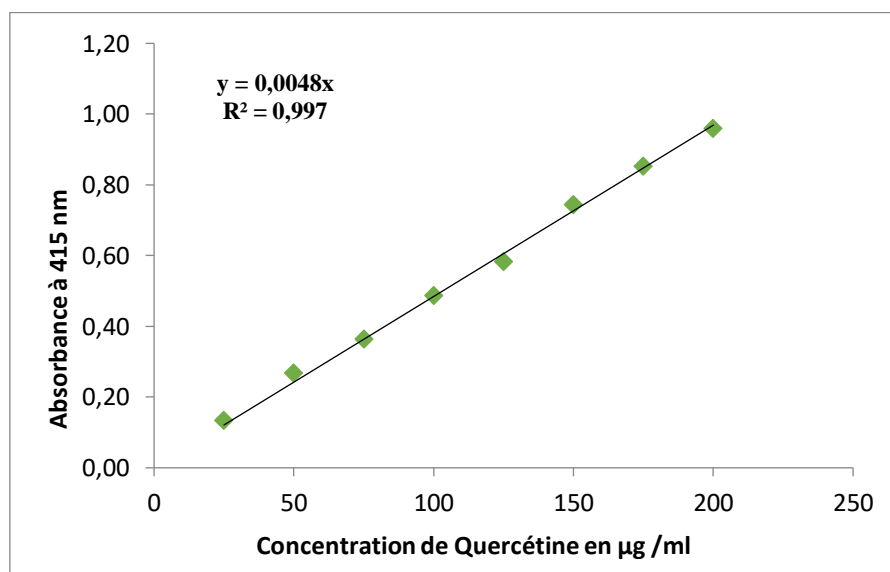
Le Dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode de nitrate d'aluminium  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , elle est basée sur la formation d'un complexe entre  $\text{Al}^{+3}$  et les flavonoïdes. Le résultat est

déterminé par l'apparition d'une couleur jaune qui est indiquée la présence de flavonoïdes. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 415 nm.



**Figure 23 :** Photo prise lors du dosage de flavonoïdes.

La teneur en flavonoïde est exprimée en microgramme équivalent en Quercétine par millilitre de l'extrait, les résultats ont été déterminés graphiquement à partir de la courbe d'étalonnage de la Quercétine ayant l'équation suivante :  $y=0,0048x$  avec  $R^2=0,997$ .

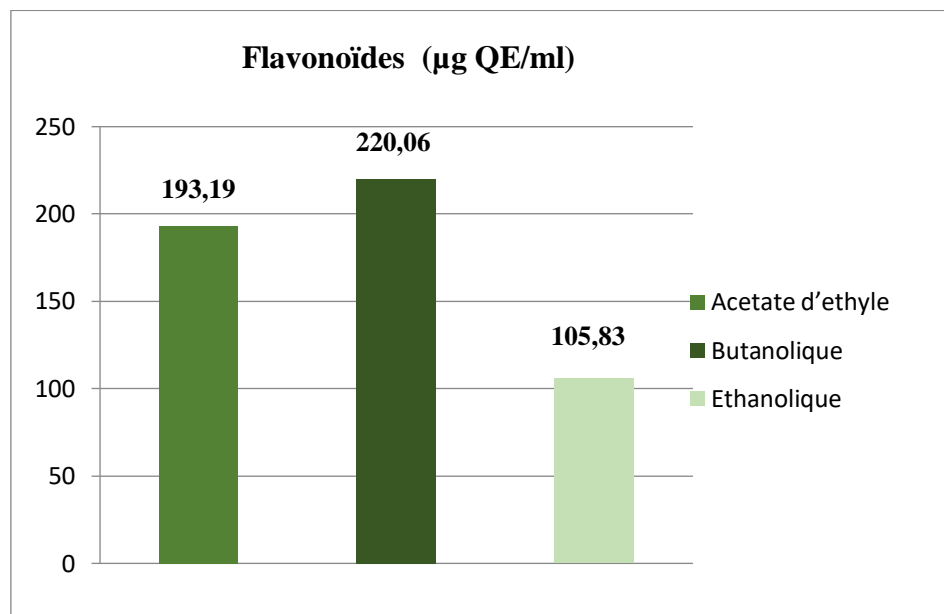


**Figure 24:** Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes sont présentés dans le tableau 18 et la figure 25 :

**Tableau 18** : La teneur en flavonoïdes.

| Extrait          | Flavonoïdes ( $\mu\text{g QE/ml}$ ) |
|------------------|-------------------------------------|
| Acetate d'éthyle | 193,19 $\pm$ 2,20                   |
| Butanolique      | 220,06 $\pm$ 5,59                   |
| Hydroéthanolique | 105,83 $\pm$ 13,25                  |

**Figure 25** : Histogramme présente les teneurs en flavonoïde.

D'après les résultats obtenus, l'extrait butanolique est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 220,06 $\pm$ 5,59  $\mu\text{g EQE/ml}$ , suivie par l'extrait acétate d'éthyle avec une teneur de 193,19 $\pm$ 2,20  $\mu\text{g EQE/ml}$ , et l'extrait hydroéthanolique avec une teneur de 105,83 $\pm$ 13,25  $\mu\text{g EQE/ml}$ . Nous pouvons conclure que notre plante est riche en flavonoïdes.

### III. Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des trois extraits hydroéthanolique, acétate d'éthyle et *n*-butanol a été évaluée par quatre méthodes DPPH, ABTS, FRAP, et l'activité de réduction du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline.

Les résultats de ces tests sont présentés à travers un tableau récapitulatif et un histogramme.

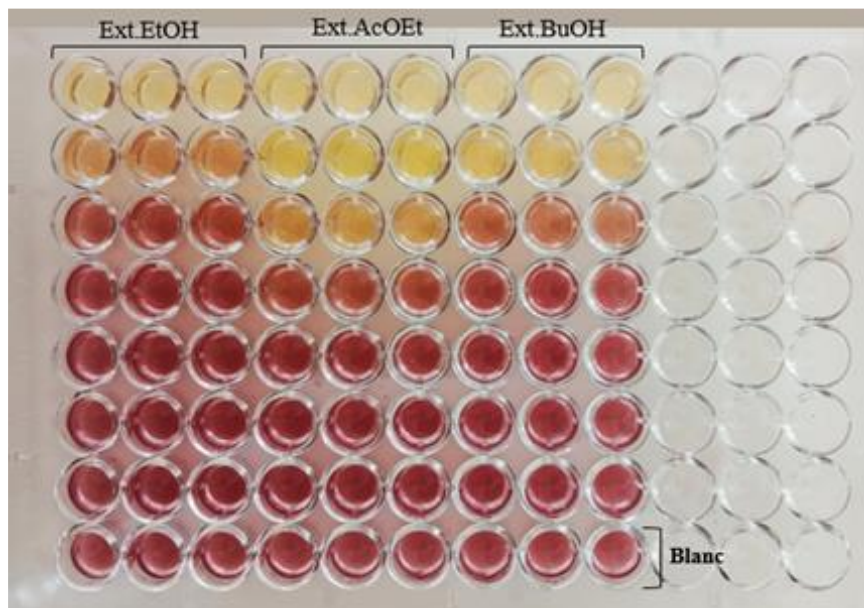
Pour les tests ABTS et DPPH, les résultats sont exprimés en termes de  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice à 50%) en  $\mu\text{g/ml}$ . Cette valeur représente la concentration de l'extrait antioxydant nécessaire pour inhiber et réduire de 50% des radicaux libres. Une valeur plus faible de  $CI_{50}$  indique une activité antioxydante plus élevée.

En ce qui concerne le test FRAP et l'activité de réduction du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline, les résultats sont calculés en fonction de l'absorbance  $A_{0,5}$ , (concentration en  $\mu\text{g/ml}$  correspondante à l'absorbance à 0,50 nm). Dans ce cas, une absorbance plus faible indique un pouvoir réducteur plus important.

L'acide ascorbique et le Trolox, reconnus pour leurs puissantes propriétés antioxydantes, servent des standards de référence dans notre étude.

### III.1. Test du DPPH:

L'efficacité anti-radicalaire des extraits a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. Cette méthode s'appuie sur la réduction du radical  $\text{DPPH}^+$ , caractérisée par un changement de couleur violette à jaune, indique le pouvoir réducteur de la substance testée.

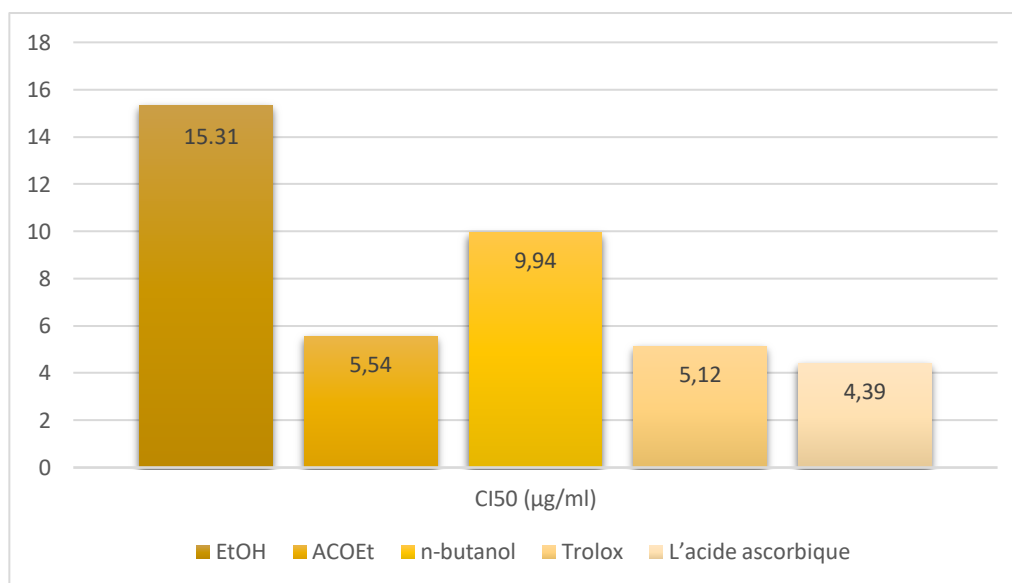


**Figure 26 :** Photo prise lors du dosage de l'activité anti radicalaire DPPH.

Les valeurs des  $CI_{50}$  trouvées pour les trois extraits testés sont présentées ci-dessous :

**Tableau 19** : Pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents extraits.

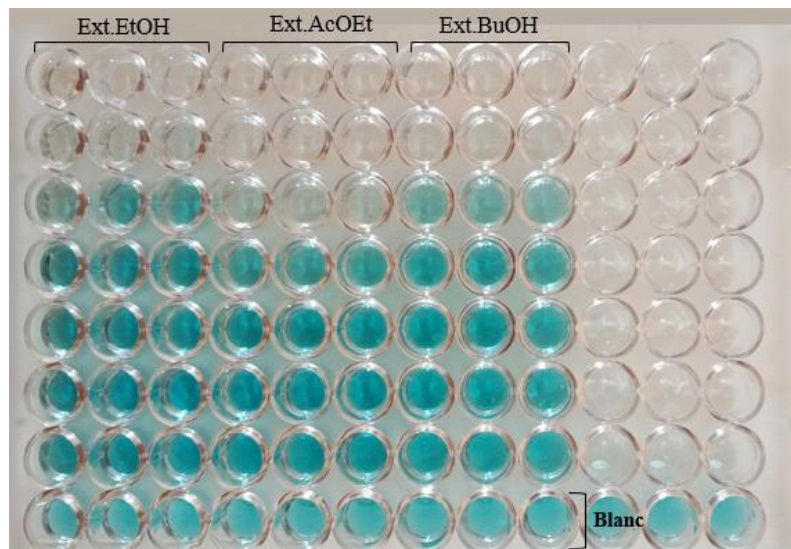
| Extraits                  | % inhibition      |                  |                 |                |                |              |              | CI <sub>50</sub> (µg/ml)       |
|---------------------------|-------------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------------------------|
|                           | 0.390625          | 0.78125          | 1.5625          | 3.125          | 6.25           | 12.5         | 25           |                                |
| <b>EtOH</b>               | 5,53±2,17         | 8,46±1,74        | 7,10±1,57       | 9,76±0,62      | 16,11±1,42     | 46,75±1,78   | 79,99±2,03   | <b>15,31±0,21</b>              |
| <b>AcOEt</b>              | 5,26±2,06         | 5,37±3,19        | 10,47±1,71      | 23,81±1,74     | 57,86±1,83     | 80,97±2,46   | 82,86±0,66   | <b>5,54±0,19</b>               |
| <b>n-butanol</b>          | 2,44±1,15         | 3,04±1,02        | 1,74±0,71       | 7,16±2,35      | 22,94±2,73     | 67,73±1,51   | 83,13±0,34   | <b>9,94±0,07</b>               |
| <b>Standards</b>          | <b>0.78125 µg</b> | <b>1.5625 µg</b> | <b>3.125 µg</b> | <b>6.25 µg</b> | <b>12.5 µg</b> | <b>25 µg</b> | <b>50 µg</b> | <b>CI<sub>50</sub> (µg/ml)</b> |
| <b>Trolox</b>             | 6.42±0.91         | 13.33±2.14       | 30.19±0.67      | 61.48±2.98     | 87.16±0.28     | 88.46±0.11   | 87.72±0.47   | <b>5.12±0.21</b>               |
| <b>L'acide ascorbique</b> | 0.31±1.02         | 12.90±0.28       | 29.69±0.39      | 76.67±0.37     | 84.94±0.84     | 87.78±0.49   | 86.36±0.21   | <b>4.39±0.01</b>               |

**Figure 27** : Les valeurs des CI<sub>50</sub> du test DPPH.

D'après les résultats présentés dans le tableau 19, l'extrait acétate d'éthyle exhibe une activité excellente par rapport aux standards Trolox et acide ascorbique, avec une valeur de CI<sub>50</sub>: 5,54±0,19 µg/ml. Il est important de souligner que les extraits butanolique et hydroéthanolique présentent également une activité antioxydante puissante, avec des valeurs de CI<sub>50</sub> respectives de 9,94±0,07 et 15,31±0,21 µg/ml.

### III.2. Test de l'ABTS :

L'action d'un antioxydant donneur d'hydrogène entraîne la réduction du cation  $ABTS^{•+}$  de couleur bleu-vert en un état incolore. Cette transformation s'accompagne d'une disparition de la couleur bleu-vert.



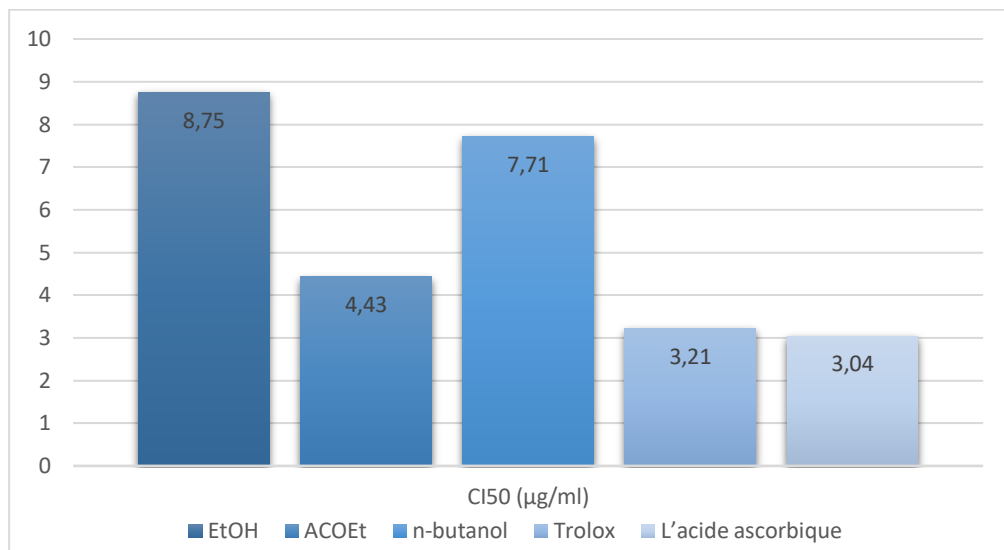
**Figure 28** : Photos prise lors de dosage de l'activité  $ABTS^{•+}$

À partir des analyses réalisées sur les extraits, nous avons déterminé le pourcentage d'inhibition du radical ABTS. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 20 :

**Tableau 20** : Pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents extraits.

| Extraits                  | % inhibition                            |  |                                       |                                      |                                      |                                    |                                    | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )  |
|---------------------------|---|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
|                           | 0.390625                                | 0.78125                                | 1.5625                                | 3.125                                | 6.25                                 | 12.5                               | 25                                 |                                 |
| <b>EtOH</b>               | NA                                      | NA                                     | 12,20 $\pm$ 1,41                      | 15,42 $\pm$ 2,95                     | 24,24 $\pm$ 1,00                     | 79,37 $\pm$ 2,30                   | 91,99 $\pm$ 0,78                   | <b>8,75<math>\pm</math>0,23</b> |
| <b>AcOEt</b>              | 0,96 $\pm$ 1,25                         | 4,30 $\pm$ 0,95                        | 10,18 $\pm$ 2,19                      | 29,54 $\pm$ 3,67                     | 76,67 $\pm$ 1,67                     | 92,39 $\pm$ 0,30                   | 92,45 $\pm$ 0,78                   | <b>4,43<math>\pm</math>0,02</b> |
| <b>n-butanol</b>          | 1,59 $\pm$ 1,40                         | 1,82 $\pm$ 2,40                        | 5,28 $\pm$ 0,75                       | 13,35 $\pm$ 0,95                     | 39,27 $\pm$ 2,00                     | 87,61 $\pm$ 3,98                   | 90,26 $\pm$ 3,30                   | <b>7,71<math>\pm</math>0,29</b> |
| <b>Standards</b>          | <b>0.78125 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>1.5625 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>3.125 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>6.25 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>12.5 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>25 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>50 <math>\mu\text{g}</math></b> | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )  |
| <b>Trolox</b>             | 14.74 $\pm$ 0.37                        | 26.15 $\pm$ 0.65                       | 51.70 $\pm$ 1.51                      | 89.72 $\pm$ 0.67                     | 92.89 $\pm$ 0.19                     | 92.89 $\pm$ 0.19                   | 91.84 $\pm$ 1.19                   | <b>3.21<math>\pm</math>0.06</b> |
| <b>L'acide ascorbique</b> | 13.43 $\pm$ 0.82                        | 28.76 $\pm$ 0.67                       | 52.94 $\pm$ 0.94                      | 93.21 $\pm$ 0.11                     | 93.08 $\pm$ 0.19                     | 92.40 $\pm$ 0.88                   | 92.96 $\pm$ 0.11                   | <b>3.04<math>\pm</math>0.05</b> |



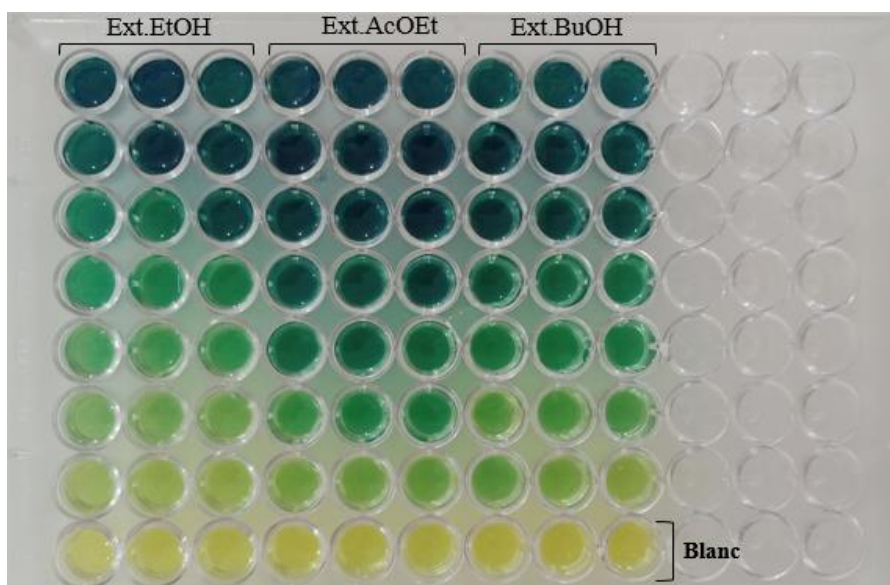


**Figure 29** : Les valeurs des CI<sub>50</sub> du test ABTS

Les résultats du test ABTS montrent que l'extrait AcOEt possède une activité antioxydante puissante (CI<sub>50</sub> = 4,43±0,02 µg/ml) comparé aux standards testés, suivi de l'extrait *n*-butanol (CI<sub>50</sub> = 7,71±0,29 µg/ml) et enfin de l'extrait EtOH (CI<sub>50</sub> = 8,75±0,23 µg/ml).

### III.3. Test du FRAP :

Dans ce test, la couleur de la solution d'analyse vire du jaune au bleu-vert, en fonction du pouvoir réducteur de chaque composé. Ce changement de couleur est révélateur de la capacité des antioxydants à transformer le complexe Fe<sup>3+</sup> en ions ferreux Fe<sup>2+</sup>.

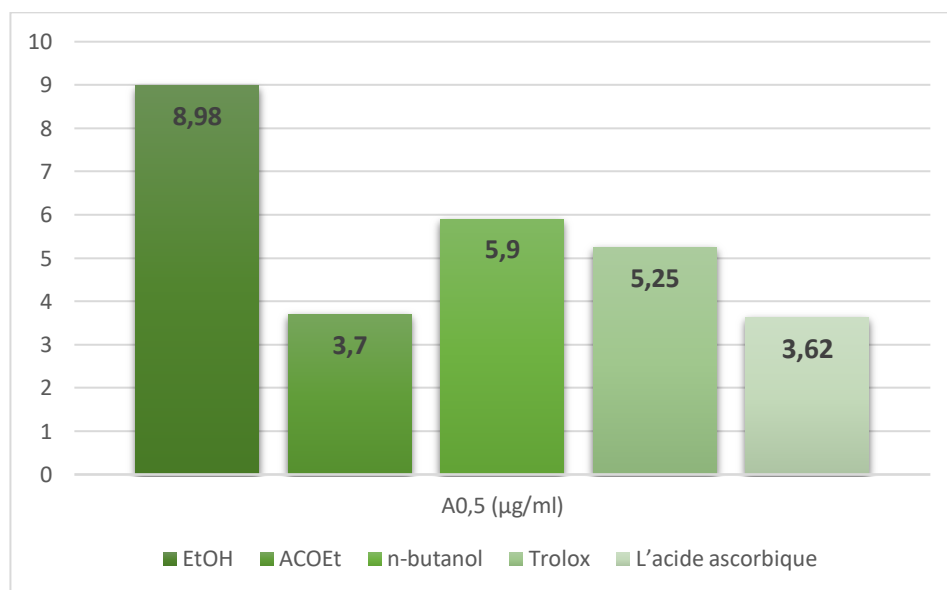


**Figure 30**: Photos prise lors de dosage de l'activité FRAP.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

**Tableau 21** : Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits étudiés.

| Extraits                  | % inhibition    |                |                 |                 |                 |                 |                | A <sub>0,5</sub><br>(µg/ml) |
|---------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
|                           | 3.125           | 6.25           | 12.5            | 25              | 50              | 100             | 200            |                             |
| <b>EtOH</b>               | 0,27±0,03       | 0,40±0,06      | 0,64±0,07       | 1,00±0,13       | 1,86±0,54       | 3,24±0,87       | 3,61±0,93      | <b>8,98±1,44</b>            |
| <b>AcOEt</b>              | 0,39±0,04       | 0,80±0,19      | 1,41±0,19       | 2,05±0,21       | 2,97±0,47       | 3,86±0,17       | 3,44±0,40      | <b>3,70±1,07</b>            |
| <b>n-butanol</b>          | 0,36±0,05       | 0,46±0,04      | 0,95±0,04       | 1,43±0,22       | 2,41±0,13       | 2,99±0,12       | 3,22±0,29      | <b>5,90±0,32</b>            |
| <b>Standards</b>          | <b>0.0976µg</b> | <b>0.195µg</b> | <b>0.390 µg</b> | <b>0.781 µg</b> | <b>1.562 µg</b> | <b>3.125 µg</b> | <b>6.25 µg</b> | A <sub>0,5</sub> (µg/ml)    |
| <b>Trolox</b>             | 0.07±0.00       | 0.08±0.00      | 0.09±0.01       | 0.13±0.00       | 0.19±0.02       | 0.28±0.05       | 0.60±0.04      | <b>5.25±0.20</b>            |
| <b>L'acide ascorbique</b> | 0.07±0.00       | 0.09±0.01      | 0.12±0.01       | 0.17±0.01       | 0.25±0.02       | 0.47±0.03       | 0.79±0.09      | <b>3.62±0.29</b>            |



**Figure 31** : Les valeurs des A<sub>0,5</sub> du test FRAP.

Les capacités antioxydantes des extraits acétate d'éthyle et butanolique se situent dans la même gamme que celles des standards Trolox et acide ascorbique, on peut déduire que les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique présentent un meilleur pouvoir réducteur avec les valeurs de A<sub>0,50</sub> : 3,70±1,07 et 5,90±0,32 µg/ml par rapport à l'extrait hydroéthanolique.

### III.4. Test de phénantroline :

Dans ce test l'antioxydant entraîne la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Ce dernier réagit ensuite avec la phénantroline pour former un complexe stable de couleur rouge-orangé.

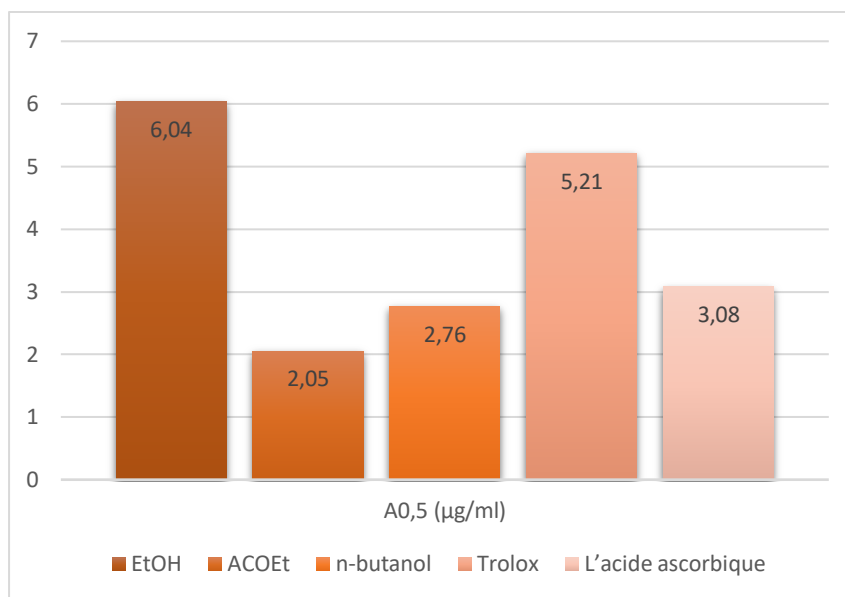


**Figure 32:** Photos prise lors de dosage de l'activité  $\text{Fe}^{2+}$  -phénanthroline.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

**Tableau 22:** Absorbance du complexe  $\text{Fe}^{2+}$  – phénanthroline.

| Extraits           | % inhibition                          |                                      |                                       |                                       |                                       |                                       |                                      | $A_{0,5}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
|                    | 3.125                                 | 6.25                                 | 12.5                                  | 25                                    | 50                                    | 100                                   | 200                                  |                                   |
| EtOH               | 0,39±0,03                             | 0,51±0,01                            | 0,75±0,05                             | 1,26±0,13                             | 1,95±0,09                             | 2,72±0,08                             | 3,65±0,17                            | <b>6,04±0,16</b>                  |
| AcOEt              | 0,62±0,05                             | 0,96±0,10                            | 1,62±0,09                             | 2,54±0,32                             | 3,65±0,33                             | 4,51±0,19                             | 4,32±0,12                            | <b>2,05±0,37</b>                  |
| <i>n</i> -butanol  | 0,51±0,07                             | 0,76±0,00                            | 1,12±0,13                             | 1,90±0,04                             | 2,99±0,05                             | 3,93±0,20                             | 4,27±0,09                            | <b>2,76±0,91</b>                  |
| Standards          | <b>0.0976<math>\mu\text{g}</math></b> | <b>0.195<math>\mu\text{g}</math></b> | <b>0.390 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>0.781 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>1.562 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>3.125 <math>\mu\text{g}</math></b> | <b>6.25 <math>\mu\text{g}</math></b> | $A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )    |
| Trolox             | 0.25±0.01                             | 0.24±0.01                            | 0.26±0.01                             | 0.26±0.00                             | 0.32±0.01                             | 0.38±0.01                             | 0.56±0.02                            | <b>5.21±0.27</b>                  |
| L'acide ascorbique | 0.26±0.01                             | 0.29±0.00                            | 0.29±0.02                             | 0.31±0.01                             | 0.37±0.01                             | 0.50±0.00                             | 0.80±0.00                            | <b>3.08±0.02</b>                  |



**Figure 33 :** Les valeurs des  $A_{0,5}$  du test  $Fe^{2+}$  -phénanthroline.

D'après ces résultats, on peut déduire que les extraits acétate d'éthyle et butanolique présentent la meilleure activité de réduction du fer avec des valeurs d'absorbance  $A_{0,5}$  de  $2,05 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$  et  $2,76 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$  respectivement, supérieure à celle du Trolox et de l'acide ascorbique. L'extrait hydroéthanolique se distingue également par une très forte capacité antioxydante, avec une valeur d'absorbance  $A_{0,5}$  de  $6,04 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ .

➤ **Conclusion :**

En conclusion ces résultats indiquent que les trois extraits acétate d'éthyle, butanolique et hydroéthanolique, ont montré une activité antioxydante très puissante. Il est à noter que l'ordre d'efficacité des extraits étudiés était le même dans les quatre méthodes, ce qui confirme la corrélation entre les méthodes étudiées et la bonne pratique expérimentale.

Nos résultats montrent que l'extrait butanolique qui est le plus riche en polyphénols, présente une activité antioxydante plus faible que celle de l'extrait acétate d'éthyle. On peut expliquer cela par plusieurs facteurs, tels que la structure chimique des polyphénols, notamment le nombre et la position des groupes hydroxyles et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles, glycosyles), qui ont un grand effet sur leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à agir comme antioxydants.

Donc, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant.



---

# Références bibliographiques

---



**Références bibliographiques :**

- [1] Hemissi, R. E. (2021). Extraction D'huiles Fixes Et Essentielles De L'espèce Végétal *Pinpeinella Anisum* En Vue D'une Application Comme Agent Antioxydant, Anti-Enzymatique Et Anti-Cholinesterase, Université Badji Mokhtar Annaba.
- [2] Pietta, P G. (2000). Flavonoids As Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(7), 1035-42.
- [3] Les Plantes Medicinales. (2023). Recupere Sur Index Sante: [Https://Www.Indexsante.Ca/Chroniques/271/Plantes-Medicinales.Php](https://www.indexsante.ca/Chroniques/271/Plantes-Medicinales.Php)
- [4] Futura. (1997, October 06). Recupere Sur Futura-Sciences: [Https://Www.Futura-Sciences.Com](https://www.futura-sciences.com).
- [5] Baatouche, S., Seghiri, R., Benayache, F., Benayache, S. (2013). Les Flavoides Isoles Des Parties Aeriennes De L'espèce *Centaurea Nicaeensis*, Université Freres Mentouri Constantine.
- [6] Beghadid Fatma, B. K. (2021). Etude Phytochimique De Deux Plantes Medicinales De La Region De Saida, Université De Saida Dr Moulay Tahar.
- [7] Famille Des Plantes. (2022, Août 30). Recupere Sur Creapharma.Ch: [Https://Www.Creapharma.Ch/Famille-Phyto.Htm](https://www.creapharma.ch/famille-phyto.htm).
- [8] Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., Kerr, M., Robertson, K. R., Arsenault, M., Dickinson, T. A., Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and Classification of Rosaceae. (Elsevier, Ed.) *Plant Systematics and Evolution*, 266(1), 5-43.
- [9] Rosaceae. (2015, Mars 08). Consulte Le Février 20, 2024, Sur Dictionnaire De L'académie Nationale De Pharmacie: [Https://Dictionnaire.Acadpharm.Org/W/Rosaceae](https://dictionnaire.acadpharm.org/w/rosaceae)
- [10] Garcia-Oliveira, P., Fraga-Corral, M., Pereira, A.G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J. (2020). Scientific Basis for the Industrialization of Traditionally Used Plants of the Rosaceae Family. *Food Chemistry*.
- [11] Les Rosacees, Famille Botanique Des Rosaceae. (S.D.). Consulte Le Février 22, 2024, Sur Boutique Vegetale: [Https://Www.Boutique-Vegetale.Com/C/Classification-Botanique/Famille-Botanique/Rosaceae](https://www.boutique-vegetale.com/c/classification-botanique/famille-botanique/rosaceae).
- [12] Famille Des Rosaceae. (S.D.). Consulte Le Février 22, 2024, Sur Aujardin.Info: [Https://Www.Aujardin.Info/Plantes/Famille-Rosaceae.Php](https://www.ajardin.info/plantes/famille-rosaceae.php).

- [13] Heywood, V. H. (1993). *Flowering Plants of the World* (2e Éd.). Oxford University Press
- [14] Benabderrahmane, W. (2019). *Etude Phytochimique Et Pharmacologique De Crataegus Oxyacantha L. (Rosaceae) Et Cytisus Triflorus L'her. (Fabaceae)*. Université Freres Mentouri Constantine 1.
- [15] Munari, C. (2006) *Vestigation Phytochimique De Plantes Alpines: Etude D'especes Du Genre Oxytropis(Fabaceae) Et Isolement De Composés*. In *Antifongiques*, P. 45
- [16] Rosacees. (S.D.). *Recupere Sur Viagallica: [Https://Viagallica.Com/V/Rosacees.Htm](https://Viagallica.Com/V/Rosacees.Htm)*.
- [17] Reille, M. (2018). *Rosacées*. Consulté Le 03 31, 2024, Sur [Https://Www.Arbres-Lozere.Fr](https://Www.Arbres-Lozere.Fr)
- [18] Pfaf.Org. (S.D.). *Consulte Le 02 27, 2024, Sur Plants For A Future: [Https://Pfaf.Org/User/Databasesearhresult.AspX](https://Pfaf.Org/User/Databasesearhresult.AspX)*.
- [19] *Plantes De La Famille Des Rosacées*. (2024). Récupéré Sur Genialvegetal: [Https://Www.Genialvegetal.Net/](https://Www.Genialvegetal.Net/)
- [20] Boubertakh, H. E. (2020). *Etude Phytochimique Et Evaluation Du Potentiel Antioxydant D'une Espèce Du Genre Linum*, Université Freres Mentouri Constantine 1.
- [21] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales* (Ed. 4 Eme Edition). (Lavoisier, Ed.) Paris.
- [22] Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012). *Terpenoids: Natural Products for Cancer Therapy. Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1801–1818.
- [23] *Ntional Center for Biotechnology Information* (2024). *PubChem Compound Summary for CID 11276107, Cubebol*. Retrieved June, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cubebol>.
- [24] Köksal, M., Jin, Y., Coates, R. M., Croteau, R., Christianson, D.W. (2011). *Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. Nature*, 469(7328),116-120. <http://doi.org/10.1038/nature09628>
- [25] Labbani, Pr. (2021-2022). *Composés Phénoliques [Cours De Biochimie Végétale, Chapitre 4]*. Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie, Université De Médecine (UFMC).
- [26] Baker, D. H. (2022). *An Ethnopharmacological Review on the Therapeutical Properties of Flavonoids and Their Mechanisms of Actions: A Comprehensive Review Based On Up To Date Knowledge*. *Toxicology Reports*, 9, 445–469.
- [27] Panche, A. N. (2016). *Flavonoids: An Overview*. *Journal of Nutritional Science*, 5.

- [28] Hedera, K. (2005). Les Flavonoïdes : Structures, Propriétés Biologiques, Rôles Prophylactiques Et Emplois En Thérapeutique. *Phytothérapie*, 5.
- [29] Shen, N. E. (2022). Plant Flavonoids: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 383.
- [30] Tapas, A. R., Sakarkar, D.M, Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical*, 7(3).
- [31] Abdîn, A. (2013). Evaluation Biologique Et Phytochimique Des Substances Naturelles D'hyptis Atrorubens Poit. (Lamiaceae), Sélectionnée Par Un Cribleage D'extraits De 42 Plantes. *Faculté Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques*, French.
- [32] Harborne, J. B. (2000). Advances in Flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- [33] Brown, D. E. (2001). Flavonoids Act As Negative Regulators Of Auxin Transport In Vivo In Arabidopsis. 126, 524-35.
- [34] Badshah, S.L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B.G., Emwas, A.H., Jaremko, M. (2021). Antiviral Activities Of Flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- [35] Emeraux, E. (2019). Propriétés Biologiques Des Flavonoïdes : Etude Bibliographique Et Evaluation De L'activité Antioxydante. *Sciences Pharmaceutiques*.
- [36] Merzouk, M. E. (2020). Contribution A L'étude Phytochimique Des Plantes Médicinales Algériennes : Le Genre Centaurea. *Mémoire De Master*. Jijel, Université Mohamed Seddik Ben Yahia.
- [37] Fecka, I. K. (2004). Optimization Of the Separation of Flavonoid Glycosides and Rosmarinic Acid from Mentha Piperita on HPTLC Plates .J. *Planar Chromatogr*, Pp. 17-22.
- [38] Mabry, T. M. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. *Journal of Plant Sciences*, 254.
- [39] Antonot, E., Marchal, R. (1998). *Chromatographie (Stage MAFPEN)*. Edition Lycée Louis Vincent, Pp. 26-28
- [40] Harborne, J.B. (1966). In *Comparative Phytochemistry* (Goodwin, T.W., Ed.). Academic Press, London.
- [41] Le Facteur De Retard. (S.D.). Recupere Sur Labster. Consulté Le 04 Juin 2024: <https://theory.labster.com/fr/retardation-factor>.
- [42] Bidet, D., Gagnault, J. C., Girard, P., Trotin, F. (1987). Inflammation, Allergie, Douleur Et Acide Arachidonique : Du Jardin Des Hespérides A La Cascade De L'acide Arachidonique : Les Flavonoïdes. *L'actualité Chimique*. 89 - 97.



- [43] Markham K.R., (1982). *Techniques Of Flavonoids Identification*, Academic Press, London
- [44] Rached,F(2014). *Contributions A L'étude Des Composés Phenolique Des Cereales Et Leur Pouvoir Antioxydant*, Universite Frere Mentouri Constantine 1.
- [45] Harborne, J. B. (1988). *The Flavonoids: Advances In Research Since 1980*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- [46] Harborne, J.B. (1975). *The Flavonoids (Vol. 1)*. (C. A. Hall, Ed.)
- [47] Spectre RMN Du Proton. (S.D.). Mymaxicours. Consulté Le 15 Avril 2024. Recupere Sur Mymaxicours: <https://www.maxicours.com/>
- [48] Agrawal,P.K Et Markham,K.R. (1989). *Carbon-13 Nmr Of Flavonoids*. (Elsevier, Ed.)
- [49] Smith, J. E. (2022). *Quantitative Analysis of Phenolic Compounds In Plant Extracts*. *Journal Of Phytochemistry*, 10(2), 123-135.
- [50] Bendif, H. (2017). *Caracterisation Phytochimique Et Determination Des Activites Biologiques In Vitro Des Extraits Actifs De Quelques Lamiaceae: Ajuga Iva (L.) Schreb., Teucrium Polium*, P. 52.
- [51] Ben Moussa, M.T., Cherif,R.A., Lekhal,S., Bounab,A., HadeF,Y., (2020). *Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydant des extraits méthanoïques de Brocchia cinerea VIS de l'Algérie ( Sud-Est)*, *Algerian journal of pharmacy*.Vol.04 Num.2602-975X.
- [52] Ferdjoui, S. (2020). *Activites Biologiques de Deux Plantes Medicinales Mentharotundifolial. Et Lamium Amplexicaulel*.
- [53] *Antioxydants : Quels Roles Et Quels Bienfaits?* (2022). Recupere Sur Polaar: <https://polaar.com>.
- [54] Nafissa, Z. (2014). *Contribution A L'étude De L'activite Hypoglycemiante Des Extraits De Pistacia Atlantica Desf De La Reserve Nationale D'el-Mergueb (M'sila) - Algerie*. *Biologie Et Ecologie Vegetale*.
- [55] Munteanu, I. G. (2021). *Analytical Methods Used In Determining Antioxidant Activity*. *International Journal Of Molecular Sciences (Int J Mol Sci)*, 22, 3380.
- [56] Dejian Huang, B. O. (2005). *The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays*. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- [57] Kitts, N. L. (2014). *Antioxidant Property Of Coffee Components: Assessment Of Methods That Define Mechanisms Of Action*. *Molecules*, 19, 19180-19208.
- [58] Blois, M. (1958). *Antioxidant Determinations By The Use Of A Stable Free Radical*. *Nature*, 181, 1199-1200.

- [59] Konan, K. V., Le Tien, V., Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-Induced Fast Activation Of The Abts Reagent For An Antioxidant Capacity Assay.
- [60] Ben Moussa, M. Khelil, Kh. Harkat, H. Lakehal, S. Hadeif, Y. (2020). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Brocchia cinerea* VIS. from Algeria. *Batna Journal of Medical Sciences (BJMS)*. 7. 122-128. 10.48087/BJMSoa.2020.7213.
- [61] Mukhopadhyay, D. (2016). A Sensitive In Vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay Using 1, 10-Phenanthroline. *Free Radicals And Antioxidants*, 6, 123-131.
- [62] Singleton, VL et Rossi, JA (1965) Colorimétrie des composés phénoliques totaux avec le réactif acide phosphomolybdique-phosphotungstique. *Journal américain d'œnologie et de viticulture*, 16, 144-158.
- [63] Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. (2010). Antioxidant Capacity And Related Parameters Of Different Fruit Formulations. *Lwt - Food Sci. Technol*, 43, 992-999.
- [64] Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarikürkcü C., Öztürk M., And Ulubelen A. 2007. A New Flavone From Antioxidant Extracts Of *Pistacia Terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.
- [65] 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 Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- [66] Oyaizu, M. (1986). Études Sur Les Produits De Reactions De Brunissement : Activités Antioxydantes Du Produit De Reaction De Brunissement Prépare A Partir De Glucosamine. *Journal Japonais De Nutrition*, 307-315.
- [67] Szydłowska-Czeraniak, A. E. (2008). Determination Of Antioxidant Capacities Of Vegetable Oils By Ferric-Ion Spectrophotometric Methods. *Talanta*, 76, 899-905.
- [68] Familias Urticaceae Y Rosaceae. (2012, Janvier 15). Consulté Le Fevrier 19, 2024, Sur Slideshare: <https://www.slideshare.net/Cristiansanchez10/Familias-Urticaceae-Y-Rosaceae>.
- [69] Mabry, T. M. (1970). The Systematic Identification Of Flavonoids. *Journal Of Plant Sciences*, 254.
- [70] Sun, J., Chen, P., Lin, L.Z., Harnly, J.M. (2011). A Non-Targeted Approach To Chemical Discrimination Between Green Tea Dietary Supplements And Green Tea Leaves By Hplc/Ms. *Journal Of Aoac International*, 94, 103-111.



---

# Conclusion générale

---



## Conclusion générale

Afin de bien exploiter et valoriser la flore algérienne qui recèle un fort potentiel et émerger ses propriétés médicinales qui attirent aujourd'hui l'attention des scientifiques du monde entier, nous avons étudié une plante de la famille des Rosaceae, choisie pour sa concentration significative en flavonoïdes. Dans ce contexte, notre démarche s'est concentrée sur une étude phytochimique visant à isoler et à identifier les flavonoïdes présents dans l'extrait acétate d'éthyle, tout en évaluant le potentiel antioxydant des trois extraits, à savoir l'extrait acétate d'éthyle, butanolique et hydroéthanolique.

Nous avons mis en œuvre une combinaison de techniques chromatographiques, incluant notamment la chromatographie sur colonne (CC) et la chromatographie sur couche mince (CCM). Ce qui nous a permis à l'isolement de trois composés purs désignés les noms de **P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>** et **P<sub>3</sub>**.

Par ailleurs, la caractérisation structurale des flavonoïdes isolés a été réalisée en utilisant des techniques d'analyse spectroscopique, notamment la RMN <sup>1</sup>H et la spectroscopie UV, en prenant en considération le profil chromatographique (R<sub>f</sub>), permettant ainsi l'identification du produit **P<sub>1</sub>** comme étant le **Kaempferol**.

L'étude biologique vise à évaluer les propriétés bioactives des trois extraits hydroéthanolique, acétate d'éthyle et butanolique de la plante étudiée. Cette évaluation inclut une analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes, ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectuée respectivement par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode au nitrate d'aluminium, révélant la présence de quantités significatives de polyphénols totaux et de flavonoïdes dans les extraits acétate, de butanol et hydroéthanolique.

L'activité antioxydante des trois extraits a été évaluée au moyen de quatre méthodes différentes : le piégeage des radicaux DPPH, ABTS et le test du pouvoir réducteur (FRAP) et le teste de la phénanthroline. Les résultats ont révélé une activité antioxydante significative pour les trois extraits selon les quatre méthodes d'évaluation.

Cette étude a mis en évidence l'activité antioxydante remarquable de la plante étudiée, attribuable à sa teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes. Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à de multiples perspectives d'utilisation de cette plante de la famille des Rosaceae et constituent une avancée significative dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Cependant, des études complémentaires telles que l'investigation d'autres métabolites secondaires et activités biologiques sont souhaitables.

# Summary

This research work focuses on the phytochemical investigation of a medicinal plant belonging to the Rosaceae family. It also evaluates the antioxidant activity of the ethyl acetate, butanolic and hydroethanolic extracts along with their polyphenol and flavonoid contents, to better appreciate its biological properties.

This study allowed us to isolate three compounds **P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>** and **P<sub>3</sub>** from the ethyl acetate extract of the plant by CC and TLC chromatographic methods. Compound **P<sub>1</sub>** has been identified as a Kaempferol flavonoid through the use of ultraviolet spectroscopy (UV) and proton nuclear magnetic resonance (RMN<sup>1</sup>H) techniques.

Results indicate that the ethyl acetate, butanolic, and hydroethanolic extracts contain high levels of total polyphenols and flavonoids. Additionally, evaluation of antioxidant activity using four methods (DPPH, ABTS, FRAP, and phenantroline) demonstrates that these extracts possess significant antioxidant potential.

**Keywords:** Rosaceae, flavonoids, DPPH, ABTS, FRAP, phenantroline, polyphenols, flavonoïde.

# Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique d'une plante médicinale de la famille des Rosaceae, et sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus et de sa teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux pour mieux apprécier ses propriétés biologiques.

Cette étude nous a permis d'isoler trois composés **P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>** et **P<sub>3</sub>** à partir de l'extrait acétate d'éthyle de la plante par les méthodes chromatographiques CC et CCM. Le composé **P<sub>1</sub>** a été identifié comme étant un flavonoïde de type **Kaempferol** grâce à l'utilisation des techniques spectroscopiques ultraviolette (UV) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN<sup>1</sup>H).

Les résultats de l'étude ont montré que les extraits acétate d'éthyle, butanolique et hydroéthanolique présentent des niveaux élevés de polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux. De plus, l'évaluation de l'activité antioxydante à travers quatre méthodes (DPPH, ABTS, FRAP et phénonthroline) a révélé un potentiel antioxydant significatif pour ces trois extraits.

**Mots-clés :** Rosaceae, flavonoïdes, DPPH, ABTS, FRAP, phénonthroline, polyphénols, flavonoïdes.

# ملخص

تركز هذا البحث على الدراسة الفيتوكيميائية لنبات طبي من عائلة Rosaceae، بالإضافة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة لثلاثة مستخلصات لهذا النبات (مستخلص خلاص الإيثيل و مستخلص البوتانول و مستخلص الايثانول المائي ) ومحتواها الكلي من البوليفينولات والفلافونويدات لفهم خصائصها البيولوجية بشكل أفضل.

سمحت هذه الدراسة بفصل ثلاثة مركبات  $P_1$  و  $P_2$  و  $P_3$  من مستخلص خلاص الإيثيل و ذلك باستخدام تقنيات كروماتوغرافية مختلفة (CC و CCM). تم تحديد بنية المركب  $P_1$  و الذي هو عبارة عن Kaempferol اعتمادا على الخصائص الكروماتوغرافية و تقنيات التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية (UV) و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ( $RMN^1H$ ).

أظهرت نتائج الدراسة أن مستخلصات أسيتات الإيثيل والبيوتانوليك والهيدروثينوليك تحتوي على مستويات عالية من إجمالي البوليفينول وإجمالي الفلافونويد. بالإضافة إلى ذلك، كشف تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال أربع طرق (DPPH و ABTS و FRAP و phenanthroline) عن إمكانات كبيرة لمضادات الأكسدة لهذه المستخلصات الثلاثة.

**الكلمات المفتاحية:** Rosaceae، DPPH، ABTS، FRAP، phenanthroline، البوليفينولات، فلافونويدات،



Année universitaire : 2023-2024

Présenté par :

**DIFALLAH nouha & BENRABAH soundous**

## **Valorisation d'une espèce de la famille des Rosaceae**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master II en Biochimie Appliquée**

### **Résumé**

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique d'une plante médicinale de la famille des Rosaceae, et sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus et de sa teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux pour mieux apprécier ses propriétés biologiques.

Cette étude nous a permis d'isoler trois composés **P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>** et **P<sub>3</sub>** à partir de l'extrait acétate d'éthyle de la plante par les méthodes chromatographiques CC et CCM. Le composé **P<sub>1</sub>** a été identifié comme étant un flavonoïde de type **Kaempferol** grâce à l'utilisation des techniques spectroscopiques ultraviolette (UV) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN<sup>1</sup>H).

Les résultats ont révélé que les extraits acétate d'éthyle, butanolique et hydroéthanolique contiennent des teneurs élevées de polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux.

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante par quatre méthodes (DPPH, ABTS, FRAP et phénonthroline) ont montré que ces trois extraits possèdent un potentiel antioxydant très considérable.

**Mots-clés:** Rosaceae, flavonoïdes, DPPH, ABTS, FRAP, phénonthroline, polyphénols, flavonoïdes.

**Laboratoires de recherche :** Laboratoire d'Obtention de substances Thérapeutiques (LOST), Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

**Présenté et soutenu par :** *DIFALLAH nouha et BENRABEH soundous*

### **Jury d'évaluation:**

**Présidente:** M<sup>me</sup>. *BENSARI Souheir* MCB. UFM Constantine 1.

**Encadrante :** M<sup>me</sup>. *KHALFALLAH Assia* MCA. CUM-Mila.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup>. *BOUSETLA Ahlem* MCA. UFM Constantine 1.

**Date de soutenance :** 10 /06/2023