



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et santé

Intitulé :

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

Présenté et soutenu par :

Zerdazi Fatima Zohra

Le : 28-06-2017

Rèbbah Maroua

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUSBA. B

MCB. UFM Constantine

Rapporteur : BOUTAGHANE. N

MCA. UFM Constantine

Examineur : TENIOU. S

MAA. UFM Constantine

Année universitaire
2016– 2017



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et santé

Intitulé :

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

Présenté et soutenu par :

Zerdazi Fatima Zohra

Le : 28-06-2017

Rèbbah Maroua

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUSBA. B

MCB. UFM Constantine

Rapporteur : BOUTAGHANE. N

MCA. UFM Constantine

Examineur : TENIOU. S

MAA. UFM Constantine

**Année universitaire
2016– 2017**

Remerciement :

Nous remercions notre bon Dieu qui nous a donné le courage et la volanté de poursuivre nos études, ainsi que nos parents, qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite.

Nous remercions Madame le Professeur « Zahia Kabouche » pour Nous accueillies au sien du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutique, Faculté des sciences Exactes de l'Université de Constantine I et pour nous permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions que soient.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur de mémoire Dr. BOUTAGHANE Naima, pour sa compréhension, sa disponibilité, de savoir faire, ses conseils judicieux, et toute l'aide qu'elle nous a rapporté. Merci de tout cœur.

Nous remercions aussi, Mr «BOUSBA. B» Maître de conférences classe B à l'Université Constantine I, Nous somme honorés par sa présence comme président du jury.

Nous remercions également Mme «TENIOU. S » Maître Assistante classe A à Université Constantine I, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un grand merci à tous les enseignants du département des sciences de la nature et la vie de l'université Constantine I.

Nos vifs et sincères remerciements s'adressent tout particulièrement à notre Université des frères mentouri Constantine I, qui nous a procuré une bonne formation.

Fatima-Zohra et Maroua

Dédicaces

À l'aide de dieu "Allah" tout puissant

Qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail.

Que Je dédie : A ma famille spécialement aux personnes les Plus chères au monde. Mon père MOHAMMED et ma mère RATIBA, qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.

A mes deux chers frères : MOUNIR et RAMZI.

A ma très chère sœur : AMINA et la petite fille : ARIDJ.

A ma grande mère pour sa douceur et sa gentillesse.

A mes oncles et chères tantes et toute ma famille

Chacun Par son nom.

A mon binôme : MAROUA.

A toute mes amies et mes collègues d'études.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de

Loin pour que ce travail soit possible.

FATIMA - ZOÛRA

Dédicaces

À l'aide de dieu "Allah" tout puissant

Qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail.

Que Je dédie : A ma famille spécialement aux personnes les Plus chères au monde. Mon père NADIR et ma mère FAIROUZ, qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.

A mes deux chers frères : ADIB et BOURHEN.

A ma très chère sœur : Hadil.

A mon grand Père Moustafa pour sa douceur et sa gentillesse.

et toute ma famille Chacun Par son nom.

A mon binôme : Fatima.

A toute mes amies et mes collègues d'études.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de

Loïn pour que ce travail soit possible.

MAROUA

Table des matières

❖ Introduction Générale.....	1
<i>Chapitre I : Recherche bibliographique</i>	
I.1.Les Fabaceae	3
I.1.2.Position systématique de la Famille des Fabaceae	4
I.1.3.Caractères botaniques de la famille.....	5
I.1.4.L'intérêt économique et thérapeutique de la famille Fabaceae	6
I.2.Présentation du Genre <i>Genista</i>	7
I.2.1.Description botanique	7
I.2.2.Quelques Activités Biologiques Reconnues	8
I.2.3.Principaux Métabolites Secondaires du Genre <i>Genista</i>	8
<i>Chapitre II : Les Métabolites Secondaires</i>	
II. Composés phénoliques	12
II.1.Définition	12
II.2.Les flavonoïdes	12
II.2.1.Définition	12
II.2.2.classification des flavonoïdes	12
II.2.3.Distribution et localisation	13
II.2.4.la Biosynthèse des flavonoïdes	15
II.3.Les isoflavonoïdes	17
II.3.1.Définition	17
II.3.2.Distribution	18
II.3.3.Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes	19
II. 4.Propriétés des flavonoïdes	20
✚ Propriétés antibactériennes	20
✚ Propriétés anti inflammatoires	20
✚ Propriétés antivirales	20
✚ Propriétés Anti-oxydante	20
✚ Autres propriétés des flavonoïdes	21

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

III.1.Généralités	22
III.2.les Principales cibles biologiques des EOA ?	23
III.3.Les principales sources d'antioxydants	23
III.3.1.Les antioxydants non enzymatiques	24
✚ Acide ascorbique : Vitamine C	24
✚ La vitamine E	24
✚ β -carotène	24
III.3.2.Les antioxydants enzymatiques	24
III.4.Les antioxydants naturels	25
III.5.Rôles des complexes antioxydants	25
III.6.Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante	28

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

IV.1. Matériel et méthodes	30
IV.1.1. Matériel végétal	30
IV.1.1.1. Description de la zone de la récolte	30
IV.1.1.2. Récolte de la plante	30
IV.1.2.1. Matériel Chromatographique	30
IV.1.2.1.1.la Chromatographie liquide sous vide (VLC)	30
IV.1.2.2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)	31
IV.1.2.3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	31
IV.1.3.1.Méthode physico-chimique	31
IV.1.3.1.1.Spectrophotométrie UV-visible	31
IV.1.3.1.2. Spectroscopie de RMN	32
IV.2. Etude d'une plante du Genre <i>Genista</i>	32
IV.2.1 Extraction par macération	32
IV.2.2.Criblage phytochimique par CCM et CLHP	33
IV.2.3.Screening phytochimique par réactions colorées	36
a. Caractérisation des polyphénols	36
b. Caractérisation des flavonoïdes (test de Shibata ou Shinoda test)	36
c. Caractérisation des tanins (test au FeCl_3)	36
d. Caractérisation des alcaloïdes	37
e. Caractérisation des triterpènes (le test de Lieberman-Burchard)	37

f. Caractérisation des saponosides	37
✚ Indice Mousse (IM)	37
IV. 3. Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle du Genre <i>Genista</i>	38
IV.4. Dosage des composés phénoliques	39
✚ Principe de la réaction des polyphénols	39
IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante	40
IV.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH	40
✚ La détermination d'IC ₅₀	41
IV.5.2. Test de Blanchissement de la Bêta-carotène	41
<i>Chapitre V : Résultats et Discussion</i>	
V.1. Criblage phytochimique par CLHP et CCM	42
V.2. Criblage phytochimique par réaction colorées	43
V.3. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle	44
V.4. Détermination structurale du composé	45
V.5. Dosage des polyphénols totaux	48
V.6. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test DPPH	49
✚ Détermination de l'IC ₅₀	50
V.7. Test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène	51
❖ Conclusion Générale	52

Liste des figures

Figure I.1 : Carte de répartition de la famille des <i>Fabaceae</i> d'après Heywood.....	3
Figure I.2 : les caractères botaniques des <i>Fabaceae</i>	6
Figure I.3 : Les différentes parties de <i>Genista scoparia</i>	7
Figure II.1: Squelette de base des flavonoïdes.....	12
Figure II.2 : Principaux types de flavonoïdes.....	13
Figure II.3 : Biogénèse de la chalcone.....	15
Figure II.4: Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.....	16
Figure II.5 : Principaux types d'isoflavonoïdes.....	18
Figure II.6 : Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes et leur conversion.....	19
Figure III.1: les radicaux libres et les antioxydants.....	22
Figure III.2 : Systèmes Antioxydants d'Enzymes.....	25
Figure III.3: Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies.....	27
Figure IV.1 : El Aouana wilaya de Jijel.....	30
Figure IV.2: évaporation de solution hydroalcoolique.....	32
Figure IV.3: Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Genista</i>	33
Figure IV.4: le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Genista</i> (1) après révélation par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %, (2) sous la lumière UV 365 nm.....	34
Figure IV.5: Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 40% à 90% MeCN/H ₂ O) de la fraction acétate éthyle des parties aériennes de <i>Genista</i>	35
Figure IV.6: VLC sur C ₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de <i>Genista</i>	38
Figure IV.7: Mécanisme de la réaction de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.....	40
Figure V.1: Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 40% à 90% MeCN/H ₂ O) de la fraction acétate éthyle des parties aériennes de <i>Genista</i>	42
Figure V.2: le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Genista</i> (1) après révélation par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %, (2) sous la lumière UV 365 nm.....	43
Figure V.3 : Les fractions de la VLC sur C ₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de <i>Genista</i> . (1) après révélation Par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %, (2) sous la lumière UV 254 nm.....	45

Figure V.4 : la Série spectrale UV du composé P1.....	46
Figure V.5 : Spectres de RMN ¹ H composé 1, (1) spectre normale, (2) spectre avec agrandissement de la zone entre 6 et 8 ppm.....	47
Figure V.6 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois essais).....	48
Figure V.7 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle.....	49
Figure V.8 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle.....	50

Liste des tableaux

Tableau I.1: Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique.....	4
Tableau I.2 : Les métabolites secondaires isolé à partir des plantes de genre <i>Genista</i>	9
Tableau II.1 : la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.....	14
Tableau III.1 : Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	28
Tableau IV.1 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait acétate d'éthyle pour la mesure de l'indice de mousse.....	37
Tableau IV.2 : Les fractions de la VLC sur C ₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de <i>Genista</i>	39
Tableau V.1 : Résultats du criblage phytochimiques.....	43

Liste des abréviations :

Å	:	Angstrom
ACN	:	Acétonitrile
AcOEt	:	Acétate d'éthyle
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ATP	:	Adénosine-TriphosPhat
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
CD₃OD	:	méthanol deutéré
CH₃OH	:	Méthanol
Cm	:	Centimètre
C18	:	Silice greffée
DPPH	:	2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.
EAG	:	Equivalent d'acide gallique
EOA	:	Espec oxygeneé activeé
FeCl₃	:	Chlorure de fer
H₂O	:	Eau
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
HO[•]	:	Hydroxyle
HO₂[•]	:	Hydrurodioxugéne
HPLC	:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
Hz	:	Hertz
IC50	:	Concentration Inhibitrice à 50%
IM	:	Indice de mousse
L	:	Litre
LOST	:	Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutique
MeOH	:	Méthanol
mg	:	Milligramme
mg /ml	:	Milligramme/ Millilitre
min	:	Minute
ml	:	millilitre
NaOAc	:	acétate de sodium
NaOH	:	Hydroxyde de sodium
nm	:	nanomètre
O₂	:	Oxygène singulet
ppm	:	parties par million
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
RO₂[•]	:	Cyclohexyl-peroxy
ROOH	:	Hydroperoxyde de cyclohexyle
ROS	:	Espèces Réactives de l'Oxygène
UV	:	Ultra-Violet
Vit	:	Vitamine
VLC	:	Chromatographie liquide sous vide
V/V	:	Volume par Volume
%	:	Pourcentage

Introduction Générale

Introduction Générale

❖ Introduction générale :

Etant donné l'intérêt immense que suscite actuellement l'emploi des plantes médicinales à travers le monde pour combattre diverses maladies ou préserver la santé de l'être humain, la connaissance de la composition chimique de ces plantes et la détermination de leurs activités biologiques revêtent une importance capitale car leurs propriétés médicinales sont sûrement dues aux substances chimiques qu'elles renferment.

En Afrique, l'utilisation des plantes médicinales est restée depuis des siècles le système de santé le moins cher et par conséquent le plus accessible. Ces plantes contribuent de façon significative à la vie des populations rurales et à l'équilibre sociétal en Afrique, particulièrement parmi les franges de la société les plus démunies [1,2]. Il est à signaler que certaines plantes médicinales sont extrêmement efficaces, mais si dangereuses qu'elles ne doivent être administrées que par des connaisseurs de la médecine traditionnelle. D'autre part, la perte des savoirs autochtones autour des plantes médicinales s'accélère du fait des transformations socio-culturelles des sociétés, ainsi que de la disparition progressive des personnes âgées qui traditionnellement sont les gardiens de ces connaissances. Cette situation rend nécessaire de valoriser les savoirs traditionnels des guérisseurs concernant l'usage des plantes médicinales et d'explorer davantage la possibilité de les intégrer dans les systèmes médicaux modernes.

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [3]. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles.

Le présent travail, rentrant dans le cadre du programme de recherche de laboratoire (LOST) destiné à la valorisation de la flore Algérienne, s'inscrit donc dans cette logique qui consiste en la découverte de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique du Genre *Genista*, appartenant à la famille des Légumineuses (Fabaceae), sous famille de Papilionaceae (Faboideae). le Genre *Genista* a fait l'objet récemment d'une seule étude chimique.

Celle ci réalisée sur l'extrait butanolique des parties aériennes, a conduit à l'isolement et la caractérisation de flavonoïdes et de saponosides [4].

Introduction Générale

De ce fait, notre travail relatif à l'investigation phytochimique de cette Genre, a porté sur l'extrait acétate d'éthyle. Il nous a permis l'isolement et l'identification d'un isoflavonoïde ainsi que l'évaluation de l'activité anti oxydante et le dosage polyphénolique.

Notre travail réparti en cinq chapitres sera présenté comme suit :

- ✚ Le premier chapitre est consacré à un rappel bibliographique comprenant une description botanique de la famille, et du Genre de notre plante.
- ✚ Le deuxième chapitre est consacré à une étude des flavonoïdes et saponosides.
- ✚ Le troisième chapitre présente les différents antioxydants, leurs classifications et leurs modes d'action.
- ✚ Le quatrième chapitre englobe la partie expérimentale de cette investigation phytochimique. Il est décrit d'une façon détaillée l'extraction de la partie aérienne de la plante du *Genista*, à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités, antioxydante
- ✚ Les résultats obtenus seront présentés dans le cinquième chapitre.

Chapitre I :
Recherche bibliographique

Chapitre I : Recherche bibliographique

I.1. Les Fabaceae:

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 18500 espèces classées en 720 –750 Genres [5]. Ses plantes ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (**Figure I.1**) [6]. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées [7] Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considéré comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuse *Rhizobium* permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme [8]. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie [8].



Figure I.1 : Carte de répartition de la famille des *Fabaceae* d'après Heywood [6].

Chapitre I : Recherche bibliographique

I.1.2. Position systématique de la Famille des Fabaceae :

La famille Fabaceae est une famille de plantes dicotylédones. Pendant longtemps, elles ont porté le nom de Papilionaceae à cause de la forme particulière de leurs fleurs. De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et huiles végétales [9] et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète.

La classification actuelle des angiospermes place les Fabaceae dans l'ordre de Fabales et reconnaît trois sous-familles : Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae. Les plantes Faboideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre, alors que les plantes Mimosoideae et Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique APG (Angiosperm Phylogeny Group), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques. La position systématique des Fabaceae est présentée au (Tableau I.1) suivant.

Tableau I.1: Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique ou morphologique [9].

	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APGIII (2009)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytae	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae	-	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae
Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Eurosidae I (= Fabidées)
Sous-ordre	Leguminosineae	-	Fabineae	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae (=Papilionaceae) Mimosaceae Caesalpinaceae	Fabaceae	Fabaceae (= Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae		Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae Swartzioideae	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae

I.1.3. Caractères botaniques de la famille :

Il s'agit de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*).

Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques. La longueur des poils est variable et les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Elles sont entières à parfois dentées-serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Ces plantes sont constituées de renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines. Les inflorescences sont presque toujours indéterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement au nombre de 5, libres ou soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différant par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs étant souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10, abritées dans le périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes. Les grains de pollen sont tricolporés, tricolpés, ou triporés, généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle est souvent unique, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore. L'ovaire est supère, à placentation pariétale. Il n'y a qu'un style, incliné vers l'avant, parfois velu. L'unique stigmate est réduit. Les ovules (de 1 à nombreux par carpelle) sont disposés sur 2 rangs le long d'un placenta supérieur, souvent campylotropes. Le fruit est généralement une gousse, parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscence, un akène, une drupe ou une baie. La graine est à spermoderme souvent induré, parfois arillé et parfois munis, à l'extérieur d'une ligne en U. L'embryon est généralement courbe et l'albumen souvent absent (**Figure I.2**) [10].

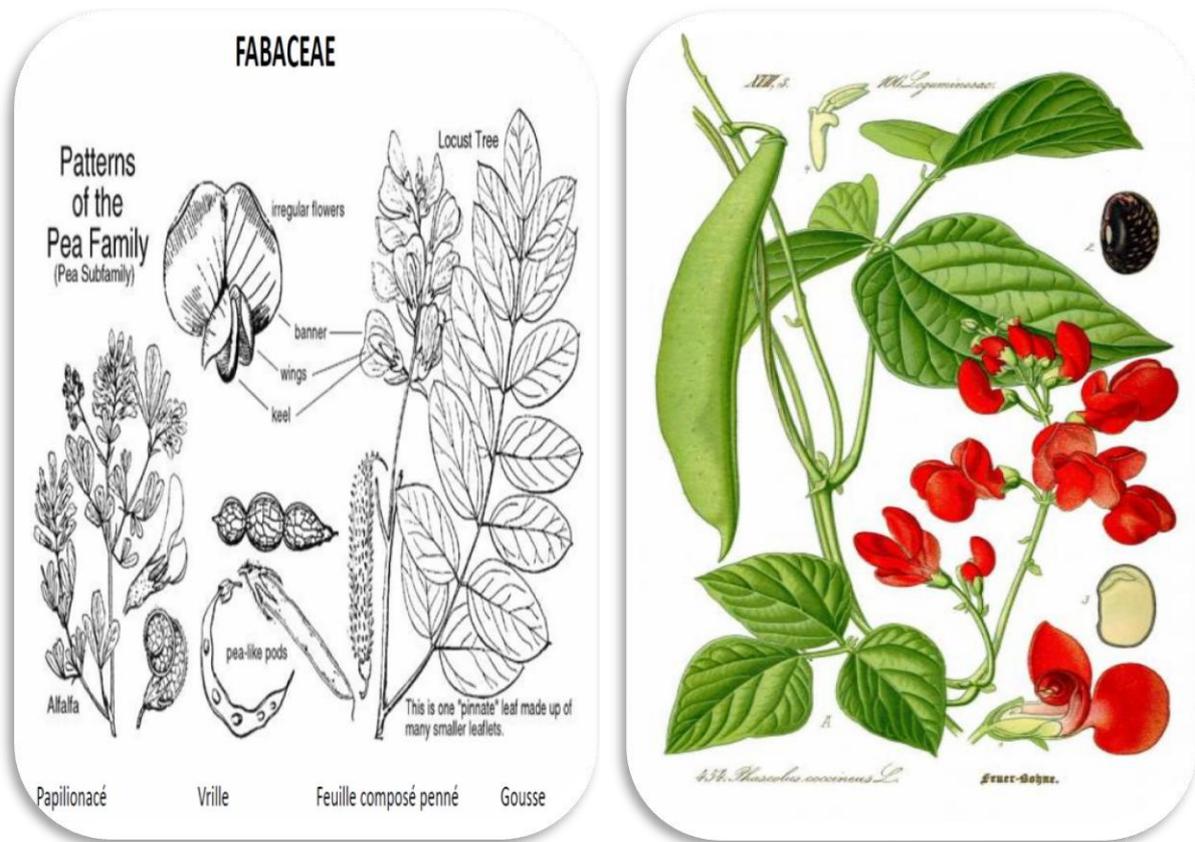


Figure I.2 : les caractères botaniques des fabaceae [11,12].

I.1.4.L'intérêt économique et thérapeutique de la famille des Fabaceae:

Une grande quantité de graines de diverses espèces herbacées de la sous-famille Faboideae, communément appelées légumes secs, sont une source alimentaire universelle autant humaine qu'animale. Ces plantes alimentaires de grande consommation comprennent entre autres *Arachis hypogaea* L., *Cajanus cajan* L., *Cicer arietinum* L., *Dolichos lablab* L., *Glycine max* Merr, *Glycyrrhiza glabra* L. Les jeunes feuilles fermentées et séchées de *Aspalathus linearis* sont utilisées comme une alternative au thé, particulièrement en Afrique du Sud. La consommation de ce thé s'étend actuellement, même en Europe, d'autant plus qu'on leur prête des vertus antioxydantes [13]. Certaines plantes Faboideae font l'objet d'un usage ornemental. Les Genres les plus connus sont : *Cytisus*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Lupinus*, *Wisteria* et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes comme *Genista tinctoria* L. [14]. De nombreuses plantes Faboideae ont joué un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique, notamment comme source de matière première à l'image de la lécithine de *Glycine max* Merr., présente dans toutes les cellules vivantes et qui est un constituant important des cellules nerveuses et cérébrales. Plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses

Chapitre I : Recherche bibliographique

plantes Faboideae. On citera la spartéine, cet alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolé de *Cytisus scoparius* (L.) Link ou la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolé de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigma venenosum* Balf. Cette dernière qui est un inhibiteur réversible des cholinestérases, est utilisée comme antidote lors de l'intoxication par les parasympholytiques. Elle est aussi testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [15].

I.2.Présentation du Genre *Genista* :

Le Genre *Genista* dont le nom paraît dériver de l'ancien mot Gaulois Gen, qui signifie arbuste, a toujours trouvé une place dans les méthodes de botanique, quoique les espèces qui le composent aient subi pour la plupart, différentes mutations occasionnées pas l'incertitude des caractères assignés à ce Genre, incertitude que Linné n'a pu parvenir à fixer, et qui subsiste encore malgré les efforts constants de quelques célèbres monographes. On compte environ 150 espèces de Genêts, et presque tous les points du globe ont fourni leur contingent à ce Genre, néanmoins le plus considérable est celui de la région méditerranéenne.

I.2.1. Description botanique :

Genista est d'une façon générale un arbuste à calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, plus rarement le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit, les 10 étamines sont monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscente, variable. Les arbrisseaux sont épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Les feuilles sont composées de 1 à 3 paires de folioles stipulées ou non [3].



Figure I.3 : Les différentes parties de *Genista scoparia* [16].

I.2.2. Quelques Activités Biologiques Reconnues :

Une étude biologique effectuée sur la plante *Genista tenera* a révélé que les extraits butanolique des parties aériennes de cette espèce présente une activité anti-hyper glycémiant remarquable, une étude complète des extraits d'acétate d'éthyle, éther diéthylique, butanolique et d'eau a été réalisé dans la mesure de tester l'activité antioxydante, anti-cholinestérase et la cytotoxicité [17].

L'extrait butanolique de la plante a montré une activité anti-hyperglycémiant importante réduisant significativement les niveaux de glucose dans le sang à des valeurs normales après 15 jours de traitement des rats Wistar diabétiques induit par des doses élevées de la streptozotocin. La meilleure activité de piégeage des radicaux libres a été observé pour l'extrait d'acétate d'éthyle a des concentrations variant entre [48,7 % à 139,1 g / ml]. L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté également la plus importante activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (77,0% à 70,0 g/ml), cependant les tests de toxicité in vitro n'ont montré aucune preuve de cytotoxicité aiguë ou génotoxicité.

Une autre étude a relevé que l'extrait flavonoïque de l'espèce *Genista tinctoria* provoque une augmentation de la thyroxine chez les rats sains et garde un niveau normal chez les rats hypothyroïdiens [18].

L'activité ulcéroprotective a été testée pour plusieurs flavonoïdes isolés à partir de *Genista rumelica* chez des rats Wistar atteint d'un ulcère gastrique, cette étude a permis la démonstration d'une activité ulcéroprotective avec une faible toxicité pour une durée de traitement inférieure à 3 mois [19].

Une étude récente recommande fortement le 8- β -D-glucopyranosylgenistein comme une entité moléculaire promotrice d'investigation dans les troubles amyloïdiques associée à la maladie d'Alzheimer et au diabète [20].

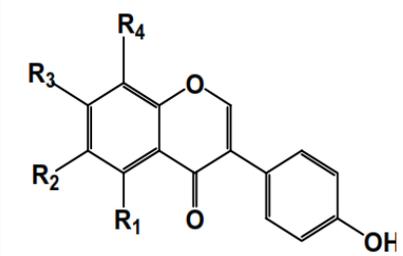
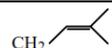
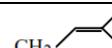
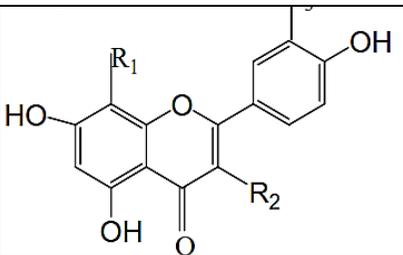
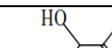
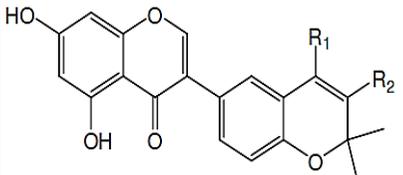
I.2.3. Principaux Métabolites Secondaires du Genre Genista:

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du Genre *Genista*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les alcaloïdes [21], les flavonoïdes, et les isoflavonoïdes qui sont biologiquement actifs [22, 23, 24, 25, 26].

Le **Tableau I.2** présente le contenu en alcaloïdes, flavonoïdes, isoflavonoïdes, et saponosides ainsi que leurs structures respectives de certaines espèces du Genre *Genista*.

Chapitre I : Recherche bibliographique

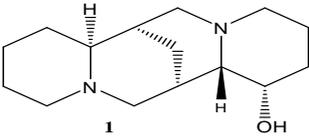
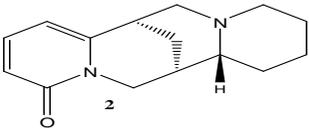
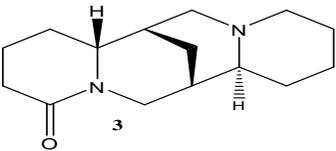
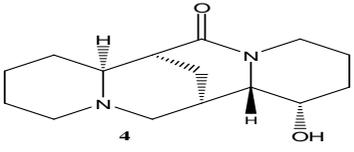
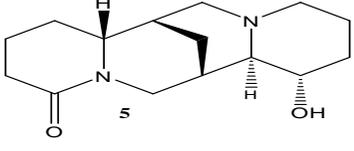
Tableau I.2 : Les métabolites secondaires isolé à partir des plantes de Genre *Genista*.

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	Structure de base	R1	R2	R3	R4	Références
Flavonoïdes et isoflavonoïdes							
<i>G. ephedroides</i>	Génistéine		OH	H	OH	H	[22]
	Isoprunétine		OCH ₃	H	OH	H	
	Wighteone		OH		OH	H	
	Génistine		OH	H	Oglc	H	
	Génisteone		OH		Oglc	H	
	8-C-glucoside génistéine		OH	H	OH	glc	
	Apigénine		H	H	H		
	Ephedroïdine			H	H		
	Isokaempféride		H	OCH ₃	OH		
<i>G. corcica</i>	Isoderrone		H	H			[23]
	Ficuisoflavone		H	OH			
	Dihydroisoderrondiol		OH	OH			

Chapitre I : Recherche bibliographique

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

Chapitre I : Recherche bibliographique

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	Structure de base	Références
Alcaloïdes			
<i>G. ephedroides</i>	Retamine (1)	 <p style="text-align: center;">1</p>	[28]
	Anagryne (2)	 <p style="text-align: center;">2</p>	
	Lupanine (3)	 <p style="text-align: center;">3</p>	
	17-oxoretamine (4)	 <p style="text-align: center;">4</p>	
	12- α -hydroxylupanine (5)	 <p style="text-align: center;">5</p>	

Chapitre II :
Les Métabolites Secondaires

II. Composés phénoliques :

II.1.Définition :

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille. Le terme «polyphénols» ou «composés phénoliques» regroupe un vaste ensemble de molécules divisé en une dizaine de classes chimiques, selon le nombre d'unités phénoliques présentes. Elles présentent un point commun: la présence dans leur structure d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [29].

Ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones.[30] Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

II.2. Les flavonoïdes :

II.2.1.Définition :

Les flavonoïdes forment le groupe le plus répandu de métabolites secondaires des plantes dont l'on aurait à l'heure actuelle recensé près de 9000 représentants différents et leur nombre ne cesse d'accroître. Ils se caractérisent par un enchaînement Ar-C3-Ar d'une structure générale en 15 carbones possédant deux cycles benzéniques nommés cycle A et cycle B ; cependant le cycle central C est formé par le chaînon propyle C3 (**Figure II.1**). Cet enchaînement est de type 1,3-diarylpropane pour les flavonoïdes, 1,2-diarylpropane pour les isoflavonoïdes [31].

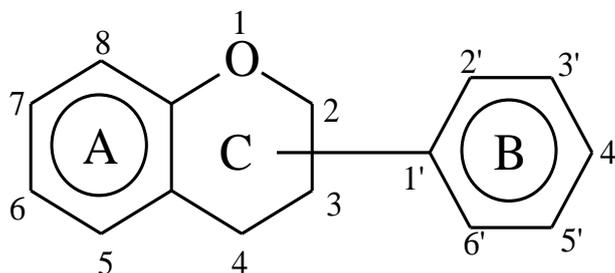


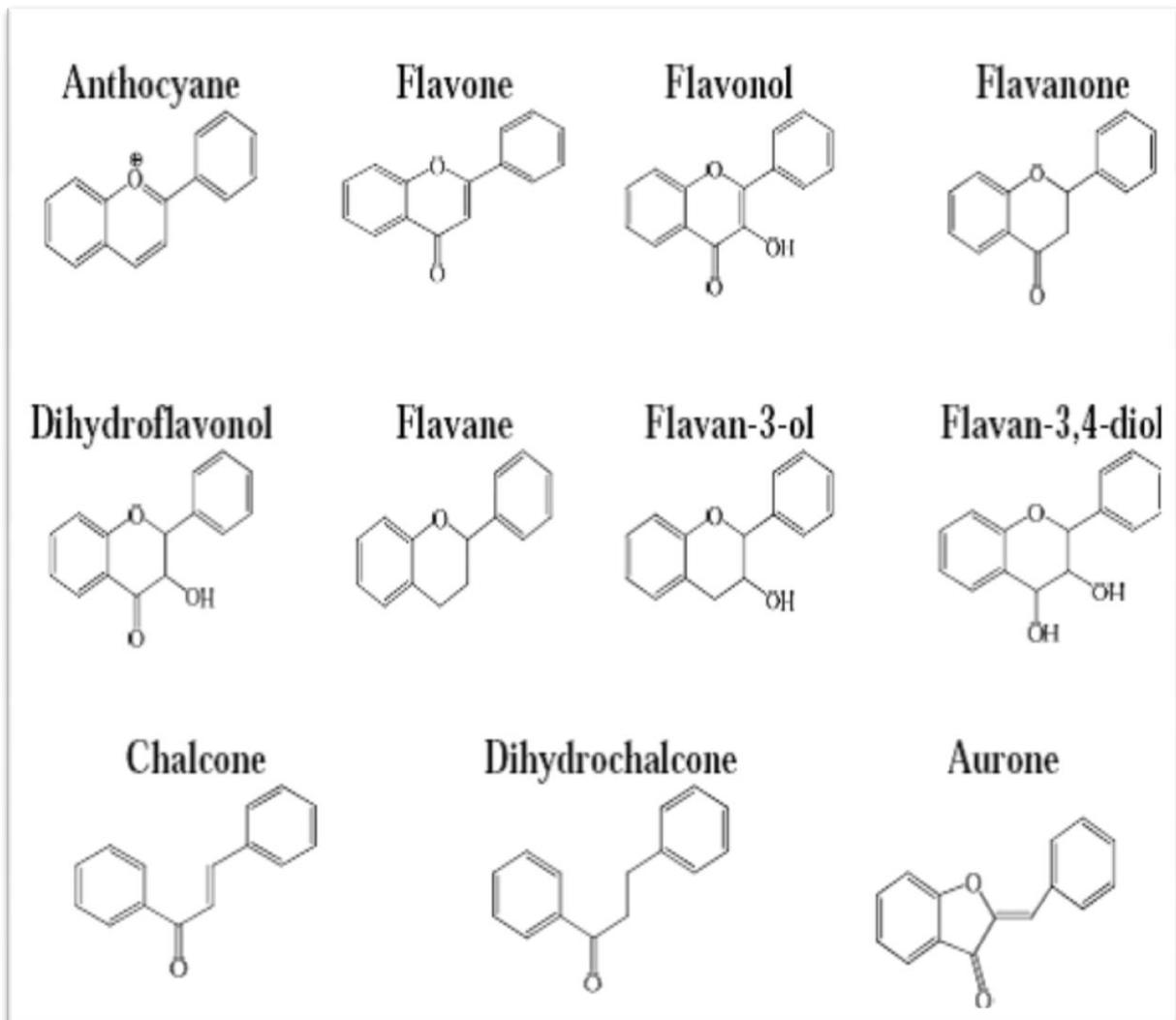
Figure II.1: Squelette de base des flavonoïdes.

II.2.2. classification des flavonoïdes:

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité structurale selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central lequel peut être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). Les plus importants sont donnés ci-après (**Figure II.2**) [32] :

Les Métabolites Secondaires

- ❖ 2-phénylbenzopyriliums : comme les anthocyanes
- ❖ 2-phénylchromones : flavones, flavonols et leurs dimères ou flavanones et dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogénés).
- ❖ 2-phénylchromanes : flavanes, flavan-3-ols et flavane-3,4-diols.
- ❖ Chalcones et dihydrochalcones (le cycle pyranique est ouvert).
- ❖ 2-benzylidène-coumaranones (aurones).



II.2.3. Distribution et localisation :

Ils sont les métabolites secondaires les plus abondants parmi tous les composés polyphénols et possèdent une large répartition dans le monde végétal avec une diversité structurale maximale chez les Angiospermes [31].

De nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Tableau II.1) [33, 34, 35].

Les Métabolites Secondaires

Le Tableau II.1 : la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes [33, 34,35].

<i>flavonoïdes</i>	<i>aliment</i>
<i>flavonols</i>	
kaempférol	Radis, brocoli, thé noir
quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
myricétine	Canneberge, vin rouge
Quercétine-3-glucoside	oignon
Quercétine-3-rhamnoglucoside (rutine)	Thé noir
<i>flavones</i>	
chrysin	Peau des fruits
apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	Persil, céleri
Lutéoline-7-apiosylglucoside	Poivron rouge
<i>flavonones</i>	
naringénine	Fruits des genres <i>citrus</i>
Hesperitine-7-rhamnoglucoside (hesperidine)	Jus d'orange
Naringénine-7-rhamnoglucoside (narirutine)	Jus d'orange
Naringénine-7-rhamnoglucoside (narirutine)	Jus d'orange
<i>Flavan-3-ols</i>	
épicatéchine	Thé vert, thé noir
catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
épigallocatechine	Vin rouge
<i>Anthocyanidol</i>	
cyanidol	Cassis, myrtille
malvidol	Raisin, fraise, cassis
apigénidol	Framboise, fraise
<i>isoflavones</i>	
Genistéine-7-glucoside	soja
Daidzéine-7-glucoside	soja

Les Métabolites Secondaires

II.2.4.la Biosynthèse des flavonoïdes :

Au plan biosynthétique, les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune, ils résultent de la condensation de 3 unités de malonyl-CoA en formant le noyau A, et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase (CHS), enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes, qui conduit à un précurseur appelé la chalcone (**Figure II.3**).

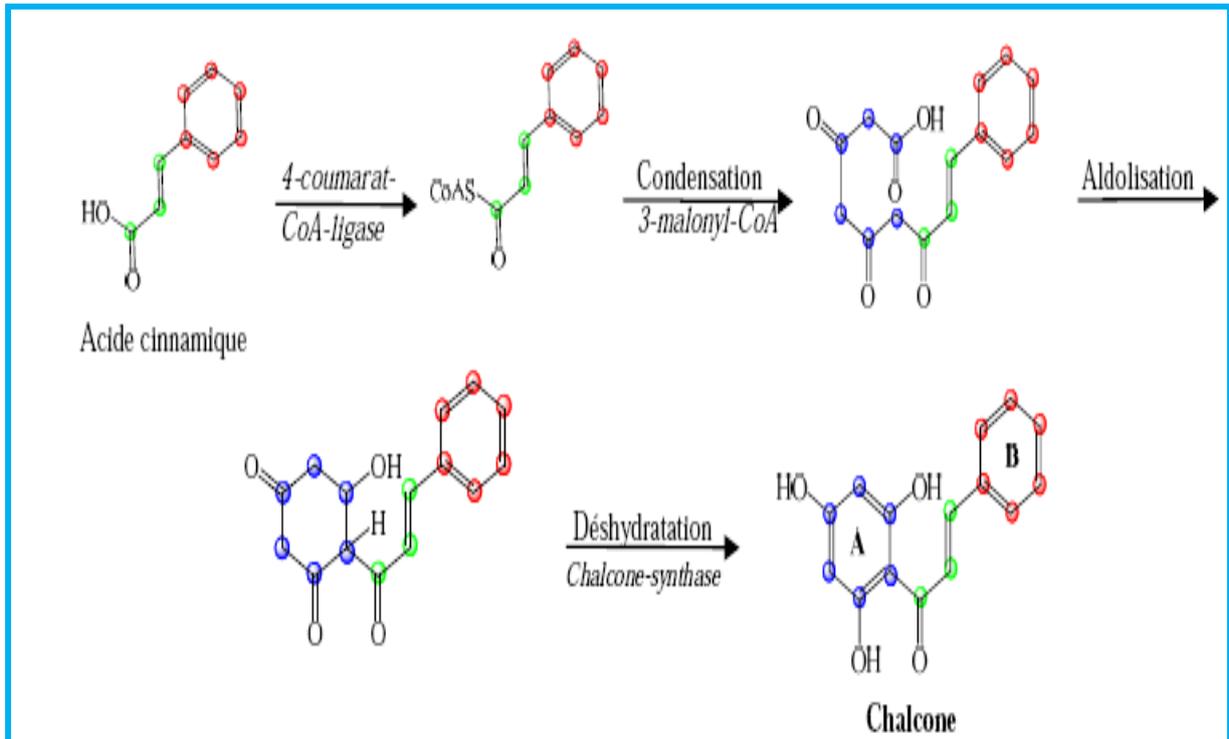


Figure II.3 : Biogénèse de la chalcone [36].

Ainsi, les différentes classes des flavonoïdes sont issues de la chalcone qui subit ultérieurement des réactions catalysées par plusieurs types d'enzymes (**Figure II.4**) [36].

Les Métabolites Secondaires

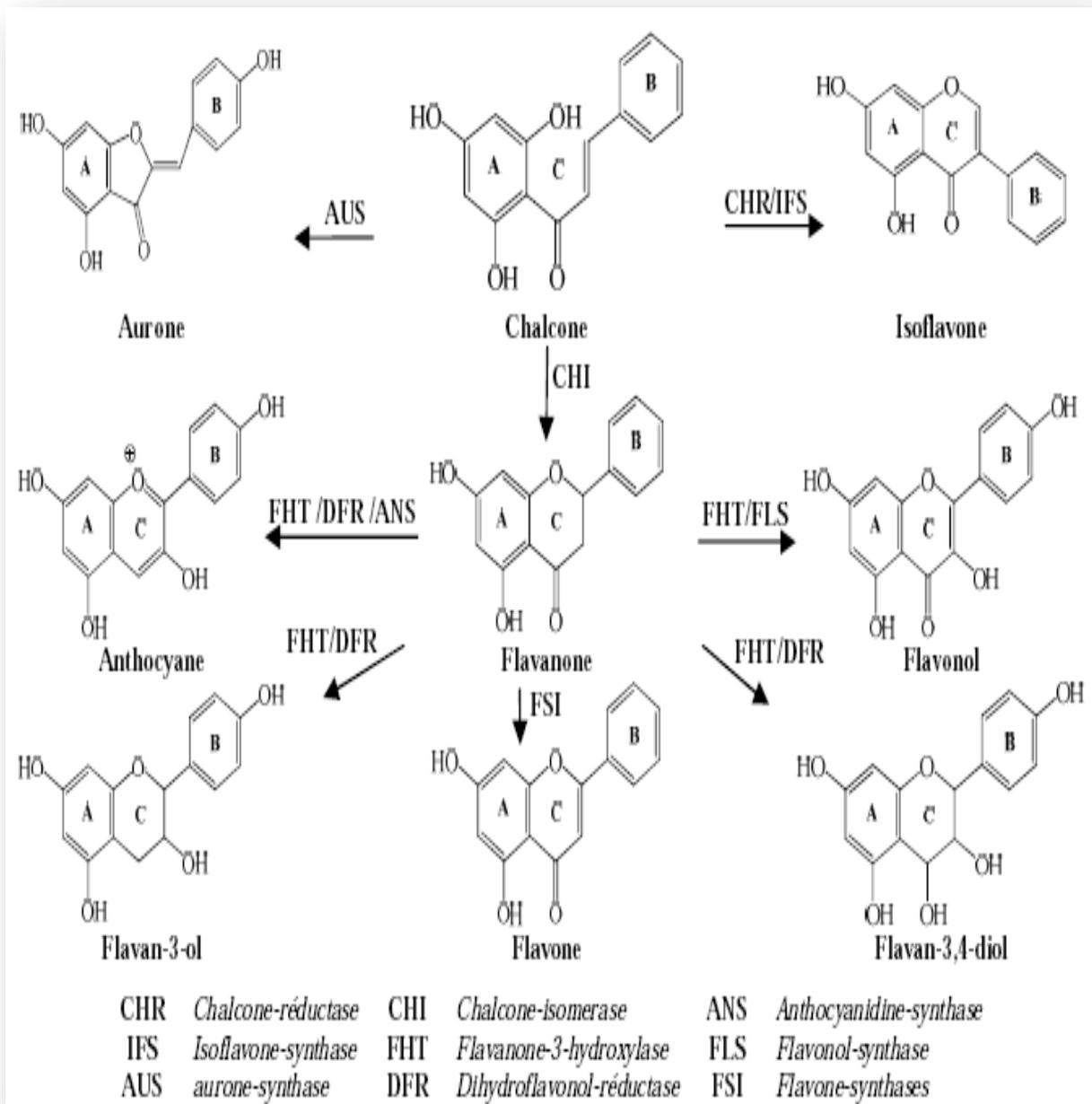


Figure II.4: Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes [36].

II.3. Les isoflavonoïdes:

II.3.1. Définition :

Les isoflavonoïdes représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2-diphénylpropane (**1-3**) (**Figure II.5**). Ils ont une distribution très limitée dans le royaume des plantes et ils sont restreints à la sous famille Papilionoïdée des légumineuses. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) en 3-phénylchromone (isoflavone) [37].

Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes. Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires.

Dans chaque catégorie, on note également la présence fréquente de dérivés prénylés, c'est-à-dire munis d'un radical prényle. Le terme « prénylé » au sens large désigne ainsi le substituant prényle et ou isopentényle, les dérivés furano et diméthylpyrano ou encore le substituant géranyle ou autre.

Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les isoflavones glycosylées (*O*-glycosylées et exceptionnellement *C*-glycosylées) existent mais sont plus rares. Certains isoflavonoïdes possèdent un cycle supplémentaire résultant de la cyclisation du dérivé 2'-hydroxylé. Les ptérocarpanes (**4**) et leurs dérivés ainsi que les coumaronochromones (**5**) en font partie. D'autres ont une structure de type coumarinique induite par l'oxydation d'une isoflavone. C'est le cas par exemple des coumestanes (**6**) et de leurs dérivés. Un dernier groupe d'isoflavonoïdes possède non seulement un cycle, mais en plus un carbone supplémentaire. C'est le cas des roténoïdes (**7**) qui proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone (**8**) (**Figure II.5**).

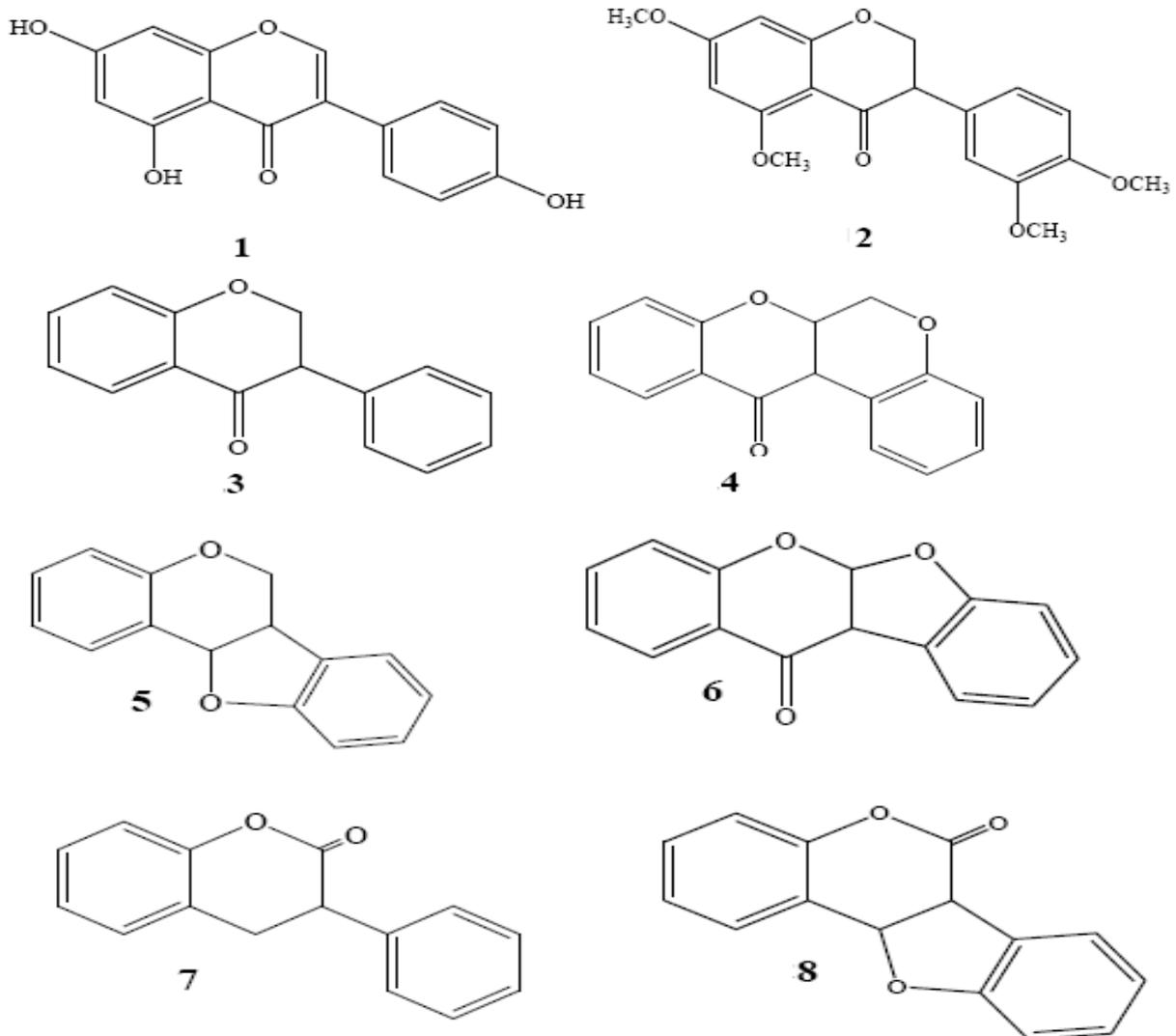


Figure II.5 : Principaux types d'isoflavonoïdes [37].

II.3.2. Distribution:

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones, sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce, les graines et quelquefois dans les feuilles et fleurs [37]. Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont presque exclusivement présents chez les Légumineuses. En effet, 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille [37]. Il apparaît néanmoins qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes appartenant à 59 autres familles [38]. Comme chez les Légumineuses, la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones [39].

Les Métabolites Secondaires

II.3.3. Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes:

Figure II.6 représente la biosynthèse de grandes classes des isoflavonoïdes et des leurs conversions.

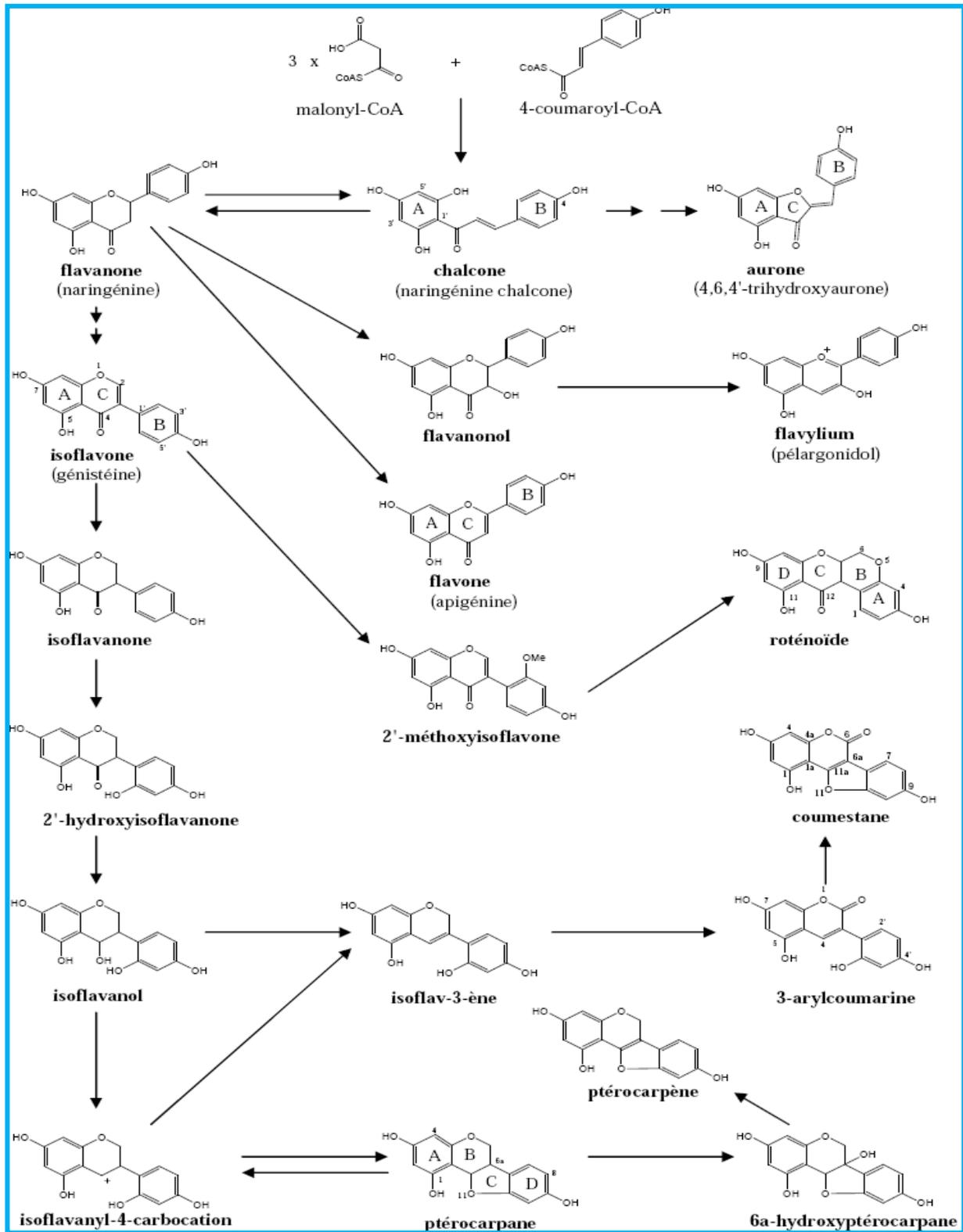


Figure II.6 : Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes et leur conversion.

II. 4. Propriétés des flavonoïdes :

+ Propriétés antibactériennes :

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [40].

+ Propriétés anti inflammatoires :

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [41] d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine [42].

+ Propriétés antivirales :

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 intégrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 [43]. Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 [44].

+ Propriétés Anti-oxydante :

Des flavonoïdes Puissants antioxydants, les flavonoïdes ont la capacité de piéger les radicaux libres (hydroxy, anion superoxyde et des radicaux peroxy lipidiques), générés par notre organisme en réponse aux agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.) et qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires. Les études in vivo du Dr Blumberg suggèrent que les flavonoïdes interrompent le passage du stress oxydatif et interceptent le "message" de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

Les Métabolites Secondaires

Autres propriétés des flavonoïdes :

- ❖ Protection des plantes contre les radiations UV.
- ❖ Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- ❖ Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- ❖ Régulation de l'élongation des tiges.
- ❖ Interviennent dans la maturité des fruits.
- ❖ Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores [45 ,46 ,47].

Chapitre III :
Les antioxydants
et les activités Biologiques

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

III.1.Généralités :

Radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), stress oxydant et antioxydants, deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels et même pour le grand public.

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles ROOH, le radical superoxyde O_2 , les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxydes RO. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines.

Par définition, les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réappairier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules.

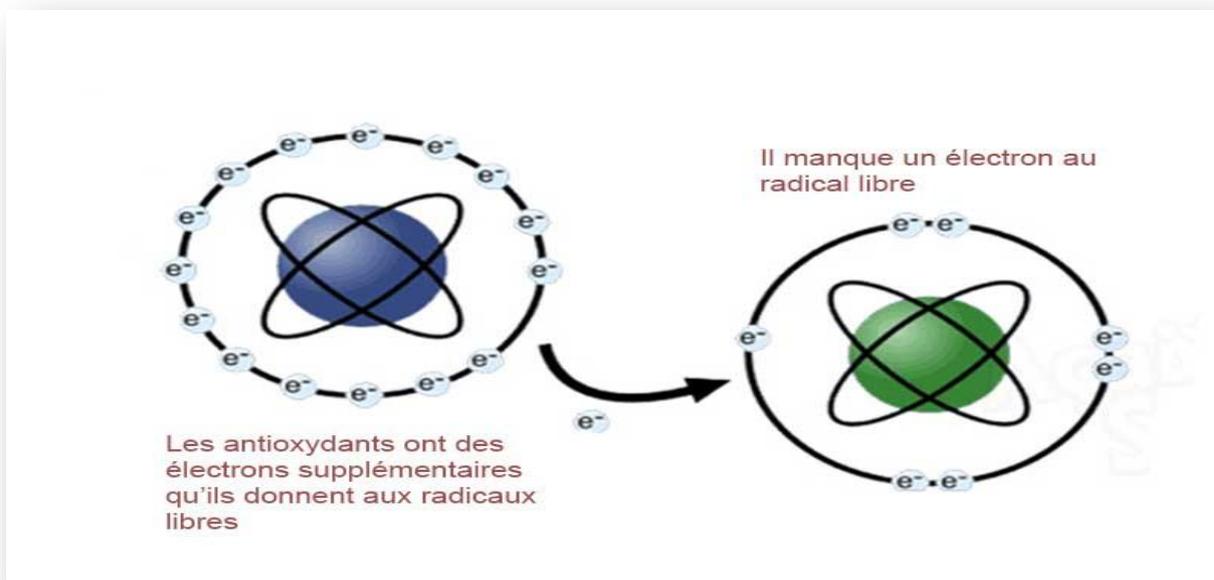


Figure III.1: les radicaux libres et les antioxydants [48].

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

Les radicaux libres sont considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène, incluent des ERO comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit au cours du métabolisme mitochondrial, le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) qui réagit avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose, c'est un dérivé de l'anion superoxyde, le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}), le radical peroxyde (RO_2^{\cdot}), le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène, sont non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'Ozone (O_3), l'oxygène singulet (O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$). Ces composés ne sont pas réactifs mais peuvent être des précurseurs de radicaux [49].

Par ailleurs, tous les radicaux libres ne sont pas des dérivés de l'oxygène, les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ERO. Ils peuvent, à leur tour, réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons par exemple, les acides gras peroxydés qui sont le résultat de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

III.2.les Principales cibles biologiques des EOA ? :

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques comme l'oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxiques et mutagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une autre vague d'attaque chimique [49].

III.3.Les principales sources d'antioxydants :

Une molécule antioxydante est toute substance présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, qui est capable de retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO [50,51].

Bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et filières très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique [52]. Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

III.3.1. Les antioxydants non enzymatiques :

Comme les vitamines E (α -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

Acide ascorbique : Vitamine C

La vit C contient une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. La forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase. On trouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E.

La vitamine E

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes.

β -carotène

Parmi les photo-protecteurs actifs, le β -carotène apparaît comme un piègeur efficace. Sa constitution polyénique lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une oléfine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydroperoxydes (insertion d'oxygène dans toutes liaisons C-H conjuguées d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leur tour. Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye.

III.3.2. Les antioxydants enzymatiques :

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Ces enzymes comprennent :

- ❖ superoxyde dismutase
- ❖ le glutathion peroxyde
- ❖ réductase de glutathion
- ❖ catalases

Celles-ci forment les mécanismes de défense endogènes du fuselage pour aider à se protéger contre les dégâts radical-induits libres de cellules. Les enzymes antioxydantes-

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

glutathione Peroxidase, catalase, et superoxyde dismutase métabolisent les clichés intermédiaires toxiques oxydants.

Ces enzymes exigent également des cofacteurs tels que le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc, et le manganèse pour l'activité catalytique optima. On lui a suggéré qu'une consommation diététique inadéquate de ces minerais de trace puisse compromettre l'efficacité de ces mécanismes de défense antioxydants. La consommation et l'absorption de ces minerais importants de trace peuvent diminuer avec le vieillissement.

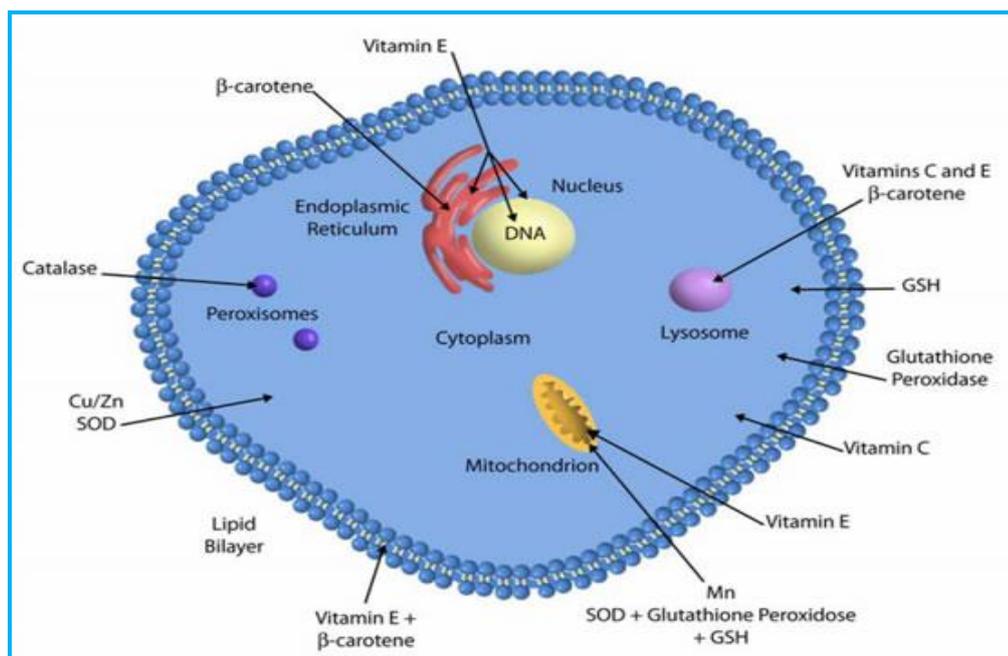


Figure III.2 : Systèmes Antioxydants d'Enzymes [53].

III.4. Les antioxydants naturels :

Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines, ...).

III.5. Rôles des complexes antioxydants :

La vie en aérobiose se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale nécessaire au stockage de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).

La vie en aérobiose se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale nécessaire au stockage de l'énergie sous forme d'adénosine

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

triphosphate (ATP). La chaîne respiratoire est une succession de phénomènes d'oxydoréduction au cours desquels il existe des transferts d'électrons. Ces électrons peuvent réagir avec une molécule avoisinante pour aboutir à la formation d'un radical libre. Les radicaux libres sont produits au cours de nombreuses réactions engagées dans les mécanismes physiologiques, (respiration mitochondriale), dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection, toute pathologie dégénérative et vieillissement accéléré) et au cours de la pollution (par les métaux lourds, les xénobiotiques, ozone, les rayonnements ionisants...). Dans toutes les cellules aérobies, les radicaux libres sont essentiellement des radicaux oxygénés. Leur hyperactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation, avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formant des produits très instables. Ceux-ci donnent lieu à des réactions en chaîne générant de nouveaux radicaux libres. Ce processus de peroxydation s'auto-entretient de lui-même et il faut attendre l'obtention de produits stables par réaction entre deux radicaux ou l'intervention de substances protectrices dites "*piégeurs de radicaux libres*" pour l'arrêter. Le rôle des métabolites secondaires en matière de prévention des maladies causées par les radicaux libres a été clairement établi par plusieurs études [54]. Un schéma représentatif de l'impact de ROS et du rôle des divers métabolites secondaires dans l'apparition des diverses maladies et de leurs mode de suppression est établit ci- dessous (**Figure III.3**).

Ce sont des antioxydants essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant. Il existe de nombreux autres composés parmi lesquels certains sont regroupés dans le grand groupe des polyphénols.

Bien que non essentielles, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant [55].

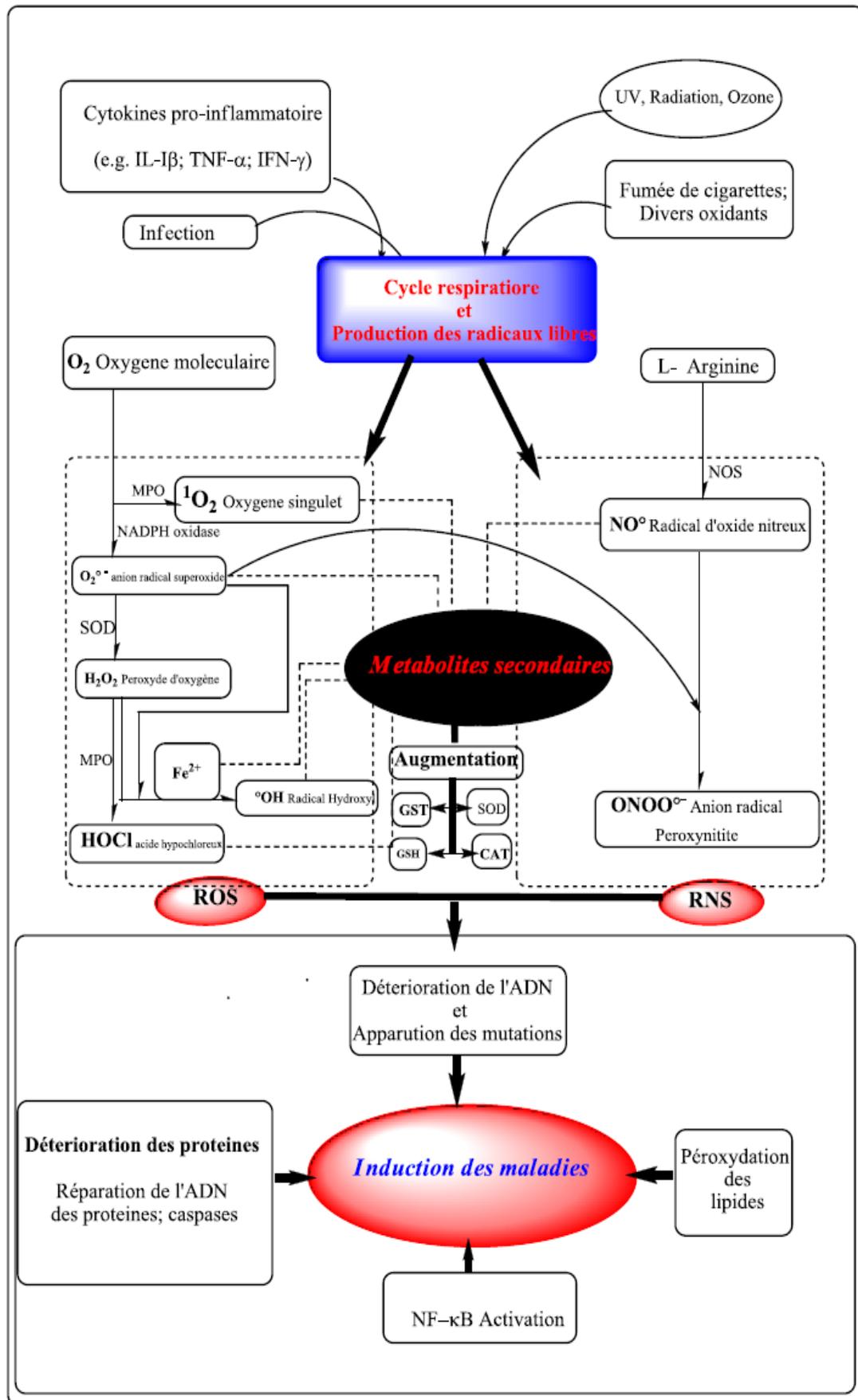


Figure III.3: Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies [55].

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

III.6.Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante :

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro* comme le cas du notre travail (**Tableau III.1**).

Tableau III.1 : Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* [56, 57, 58,59].

	Méthodes		
	Transfert d'atome d'hydrogène	Transfert d'électron	Transfert d'atome d'hydrogène et d'électron
Exemples	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Capacité d'absorption des radicaux libres).	* Test Folin –Ciocalteu (Analyse des phénols totaux). * FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Poxer) (Pouvoir réducteur de l'ion ferrique).	* DPPH (2,2-Di-Phényle-1-Picryl-Hydrazyle) (Piégeage du radical DPPH [•]). * ABTS : Acide 2,2'-azino-(3-éthyl Benzo Thiazoline)-6-Sulfonique (Réduction du radical-cation ABTS ^{•+}).
Mécanisme réactionnels	$AH + X^{\bullet} \rightarrow XH + A^{\bullet}$ AH : antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène). X [•] : radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène). XH : radical libre inhibé. A [•] : antioxydant stable.	$M(III) + AH \rightarrow AH^{\bullet} + M(III)$ M (III) : antioxydant (Donneur d'un électron). AH : radical libre (Accepteur d'un électron). AH [•] : radical libre inhibé. M (III) : antioxydant stable.	Les réactions semblent plus complexes et suivent un des deux mécanismes selon la structure des antioxydants ou la nature du milieu réactionnel.
Nature de la molécule testée	Hydrophile et lipophiles	Hydrophile et lipophiles.	*Hydrophile et lipophiles (DPPH). *Hydrophile(ABTS).
Avantages	*Facile à mettre en ouvre.	*Facile à mettre en ouvre. *Peu couteu.	*Facile à mettre en ouvre. *Peu couteu.
Inconvénients	*Couteu (générateur des radicaux ROO [•]). *Mécanisme de génération des ROO [•] Non physiologique. *interférence possible de protéines.	-PH utilisé non physiologique. -Interférence possible à 595 nm (FRAP).	*Encombrement stérique de molécules a haute poids moléculaires (DPPH). *Interférence possible à 515nm(DPPH). *Forte dependance au PH et au solvant (DPPH). *Produit de dégradation antioxydants (ABTS). *Radical inexistant <i>in vivo</i> (DPPH, ABTS).

Chapitre III : Les antioxydants et les activités Biologiques

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests chimiques, à savoir : Folin-Ciocalteu, Béta carotènes, DPPH'.

Chapitre IV :
La Partie Expérimentale

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

IV.1. Matériel et méthodes:

IV.1.1. Matériel végétal:

IV.1.1.1. Description de la zone de la récolte:

El Aouana est une commune de la wilaya de Jijel en Algérie, située à environ 20 km au sud-ouest de Jijel, présente une diversité floristique unique grâce à la diversité de ses écosystèmes, ses chaînes montagneuses traversées de gorges, ses grottes merveilleuses, ses côtes balnéaires, son climat méditerranéen et son histoire millénaire (**Figure IV.1**) [60].

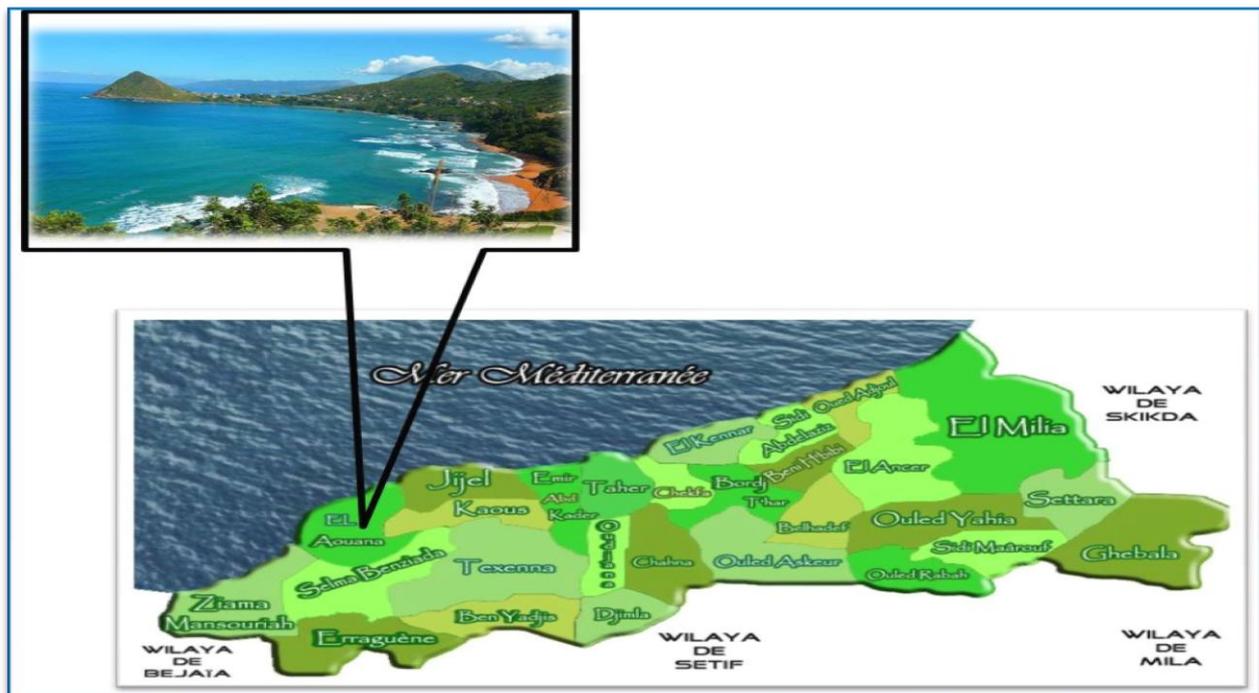


Figure IV.1 : El Aouana wilaya de Jijel [61,62].

IV.1.1.2. Récolte de la plante :

Les parties aériennes de la plante ont été récoltées dans la région d'El Aouana au sud-ouest de la wilaya de Jijel (Nord Est Algérien) au mois de Mai 2009, La récolte des fleurs et des feuilles de la plante a été effectuées très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire (LOST).

IV.1.2.1. Matériel Chromatographique :

IV.1.2.1.1. la Chromatographie liquide sous vide (VLC) :

C'est une méthode chromatographique simple, rapide, efficace et peu coûteuse permettant des fractionnements grossiers, leur rapidité évite les phénomènes d'isomérisations

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

observées Souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne. Nous avons utilisé la silice greffée C18 (Merk, Lichroprep RP-18 43-60 μm) avec un rapport 10/1 masse de silice/masse de l'échantillon. La phase stationnaire est suspendue dans le solvant adéquat puis déposée dans un verre fritté cylindrique de porosité n°4. Elle est ensuite tassée et séchée par application du vide. Une fois conditionnée l'échantillon est déposé à la surface de la phase stationnaire puis une élution par palier est réalisée avec le système MeOH/H₂O.

IV.1.2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Silica gel 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck). Après développement dans des cuves en verre, les plaques sont observées à la lumière et sous lampe UV à 254 et 366 nm. Le révélateur utilisé est un mélange d'acides (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et de l'eau 50 %.

IV.1.2.3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) :

L'appareillage est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe quaternaire P580 A avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne utilisée est :

Colonne Dionex C18, 4,6 x 250 mm, de granulométrie 5 μ et de porosité 90 Å.

Les conditions d'élution en CLHP analytique sont :

- ❖ Mode : gradient
- ❖ Système de solvant : H₂O–ACN
- ❖ Débit = 1 ml/min ;
- ❖ Température = 25 °C ;
- ❖ Détection : λ = 205, 254 et 350 nm.

IV.1.3.1.Méthode physico-chimique :

IV.1.3.1.1.Spectrophotométrie UV-visible :

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

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

IV.1.3.1.2. Spectroscopie de RMN :

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

L'échantillon a été solubilisé dans le solvant deutéré CD₃OD dans un tube analytique de 5 mm de diamètre.

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

IV.2. Etude d'une plante du Genre *Genista* :

IV.2.1 Extraction par macération :

Les parties aériennes séchées et pulvérisées (1000 g) ont été macérées à température ambiante par un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V), Cette macération est répétée 3 fois (3×24 h). Après filtration puis concentration à une température n'excédant pas 45°C, on ajoute de l'eau distillée (**Figure IV.2**). Cette dernière solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle. La **Figure IV.3** montre les différentes étapes d'extraction de cette plante. Les deux extraits sont évaporés à sec, puis pesés.



Figure IV.2: évaporation de solution hydroalcoolique.

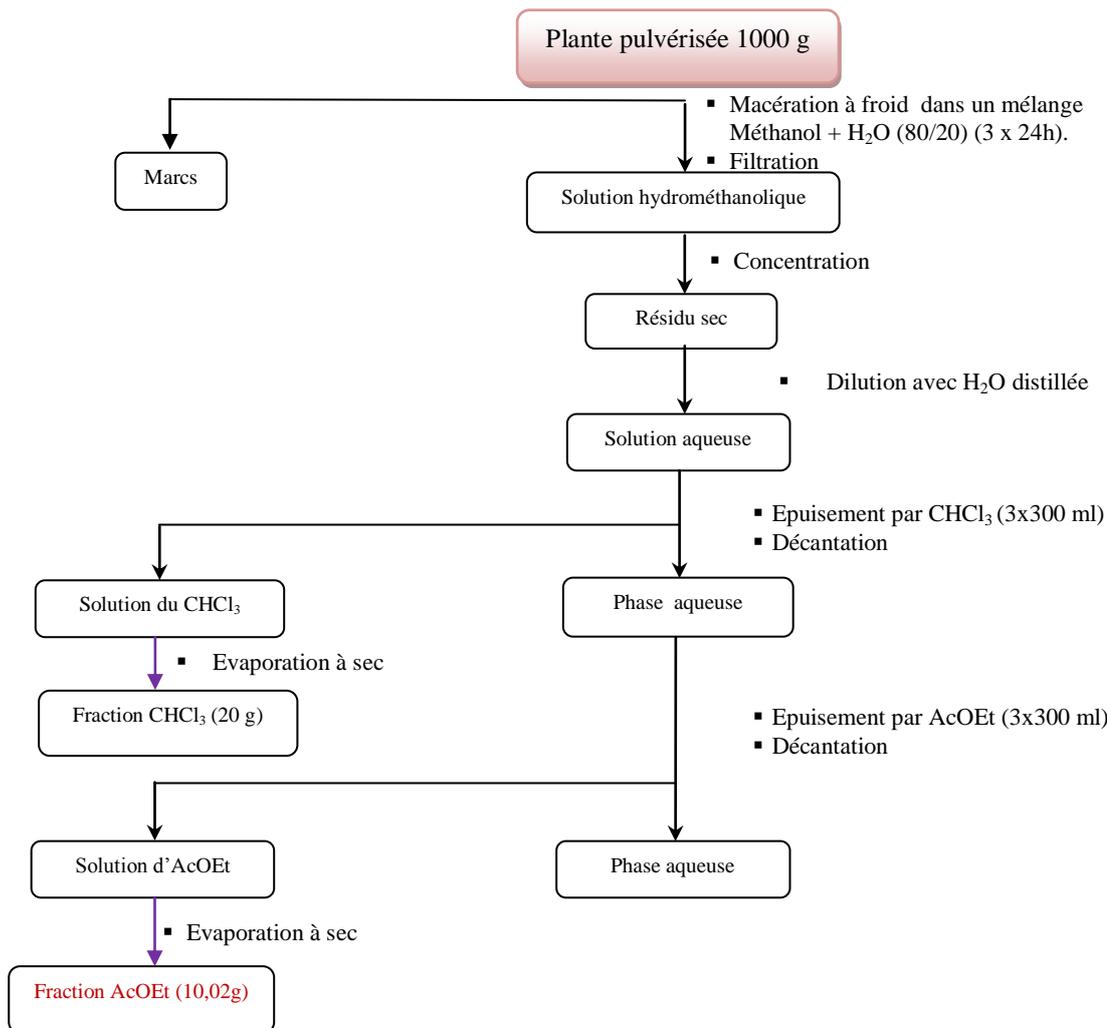


Figure IV.3: Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Genista*.

IV.2.2. Criblage phytochimique par CCM et CLHP:

L'extrait acétate d'éthyle de *Genista* a été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) (**Figure IV.4**) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique afin d'avoir une idée sur la richesse de notre extrait et le nombre de produits à séparer. Le développement des plaques CCM s'effectue dans l'éluant approprié. L'observation se fait sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation avec le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes et le réactif universel à base d'un mélange de (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et de l'eau 50 %.

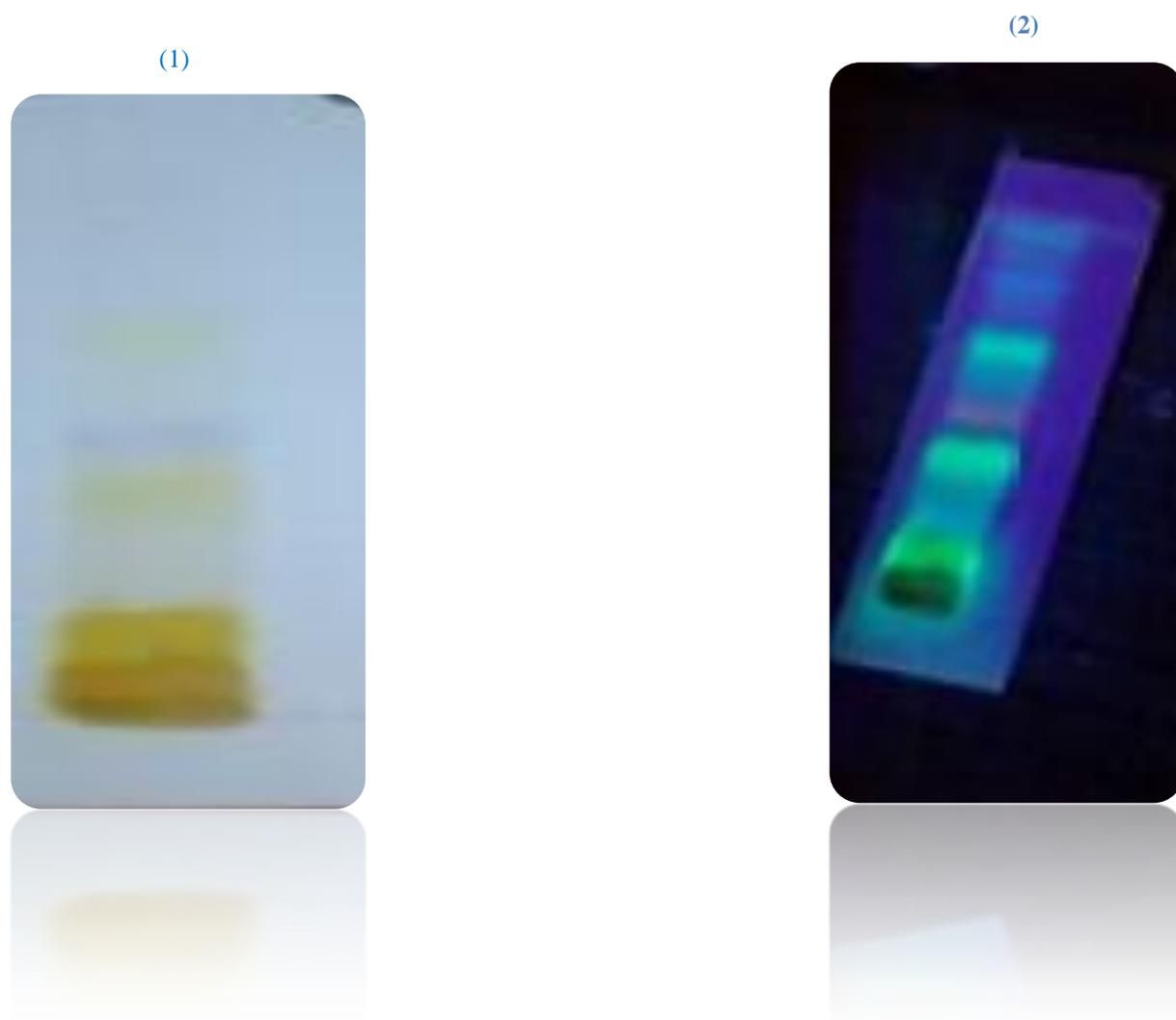


Figure IV.4: le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *Genista*
(1) après révélation par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %,
(2) sous la lumière UV 365 nm.

L'analyse par CLHP analytique de l'extrait acétate d'éthyle (5mg/ml CH₃OH) est effectué sur silice greffée C₁₈ à l'aide du gradient de 40% à 90% MeCN/H₂O pendant 60 min (**Figure IV.5**).

IV.2.3. Screening phytochimique par réactions colorées :

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés appartenant aux familles chimiques des métabolites secondaires, nous avons réalisé des tests phytochimiques spécifiques fondés sur des réactions de coloration, de turbidité ou de précipitations, en utilisant les méthodes décrites dans la littérature [63].

a. Caractérisation des polyphénols :

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols. A 2 ml de l'extrait, nous avons ajouté une goutte de solution méthanolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols.

b. Caractérisation des flavonoïdes (test de Shibata ou Shinoda test) :

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

c. Caractérisation des tanins (test au FeCl_3) :

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

0,5 ml d'une solution diluée de chlorure ferrique à 1 % sont ajoutées à 2.5 ml de l'extrait acétate d'éthyle. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleus noirâtres qui révèle l'existence des tanins galliques.

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

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

Les tanins catéchiqes sont identifiés par le réactif de Stiasny (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré). L'ajout de 5 ml de ce réactif à A 10 ml de l'extrait acétate d'éthyle entraîne la formation d'un précipité rouge caractérise les tanins catéchiqes.

d. Caractérisation des alcaloïdes :

Le réactif de Dragendorff a été utilisé pour caractériser la présence des alcaloïdes dans l'extrait acétate d'éthyle. Le test est fondé sur la capacité des alcaloïdes de se combiner avec des métaux lourds. En présence de quelques gouttes du réactif de dragendorff (composé d'un mélange de 0,80 g de nitrate basique de bismuth, 10 ml d'acide acétique glacial et 40 ml d'eau distillée), la formation d'un précipité de coloration rouge-orangé témoigne de la présence des alcaloïdes.

e. Caractérisation des triterpènes (le test de Lieberman-Burchard) :

La mise en évidence des triterpènes est fondée sur la réaction de Lieberman-Burchard. L'extrait acétate d'éthyle (5 ml) est additionné de 1 ml d'anhydride acétique puis de 0,5 ml de chloroforme, après dissolution, la solution est transférée dans un tube à essai au quel est ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive.

f. Caractérisation des saponosides :

Indice Mousse (IM) :

La détermination de l'indice de mousse (IM) est la méthode la plus abondante pour la confirmation de la présence des saponines. La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

Dans une série de 6 tubes à essai, sont introduits successivement 1 à 6 ml de l'extrait acétate d'éthyle, tous les tubes sont complétés à 10 ml avec de l'eau distillée selon le **Tableau IV.1** et agités vigoureusement dans le sens de la longueur pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min.

Tableau IV.1 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait acétate d'éthyle pour la mesure de l'indice de mousse.

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6
Extrait acétate d'éthyle, 1% (ml)	1	2	3	4	5	6
Eau distillé (ml)	9	8	7	6	5	4

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

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

Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique aussi la présence de saponosides.

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

C: Concentration initiale de l'extrait

D : Dilution dans le tube ou la mousse >1

IV. 3.Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle du Genre *Genista*:

7 g de la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*. Ont été fractionnés par VLC en phase inverse C₁₈ avec l'éluant H₂O-MeOH (60/40, 40/60, 20/80, 0/100). Des fractions de 150 ml (*3) sont recueillies pour chaque mélange et analysées par chromatographie sur couche mince (**Figure IV.6**).



Figure IV.6: VLC sur C₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*.

Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le système 9 :1 (CHCl₃ : MeOH). Les CCM ont été examinées à la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique puis chauffées à 100

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

°C. 6 fractions ont été récoltées après rassemblement des fractions présentant des similitudes (Tableau IV.2).

Tableau IV.2 : Les fractions de la VLC sur C₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*.

Eluant: MeOH – H ₂ O	Fractions collectées
60 :40	F1 F2
40 :60	F3
40 :60 20 :80	F4
20 :80	F5
20 :80 0 :100	F6

La fraction [F4] a été purifiée avec une simple précipitation dans le méthanol pour donner 5,630 g de **P1**.

IV.4. Dosage des composés phénoliques :

Principe de la réaction des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé suivant la méthode de Singleton et al [59], en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu. Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Brièvement, une prise de 125µl de l'échantillon dilué de l'extrait acétate d'éthyle est mélangée avec 500 µl d'eau distillée et 125µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation du mélange suivie d'un repos de 3 minutes on rajoute 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium à 2 %. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. 3 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 1 N sont additionnés; après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des densités optiques (DO) est faite à 760 nm contre un blanc.

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de 50 à 500 µg/ml. La teneur des composés phénoliques est exprimée en équivalents de mg d'acide gallique (EAG) /g de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois [64].

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante :

La mise en évidence du pouvoir antioxydant l'extrait acétate d'éthyle a été réalisé par deux techniques chimiques (le test de piégeage du radical libre DPPH et le blanchissement de β-carotène).

IV.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH :

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois en 1958 [65]. Le principe du test consiste à l'addition du radical DPPH[•] à une solution méthanolique contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène qui entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH.

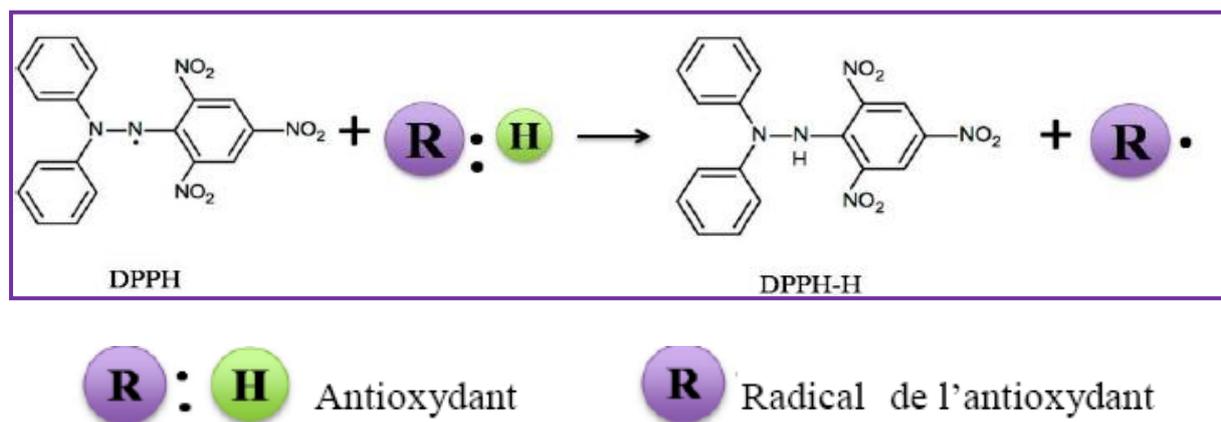


Figure IV.7: Mécanisme de la réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.

Brièvement, un volume de 30 µl de différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle est ajouté à 3 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,04 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 30 µl du méthanol avec 3 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 30 µl de chaque concentration de l'extrait et 3 ml du

Chapitre IV : La Partie Expérimentale

méthanol. La quercétine dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que l'extrait. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

✚ La détermination d'IC₅₀ :

La CI₅₀ c'est concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés.

IV.5.2. Test de Blanchissement de la Béta-carotène :

Dans ce test la capacité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par [66].

L'émulsion de β-carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 µl d'acide linoléique et 200 µl g de tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement évaporé dans le Rotavapor à 40 C°, ensuite 50 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés, l'émulsion en résultant a été agitée vigoureusement. La solution générée doit avoir une absorbance qui varie entre 0,5 et 0,6. Dans le cas contraire l'absorbance est ajusté en ajoutant de l'H₂O₂. 600 µl de solution d'extrait ou d'antioxydant de la référence (La vitamine E) (solubilisé dans le méthanol) ont été ajoutés à 2,4 ml de l'émulsion précédente. Un contrôle négatif contenant 0,5 ml de méthanol au lieu de l'essai témoin a été effectué en parallèle. La vitamine E a été employée comme contrôle positive. L'absorbance est enregistré à 470 nm chaque 30 min pendant 2 heures.

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

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{D.O E120} - \text{D.O T120})}{(\text{D.O T0} - \text{D.O T120})} \times 100$$

Tel que :

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

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

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

Chapitre V :
Résultats et Discussion

Chapitre V : Résultats et Discussion

V.1.Criblage phytochimique par CLHP et CCM:

L'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes a été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) (**Figure V.2**) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer. Le développement des plaques CCM s'effectue dans l'éluant approprié. L'observation se fait sous la lampe UV à 254 et 366 nm est suivie d'une révélation avec le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes et le réactif universel à base d'un mélange de (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et de l'eau 50%.

Le chromatogramme de HPLC (**Figure V.1**) de l'extrait acétate d'éthyle peut être commodément divisé en deux parts différentes : la première de 20,00 à 26,0 minutes est celle où le saponosides et ses dérivés complexes de sucre s'éluent, tandis que les flavonoïdes glycosides apparaissent dans la gamme entre 26, 50 et 36,50 minutes et les terpènes et les flavonoïdes aglycones entre 40 et 56 minutes.

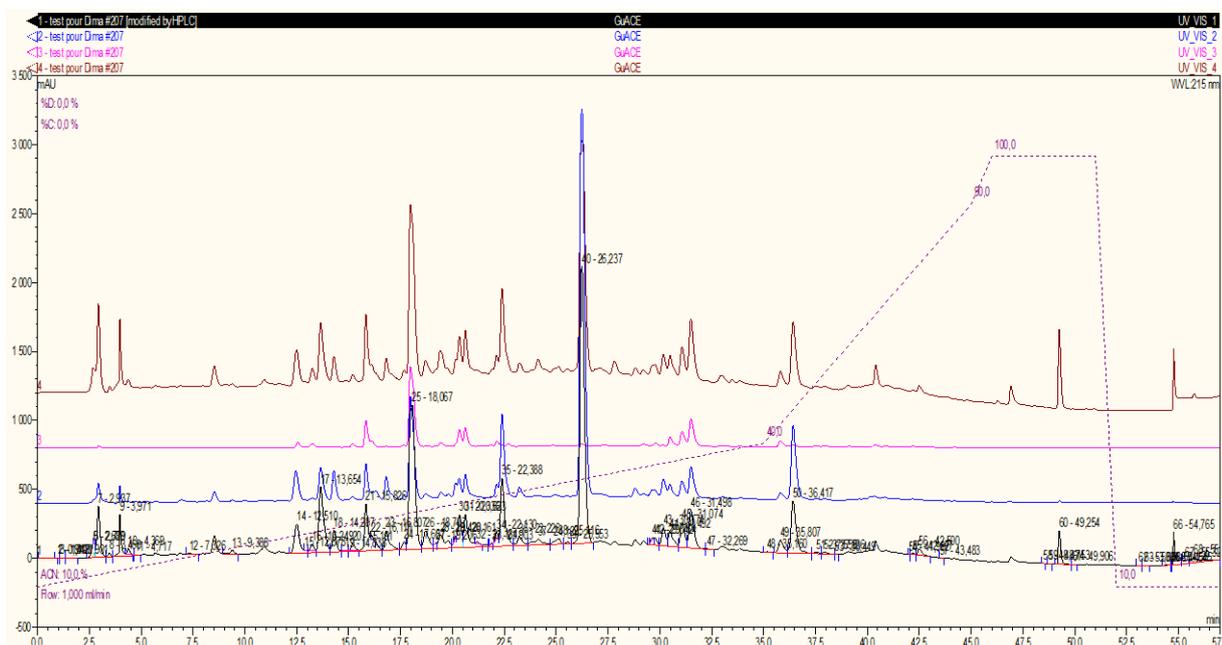


Figure V.1: Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 40% à 90% MeCN/H₂O) de la fraction acétate éthyle des parties aériennes de *Genista*.

Le profil chromatographique (**Figure V.2**) montre que l'extrait acétate d'éthyle est riche en tanins, flavonoïdes (des taches jaune et violette sous UV/365 nm) et isoflavonoïdes (des taches orange UV/365 nm). Les flavonoïdes se révèlent aussi sous UV/365 nm sous diverses colorations fluorescentes.

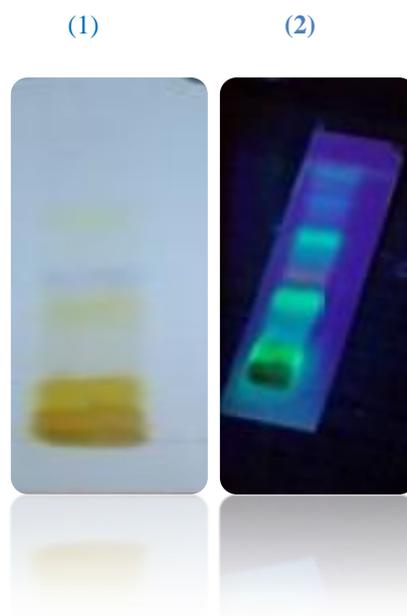


Figure V.2: le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *Genista*
(1) après révélation par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %, (2) sous la lumière UV 365 nm.

A l'effet de préciser la nature desdits phytoconstituants révélés, des réactifs spécifiques ont été utilisés (réaction colorées, **Tableau V.1**).

V.2.Criblage phytochimique par réaction colorées:

Les résultats du criblage phytochimique réalisé sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*. Sont consignés dans le **Tableau V.1**. Les différentes méthodes employées sont exposées dans le chapitre quatre.

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

Tableau V.1 : Résultats du criblage phytochimiques.

Réactif	Groupe chimique	Résultats
FeCl ₃	Polyphénols	+++
Stiasny	Tanins	+++
cyanidine	Flavonoïdes	+++
Lieberman-Burchard	Terpenoïdes	++
Indice de mousse	Saponosides	++
Dragendorff	Alcaloïdes	-

Chapitre V : Résultats et Discussion

D'après les résultats des tests phytochimiques obtenus sur *Genista*, nous avons pu déceler différentes familles de composés chimiques par de simples réactions de coloration et de précipitation.

D'après le **Tableau V.1** nous avons constaté que notre extrait a montré une réaction très positive pour le test des polyphénols et plus particulièrement les tanins, et flavonoïdes et il montre aussi une réaction positive pour les saponosides et les composés terpéniques.

Les résultats montrent que la plante est d'une grande importance, elle est riche en composés phénoliques tels que les tanins, les flavonoïdes et les saponosides qui sont reconnus pour leur propriétés antioxydantes [67]. Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes [68]. Cependant les saponosides ont des effets : antiviral, hypocholestérolémiant, hépato-protecteur, antitumoral et anti-cancérigène [69, 70,71].

V.3.Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle :

L'extrait acétate d'éthyle de *Genista* a subi un premier fractionnement par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffé en C-18 éluée avec un gradient de MeOH-H₂O.

La révélation de la plaque CCM par le réactif de l'acide acétique sulfurique et par UV nous a permis de confirmer la richesse de notre extrait en métabolites secondaires notamment en flavonoïdes (les taches jaunes) saponosides et terpenoïdes (les taches violettes) (**figureV.3**) Ces résultats obtenus sont en accord avec les travaux des auteurs [22-24] qui ont travaillé sur les flavonoïdes du Genre *Genista*.

La détection de la présence des saponosides dans l'extrait acétate d'éthyle a été aussi confirmée par une étude faite par [4].

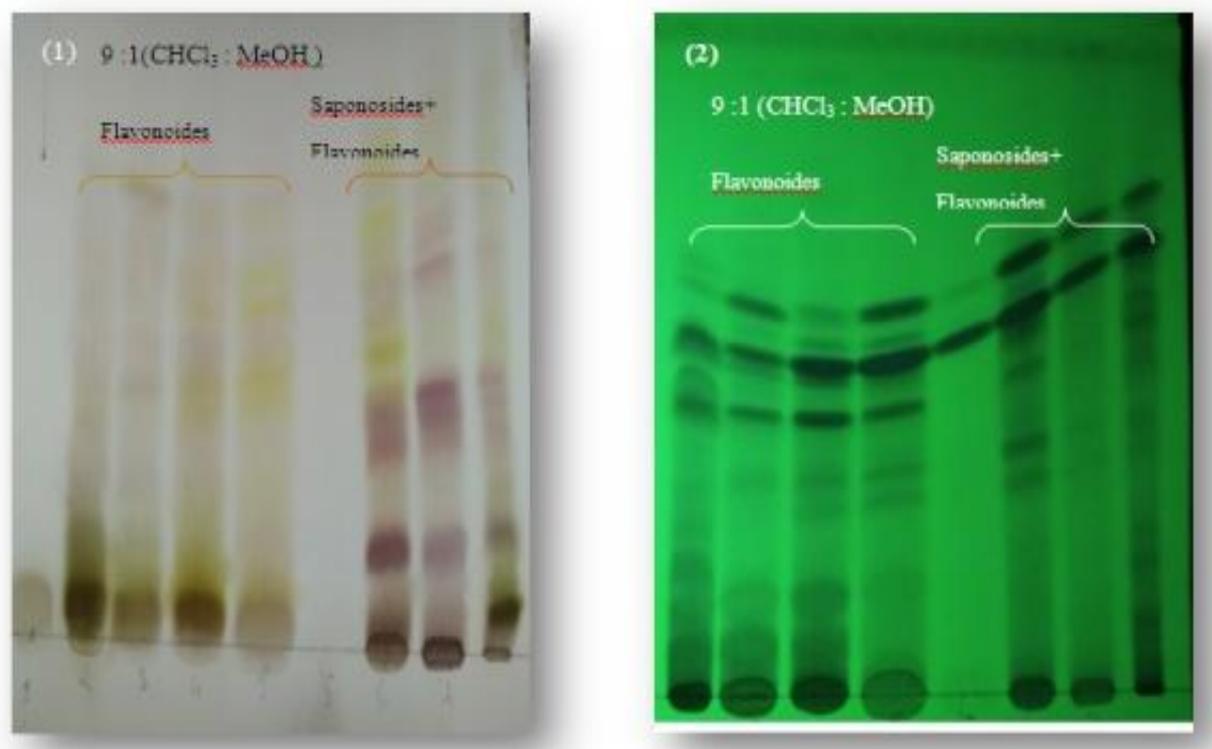


Figure V.3 : Les fractions de la VLC sur C₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*. (1) après révélation par «acide sulfurique 25 % et acide acétique 25% » et de l'eau 50 %, (2) sous la lumière UV 254 nm.

V.4.Détermination structurale du composé :

Le spectre d'absorption UV (**Figure V.4**) du composé **P1** enregistré dans le méthanol montre deux maxima à 361 et 261 nm, caractéristiques des bandes I et II caractéristique d'un squelette de type isoflavonique.

Chapitre V : Résultats et Discussion

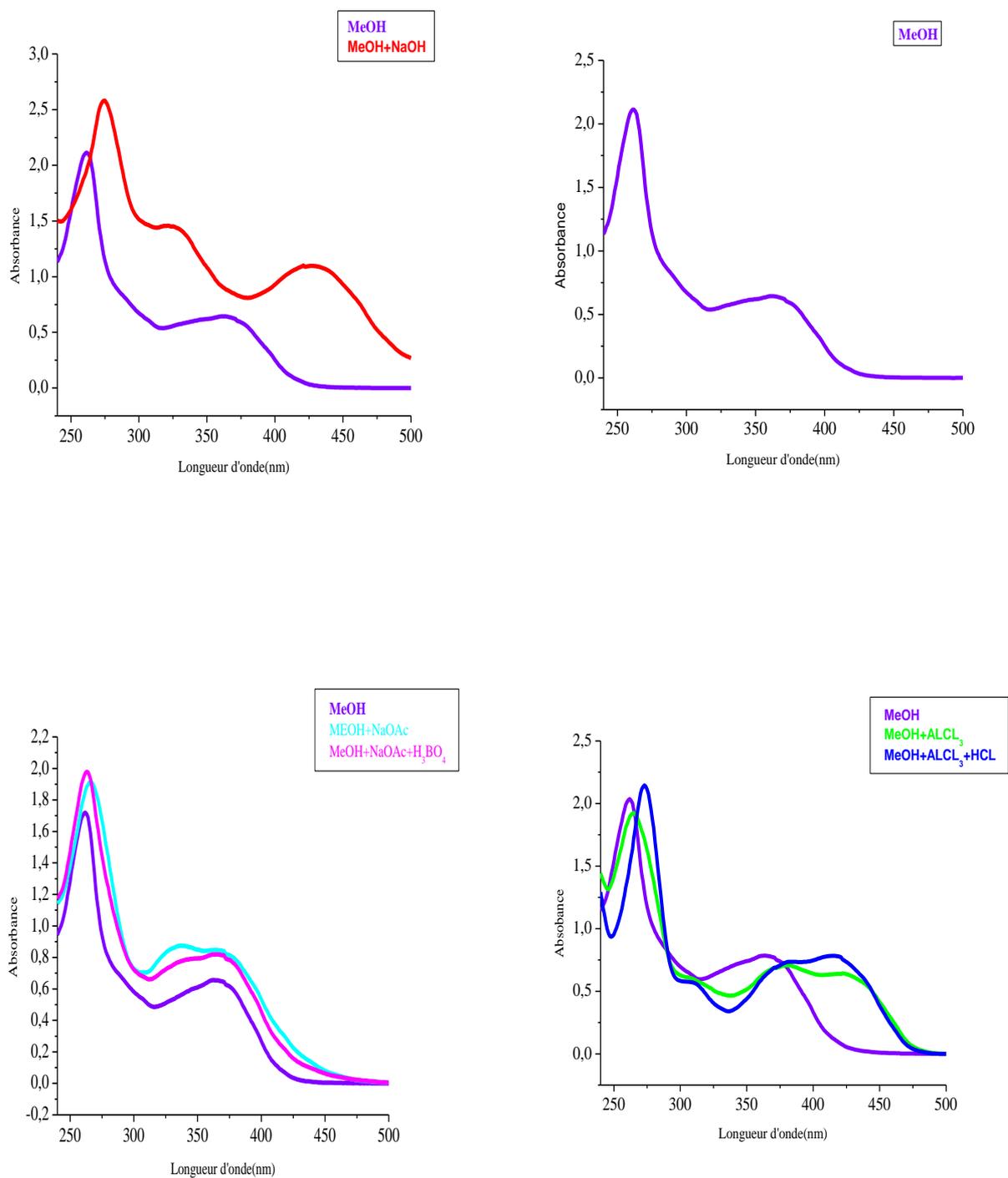


Figure V.4 : la Série spectrale UV du composé P1.

Chapitre V : Résultats et Discussion

- L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de 65 nm pour la bande I, indiquant la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 6 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, confirmant ainsi la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de 54 nm de la bande I, observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$), indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl} / \text{AlCl}_3$, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

L'analyse du spectre de RMN ^1H (**Figure V.5**) du composé **P1** montre la présence de :

- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,30$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- ❖ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,39$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-8, le second à $\delta = 6,22$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuable à H-6 indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5 et 7.
- ❖ Deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta_{\text{H}} 6,84$ ($d, J = 8,6$), et $7,40$ ($d, J = 8,5$), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6', respectivement indiquant ainsi une substitution du cycle B en position 4'.

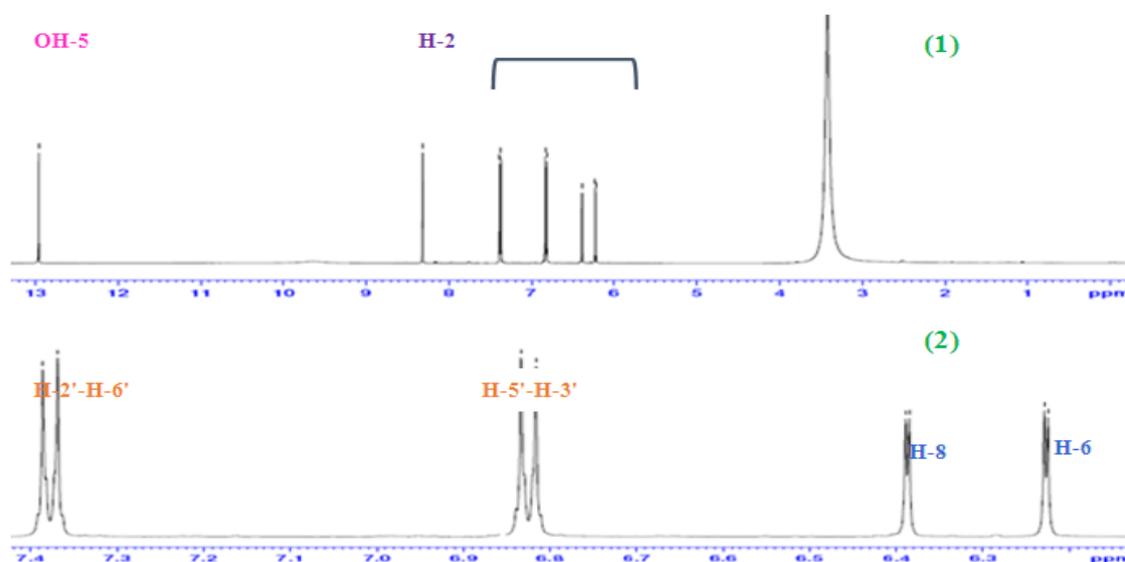
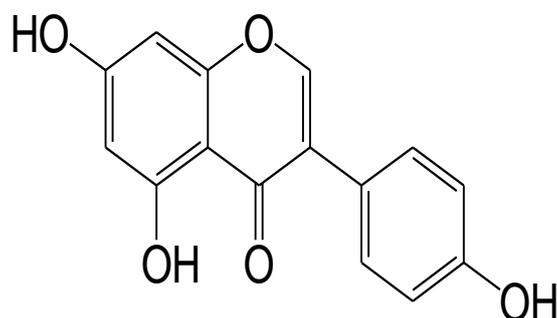


Figure V.5 : Spectres de RMN ^1H composé 1, (1) spectre normale, (2) spectre avec agrandissement de la zone entre 6 et 8 ppm.

Chapitre V : Résultats et Discussion

Les données de la RMN 1H est celles de la série spectrale UV permettent de proposer la structure suivante : 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone connue sous le nom de la Génistéine.



Génistéine

V.5.Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode de folin ciocalteau en utilisant comme standard l'acide gallique (**Figure V.6**), la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG /g d'extrait).

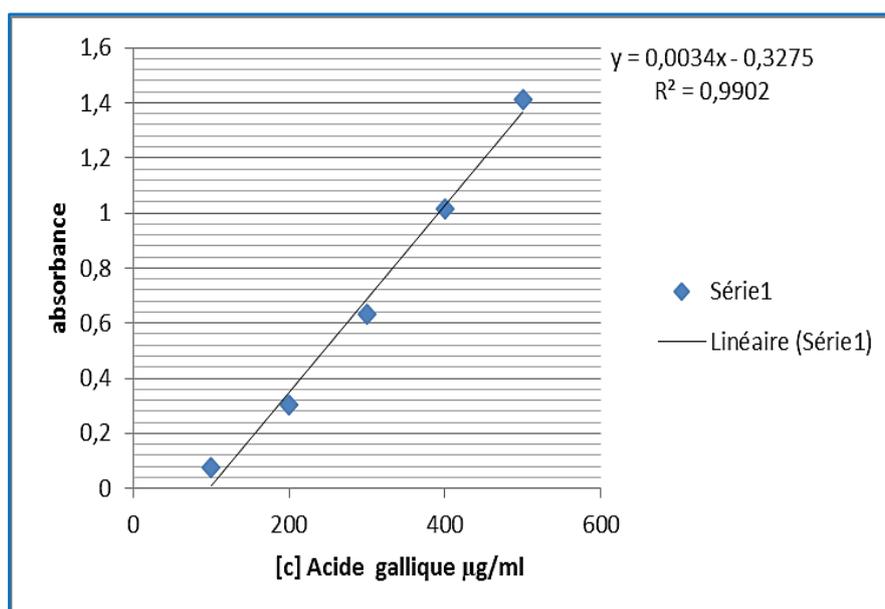


Figure V.6 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais)

Chapitre V : Résultats et Discussion

Ce résultat indique bien que la richesse de notre extrait en polyphénols est importante. L'extrait acétate d'éthyle contient 266,51 mg/g de polyphénols, cette quantité est presque deux fois moins que celle trouvée dans l'extrait de thé vert 400 mg/g [72].

V.6. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test DPPH :

L'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle de *Genista* et de la vitamine E vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH^{*}) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires.

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait (**Figure V.9**).

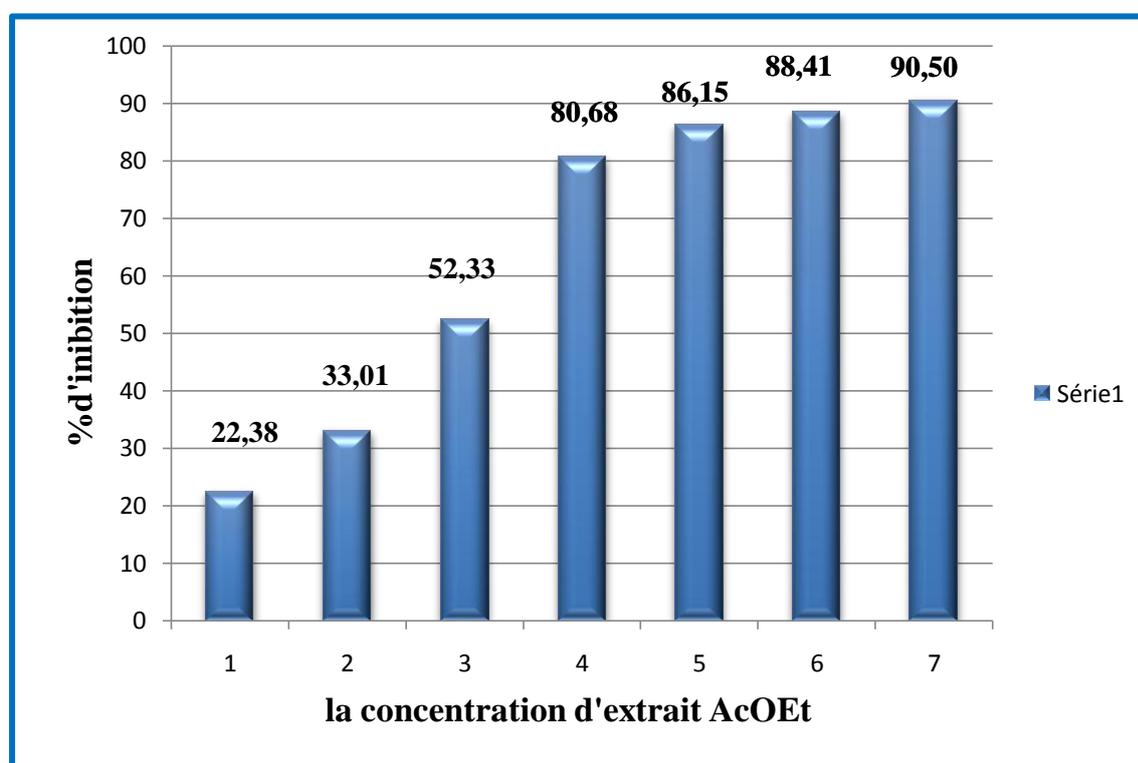


Figure V.7 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle.

La **Figure V.7** révèle clairement que l'extrait acétate d'éthyle possède une activité antiradicalaire dose dépendante avec un maximum d'inhibition de **90,5%**.

Chapitre V : Résultats et Discussion

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition).

✚ Détermination de l'IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ exprimée en µg/ml a été déterminée graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé (**Figure V.8**).

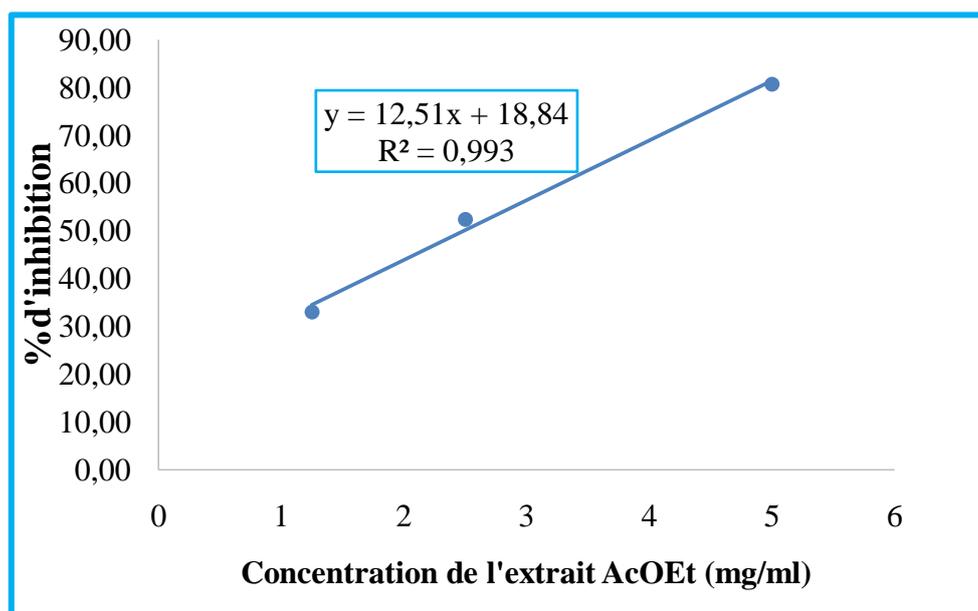


Figure V.8: Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle.

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

La valeur de IC₅₀ = 2,49 µg/ml montre que l'extrait acétate d'éthyle possède un potentiel anti radicalaire excellent.

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé la vitamine E. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec une IC₅₀ de l'ordre de 25 µg/mg.

Nous remarquons que l'activité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle est **10** fois supérieure à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de substances de référence.

L'activité antioxydante de notre extrait acétate d'éthyle est nettement supérieure à celle obtenu par [73] .pour leurs études de la plante *Genista quadriflora* (Fabaceae) dont l'IC₅₀ égale à 58,97µg/ml. Egalement l'extrait méthanolique de *Genista vuralii* avait présenté une

Chapitre V : Résultats et Discussion

activité antiradicalaire **31** fois moins active à celle de notre plante par une IC_{50} égale à $77,95\mu\text{g/ml}$ selon [74].

Il est évident que la forte activité de l'extrait acétate d'éthyle est attribuée à sa richesse aux composés phénoliques, Une étude faite par [75] a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

V.7. Test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène:

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de ce dernier mesuré spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène.

Les courbes de la cinétique de blanchiments du β - Carotène en fonction du temps permis de mettre en évidence la propriété antioxydante d'échantillon et du standard, mais ce qui n'est pas le cas pour nous suite à des problèmes techniques au cours de la manipulation.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

❖ Conclusion générale :

Le présent travail avait pour objet l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante d'une plante médicinale Algérienne *Genista* appartenant à la famille des Fabaceae. Cette dernière en général et le Genre *Genista* en particulier sont particulièrement bien fournis en métabolites secondaires connus pour leurs diverses et intéressantes activités biologiques. Ces derniers sont constitués quasi exclusivement de flavonoïdes et isoflavonoïdes, qui sont d'ailleurs considérés comme les composés typiques et chemotaxonomiques aussi bien de la famille que du Genre. Cette investigation chimique sur le Genre *Genista* constitue une modeste contribution dans la connaissance des constituants chimiques de la famille et du Genre.

La partie phytochimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista*, a conduit à l'isolement et l'identification d'un isoflavonoïde.

La méthodologie de séparation et purification des métabolites secondaires de l'extrait acétate d'éthyle a été basée essentiellement sur la combinaison des différentes méthodes chromatographiques :

- ✚ chromatographie sur liquide sous vide sur phase inverse C₁₈ (VLC).
- ✚ chromatographie sur plaques analytique de silice normale (CCM).

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et par UV.

L'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Genista* a été évaluée par le test antiradicalaire qui consiste à estimer la capacité du DPPH à piéger les radicaux libres, ainsi que le test de blanchiment de la Beta carotène. L'étude a révélé que l'extrait acétate d'éthyle possède une activité antioxydante excellente. Cette activité est nettement supérieure à celle de la vitamine E, mais il s'agit d'un extrait contenant un grand nombre de composés différents. Il est donc très probable qu'ils contiennent des composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité comparable à celle de substances de références.

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

Références bibliographiques

- [1] Baker J. T., Borris R. P., Carte B., Cordell G. A., Soejarto D. D., Cragg G. M., Gupta M. P., Iwu M. W., Madulid D. R., Tyler V. E. (1995). Natural products drugs discovery and development new perspectives on international collaboration. *Journal of Natural Products*. 58: 1325-1357.
- [2] Mohmoodally M. F. (2013). Traditional medicines in Africa: an appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 6: 1-14.
- [3] Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. C.N.R.S. Paris.
- [4] Boutaghane N., Voutquenne-Nazabadioko L., Harakat D., Simon A., Kabouche Z. (2013). Triterpene saponins of *Genista ulicina Spach*. *phytochemistry* .93 :176-181.
- [5] Wink M., Mohamed G.I.A. (2003). Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular Phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 897-917.
- [6] Heywood V.H. (1996). Flowering Plants of the World. Oxford University Press. Oxford. (3). 141-145, 149-152.
- [7] Dupont F., Guignard J.L. (2012). Botanique systématique moléculaire. Elsevier. (15). 336.
- [8] Wojciechowski M.F., Lavin M., Sanderson M.J. (2004). A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* .91:1846-1862.

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

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

[11] **Dicotylées12. ORDRES DIALYPETALES A OVAIRE SEMI-INFERE.** [Consulté le 12/06/2017]. Disponible à partir de : <http://www.vdsciences.com/pages/sciences-agronomiques-de-base/biologie-vegetale/phanerogames-elements-de-reprod-et-de-classif/angiospermes/dicotylees-12.html>.

[12] **Explorez Familles, Plantes et plus encore !** [Consulté le 12/06/2017]. Disponible à partir de : <https://www.pinterest.com/pin/489273946993290066/>.

[13] **Gadow A. V., Joubert E., Hansmam C. F. (1997).** Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea *Aspalathus linear* with green, Long and black tea. *Food Chemistry*. 60 :73-77.

[14] **Jean-Marie V. B.,** Jardin des plantes à couleurs. Collection de plantes tinctoriales Service Espaces verts. Rue Frères Biéva 203 - 5020 Vedrin.30.

[15] **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Technique & Documentation. Paris. (3).393-397.

[16] **Genêt à balais.** [Consulté le 30/05/2017]. Disponible à partir de : <https://fr.pinterest.com> visité.

[17] **Rauter A. P., Martins Al., Lopes R., Ferreira J., Serralheiro L. M., Araujo M., Borges C., Justino J., Silva F., Goulart M., Thomas-Oates., Rodrigues J. A., Edwards E., Noronha J., Helder Mota-Filipe R. P. (2009).** Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*.122: 384-393.

[18] **Korpachov V. V., Lifvinenk O. O., Paster I. P. (1995).** Effect of *Genista tinctoria* extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism Ukraine. farmatsevtichnii zhurnal (Kiev) 5: 82-86.

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

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

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

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

[23] **Pistelli L., Giachi I., Potenzs D., Morselli I. (2000).** A New Isoflavone from *Genista corcica*. Journal of Natural Products.63: 504-506.

[24] **Giachi I., Manunta A., Morelli I., Pistelli L. (2002).** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. Biochemical Systematics and Ecology. 30: 801-803.

[25] **Tosun F., Akyuz Kizilay C., Tosun A.U. (2009).** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista sessilifolia* growing in Turkey. Chemistry of. Natural. Compounds. 45 :83-84.

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

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

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

[29] **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. (3). Paris.

[30] **Stalikas C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids *Review*. *J. Sep. Sci.* 30: 3268–3295.

[31] **Bohm B. A. (1999).** Introduction to flavonoids. CRC Press. England.

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

[33] **Justen U., Knuthsen P., Leth T. (1998).** Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*.

[34] **Bronner W.E., Beecher G.R. (1995).** Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*. 705:247-256.

[35] **Crozier A., Jensen E., Lean M.E.J., McDonald M.S. (1997).** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*. 761: 315-321.

[36] **Rahman A.U. (2005).** Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products. Part .Elsevier. USA.

[37]Iwashina T. (2000).The structure and distribution of the flavonoids in plants.Journal of plant Research.113: 287-299.

[38]Lapcik O. (2007).Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity rule.phytochemistry.68: 2909-2916.

[39]Reynaud J.,Guilet D.,Terreux R.,Lussignol M ., Walchshofer N. (2005) .Isoflavonoids in non leguminous families:an update.Natural Products Reports.22:504-515.

[40] Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents.Clinical microbiology reviews. (4) .12: 564-570.

[41] González-Gallego J., Sánchez-Campos S., Tuñón M. J. (2007). Anti-inflammatory propertes of dietary flavonoids. *Nutriciun hospitalaria*. (3) .22: 287-293.

[42] Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mecanisms. Journal of Pharmacological Sciences. (3). 96:229-245.

[43] Bylka W., Mathawska I., Pilewski N. A. (2004). Natural flavonoid as antimicrobial agents. Journal of the American Nutraceutical Association. (2) .7: 24-26.

[44] Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals. Topical journal of pharmaceutical research. (3).7: 1089-1099.

[45] Park H. J.,Cha H. C.(2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho.Korean journal of biological society. 7: 327-330.

[46] Subsamanian S., Stacey G., Yu O. (2007). Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. Trends in plant science. (7).12: 282-283.

[47] Yang R. Y., Lin S., Kuo G. (2008). Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. Asia of pacific journal of clinical nutrition. 17 (S1) : 275-279.

[48] **Antioxydants – Les 5 Couleurs De La Vie.** [Consulté le10/05/2017]. Disponible à partir de : <http://www.nutritionnaire.com/antioxydants-les-5-couleurs-de-la-vie/>

[49] **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.

[50] **Vansant G. (2004).** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone.301.

[51] **Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 4113-4117.

[52] **Halliwel B., Gutteridge J. M. C. (1999).** Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.(3).

[53] **Systèmes Antioxydants d'Enzymes.** [Consulté le14 /06/2017]. Disponible à partir de : [http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-EnzymeSystems\(French\).aspxconsulté](http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-EnzymeSystems(French).aspxconsulté).

[54] **Mandal S., Hazra B., Sarkar R., Biswas S., Mandal N. (2009).** Assessment of the antioxidant and Reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista leaf*. ECAM. doi:10.1093/ecam/nep072: 1-11.

[55] **Curtay J. P., Robin J. M. (2000)** .Intérêt des complexes antioxydants. Nutrithérapie Information. 1 - 4.

[56] **Alberto D., Carmen G.C., Begona B. (2004).** Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. Journal of Agricultural Food and Chemistry.52: 48-54.

[57] **Arts M.J., Haenen G.R., Voss H.P., Bast A. (2004).** Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. Food and Chemical Toxicology. (1) .42: 45-9.

[58] **Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R. (2003).** Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) of plasma and other biological and food samples journal of agricultural and food chemistry. 51: 3273-3279.

[59] **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology.299: 152-178.

[60] **El Aouana, ou le petit paradis oublié.** [Consulté le 30 /05/2017]. Disponible à partir de: www.medmem.eu/fr/notice/EPT00009

[61] **El Aouana (Jijel) : Polémique sur la déviation de deux oueds.** [Consulté le 16/05/2017]. Disponible à partir de : <https://idurar.com/el-aouana-jijel-polemique-sur-la-deviation-de-deux-oueds-1492.html>.

[62] **El MILIA l'arabo-amazigh.** [Consulté le 16/05/2017]. Disponible à partir de : http://el-milia.over-blog.com/pages/Presentation_de_ElMilia_en_arabe_-1220039.html

[63] **Harborne J. B. (1973).** Phytochemical Methods. Chapman and Hall. Ltd. London. 49-188.

[64] **Kim D.O., Chun O.K., Kim y.j., Moon H.Y., Lee C.Y.(2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51 :6509-6515 .

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

[66] **Dapkevicius A., Van Beek T.A., Linssen J.P.H, Venskutiens R. (1998).** Rapid spectroscopic screening for antioxidant activity in sage, thyme and oregano isolates with the B-carotene-linoleic acid model system. In Natural Product Analysis, Schreier P, Herderich M, Humpf H-U, Schwab W (eds). Vieweg: Braunschweig. 235-237.

[67] **Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H. (1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. THE LANCET. (42).8878: 1007-1011.

[68] **Ma Z. C., Porter L. J. (1988).**Tannins from Bendo Eucalyptus. *Journal of Integrative Plant Biology*.30: 534-538.

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

[70] **Kuzuhara H., Nishiyama S., Minowa N., Sasaki K., Omoto S. (2000).** Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *European Journal of Pharmacology*.(1- 2).391: 175-181.

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

[72] **Sun J.,Chen P., Lin L.Z.,Harnly J.M. (2011)** .A non targeted approach to chemical discrimination between green tea dietary supplements and tea leaves by HPLC/MS. *Journal of Official Agricultural Chemistry*. 94: 103–10.

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

[74] **Duran A., Uslu N., Doğan B., Musa Ö.M., Çelik M. (2015).** Antioxidant Activity and Phenolic Contents of 30 Selected Medicinal Plants. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2.21. 136-141.

[75] **Kang D .G., Yun C.K., Lee H.S. (2003)** .Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol* .87: 231–6.

Résumé

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

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et HPLC) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) d'un métabolite secondaire « P1 » de nature isoflavonique.

L'extrait de cette plante manifesté un grand pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH.

Mots clés : Fabaceae, *Genista*, activité antioxydante, RMN, HPLC, VLC, CCM.

المخلص

يخصص هذا العمل للدراسة الكيميائية النباتية لنبتة من صنف *Genista* من فصيلة البقوليات وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة. هذه النبتة محلية جزائرية لم تخضع لآيت دراسة كيميائية نباتية وتقييم بيولوجي. يسمح هذا العمل بالعزل عن طريق الكروماتوغرافيا (VLC، CCM، HPLC) وتحديد الهيكل بمختلف التقنيات الطيفية (الرنين المغناطيسي و الأشعة فوق البنفسجية) لمركب ثانوي " P1 " من نوع isoflavonique. أظهر الفحص لمستخلص النبتة النشاط الكبير المضاد للأكسدة وذلك عن طريق اختبار DPPH.

الكلمات المفتاحية : البقوليات ، *Genista* ، النشاط المضاد للأكسدة، RMN ، HPLC ، VLC ، CCM.

ABSTRACT

This work is dedicate to the phytochemical study of a *Genista* genus of the Fabaceae family as well as the evaluation of the antioxidant activity. This plant endemic of Algeria has not been the subject of phytochemical study And biological evaluation.

This work allowed the isolation by chromatographic methods (VLC, CCM and HPLC) and the characterization by the various spectroscopic methods (NMR and UV) of a secondary metabolite "P1" of isoflavonic nature.

The extract of this plant showed great antioxidant power by the DPPH method.

Key words: Fabaceae, *Genista*, antioxidant activity, NMR, HPLC, VLC, TLC.

Année universitaire

2016/2017

Présenté par

Zerdazi Fatima Zohra Rebbah Maroua

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

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

Résumé

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

Ce travail a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et HPLC) et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN et UV) d'un métabolite secondaire « P1 » de nature isoflavonique.

L'extrait de cette plante manifesté un grand pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH.

Mots clés : Fabaceae, *Genista*, activité antioxydante, RMN, HPLC, VLC, CCM.

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

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUSBA. B

MCB.UFM Constantine,

Rapporteur : BOUTAGHANE. N

MCA.UFM Constantine,

Examineur : TENIOU. S

MAA.UFM Constantine.

Date de soutenance : 28/06/2017