

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire
et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : الكيمياء الحيوية و علم الاحياء
الخلوي و الجزيئي

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie appliqué*

N d'ordre :

N de série :

Intitulé :

Etude phytochimique et biologique d'une plante de la famille des Rosacées

Présenté et soutenu par : *HIMROUCHE Samah*

Le :19 /06/2023

BENSIMESSAOUD Marwa

Jury d'évaluation:

M^{me}. *KHALFALLAH Assia*

MCA. CUM-Mila

Encadreur

M^{me}. *MOSBAH Asma*

MCA. UFM Constantine 1

Président

M^{me}. *BOUSETLA Ahlem*

MCA. UFM Constantine 1

Examineur

Année universitaire

2022/2023

Remerciements

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
وَالصَّلَاةُ وَالسَّلَامُ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ

*Nous remercions d'abord **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience durant ces longues années d'études.*

Nous adressons nos vifs remerciements au professeur :

***Mme. KABOUCHE Zahia** Pour nous avoir accueillies au sein du laboratoire d'obtention de substances Thérapeutiques (LOST), pour ses encouragements, ses idées, sa disponibilité et pour sa bienveillance.*

Nous tenons à témoigner notre profonde gratitude, et adresser nos sincères remerciements à notre encadreur le docteur :

***M^{me}. KHALFALLAH Assia** qui a accepté de diriger ce travail, et de le suivre avec beaucoup de rigueur. Merci pour ses précieux conseils, ses efforts, son savoir, sa confiance, et son soutien.*

*Nous souhaitons également remercier les membres du jury **M^{me}. MOSBAH Asma** et **M^{me}. BOUSETLA Ahlem** pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos travaux en acceptant d'examiner notre mémoire et de l'enrichir par leurs propositions*

*Un grand merci également à tous l'équipe de laboratoire (LOST) pour leur chaleureux accueil, leur aide, et leur gentillesse, en particulier **M^{elle} Hadjer** et **M^{elle} Nour El houda**.*

*Nous remercions le **Dr. BENSOUICI Chawkai**, chef du laboratoire de biochimie au centre de Recherche en Biotechnologie, pour le temps qu'elle a consacré pour nous, pour ses explications et ses encouragements.*

*Nos remerciements vont également à tous l'équipe de laboratoire de biochimie et de microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie en particulier **M^{elle} Sara, Mr Mehdi ...***

Nous remercions tout spécialement l'ensemble des doctorants que nous avons côtoyés au laboratoire (LOST) et (CRBt), qui nous ont apporté leur aide par leur compétence. Nous leurs souhaitons un avenir plein de succès

Enfin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Notre unique et seul à tout

Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis

Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri

✿ Nous dédions ce travail à ... ✍

Samah

Merci à Allah le Tout Puissant, Qui m'A Donné le courage et la volonté pour bien accomplir ce labeur.

*Aucune dédicace ne serait exprimée mon respect, mon amour éternel et ma reconnaissance pour mes parents papa **Abderrezak** le secret de mon bonheur et Maman **Massouda** la rose du paradis, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ALLAH vous protège et vous garde en bonne santé.*

*À mon unique et adorable petite sœur **Badra**, mon bourgeon d'espoir.*

*À mes frères bien aimés, mon soutien éternel **Imad Al dine**, et à mon côté inébranlable **Houssam**.*

*À ma cousine, a bien aimée **Kanza**, et ma douce petite fille **Hamsa**.*

*À ma deuxième famille, la grande famille **Himrouche**.*

*À mon équipière et mon chère amie **Marwa** pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble pendant ces cinq ans, merci pour ta chaleureusité et gracieuseté, très heureuse de partager avec toi cet humble travail, tu étais brillante.*

*À mes meilleures amies, pour l'amitié qui nous a unies et les souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur, mes chères amies : **Nadjat, Rania, Chaima, Romaiissa, Oumaima, Nessrine, Razika, Lamia et Amira**.*

À toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères.

Et une grande dédicace À toutes mes amies de la promotion Biochimie Appliquée 2018.

Marwa

آخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ
الحمد لله الذي يسر البدايات وبلغنا النهايات الحمد لله الذي بفضلته اخترتُ الطريق وبفضله رضيته به،
وبفضله اجتزته فالحمد لله على التمام وحسن الختام

Je dédie ce mémoire....

À la lumière qui a illuminé mon chemin et qui a fait l'effort des années pour que je monte l'échelle du succès, mon cher père...

À celui que Dieu a distingué le paradis sous ses pieds et m'a couvert d'amour et de tendresse, qui m'a toujours accompagné avec ses prières bénies et ses paroles aimables, ma chère mère...

*À ceux qui sont toujours à mes côtés, à ceux qui m'aiment et cherchent toujours à me rendre heureux, qui m'encouragent toujours à obtenir plus de succès, mes chers frères (**Stiro** et **Zaki**)...*

*À la prunelle de mes yeux et à ceux qui ont partagé mon rêve et mon espoir, qui m'écoutent toujours et me motivent, qui m'ont aidé moralement à faire ce travail, mes chères sœurs (**Hasna** et **Chemiso**)...*

À celui qui m'encouragent et me soutiennent, qui est toujours à mes côtés ce qui me donne la force de continuer, qui est toujours disponible pour m'aider dans ce travail, mon cher copain...

*À ceux qui pleurent ma tristesse, se réjouissent de ma joie, qui soutiennent mes idées, mes meilleures amies (**Wissem** et **Touta**)...*

*À ceux qui m'ont accompagné tout au long de ces cinq années, avec ses bon et ses mauvais moments, mes chères amies (**Samah**, **Nadjet**, **Chaima**, **Hayat**, **Rania**, **Romaissa**, **chouaa**)...*

À mon grand-père et ma grand-mère, que Dieu prolonge votre vie...

*À mes chers oncles et mon chers tante (**Walid**, **Tarek**, **Mounibe**, **Mouhmed**) ...*

À toute mes ami(e)s, chacun(e) par son nom...

*À celle qui m'a toujours soutenu, à celle qui m'a aimée car je suis et qui ont contribué à la réussite de ce travail, ma soeur en esprit (**Samah**)...*

Abréviations et symboles

CHI : Chalcone isomérase.

FLS : Flavone synthase.

IFS : Isoflavone synthase

F3H : Flavone-3-hydroxylase.

DFR : Dihydroflavone réductase.

UV : Ultra-Violet.

Rf : Rapport frontal.

RMN-¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

λ : Longueur d'onde.

nm : nano maitre.

mg : milligramme.

mL : millilitre.

mn : minute.

P : produit.

J : jonction de constante de couplage.

Hz : Hertz.

g : gramme.

D : Dilution.

ppm : partie par million.

DPPH : 2,2-diphénol-1-picrylhyrazyl.

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène.

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.

v/v : volume par volume .

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CI₅₀ : concentration d'inhibition 50%.

FCR : Folin-Ciocalteu Reactive.

A_{0,50} : absorbance à A= 0,5.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

MSdP : Métabolisme Secondaires des Plantes.

EAG : Equivalent d'acide Gallique.

MVS : Matière Végétale Sèche.

EQ : Equivalent de Quercétine.

CC : Chromatographie sur Colonne.

d : doublet .

m : masse.

KI : Iodure de potassium.

I: Iodine.

µg: micro gramme.

Sm: solution mère.

Liste des figures

Figure 1 : quelques espèces appartenant à la famille des Rosacées.....	4
Figure 2 : Répartition géographique de la famille des Rosacées dans le monde.....	5
Figure 3 : Quelque fruits de la famille des Rosacées.....	8
Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes.....	11
Figure 5 : Voie de synthèse des flavonoïdes.....	12
Figure 6 : les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.....	16
Figure 7 : Équation du radical DPPH• transformé en DPPH-H.....	23
Figure 8 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•]	24
Figure 9 : Mécanisme réactionnel du test FRAP.....	25
Figure 10 : Formation du complexe Fe ⁺² -phénantroline.....	25
Figure 11 : Les différentes étapes de macération, de filtration, d'évaporation et de l'extraction liquide-liquide de l'extrait hydroalcoolique d'une plante de la famille des Rosacées.....	27
Figure 12 : Le protocole d'extraction de la plante.....	29
Figure 13 : Montage montre le processus.....	30
Figure 14 : plaques CCM des fractions obtenues par chromatographie sur colonne sous la lampe UV (254 et 365nm)	32
Figure 15 : plaque CCM du regroupement de la sous fraction f ₄	33
Figure 16 : Schéma résume les différentes étapes de séparation de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	35
Figure 17 : lecture micro-plaque.....	38
Figure 18 : Série spectrale UV- Visible de produit P ₁	53

Figure 19 : spectre RMN- H^1 (250 MHz, CD_3COCD_3) du produit P1	55
Figure 20 : spectre RMN- H^1 (250 MHz, CD_3COCD_3) du produit P1 étalé	55
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	57
Figure 22 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits étudiés.....	57
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	58
Figure 24 : Evaluation des flavonoïdes totaux des extraits étudiés.....	58
Figure 25 : Photos prise lors de dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.....	59
Figure 26 : les valeurs des CI_{50} du test DPPH.....	60
Figure 27 : Photos prise lors de dosage de l'activité du piégeage du cation radical $ABTS^{+}$	61
Figure 28 : les valeurs des IC_{50} du test ABTS.....	62
Figure 29 : La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits étudiés.....	63
Figure 30 : les valeurs des $A_{0,50}$ du test pouvoir réducteur.....	64
Figure 31 : Photos prise lors de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline.....	65
Figure 32 : les valeurs des $A_{0,50}$ du test Fe^{2+} -phenanthroline.....	66
Figure 33 : Photos prise lors de dosage de l'activité inhibitrice de α amylase.....	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques espèces appartenant à la famille des Rosacées et leurs utilisations.....	7
Tableau 2 : Principales classes des flavonoïdes.....	13
Tableau 03 : La relation entre Rf et la structure flavonique.....	14
Tableau 04 : relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structure flavoniques.....	15
Tableau 5 : Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes.....	17
Tableau 6 : Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des différents réactifs.....	18
Tableau 7 : les masses des extraits obtenues.....	28
Tableau 8 : Résultats du fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol par VLC.....	30
Tableau 9 : Résultats de séparation de la fraction F ' ₃ par chromatographie sur colonne.....	31
Tableau 10 : Résultat du regroupement final des fractions.....	32
Tableau 11 : Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de la sous fraction f ₄	34
Tableau 12 : les dilutions préparées de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.....	37
Tableau 13 : les dilutions préparées de la gamme d'étalonnage de la Quercetin.....	39
Tableau 14 : comportement chromatographique du produit P ₁	51
Tableau 15 : Données de la série spectrale UV-Visible du produit P ₁	51

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	3
<i>Chapitre1</i>	<i>Aperçu bibliographique</i>
I. Rosales:	4
I.1.Famille des Rosacées :	4
I.1.1.Généralité :	4
I.1.2. Distribution géographique:.....	5
I.1.3. Caractéristiques botaniques des Rosacées:	5
I.1.4. Classification:.....	6
I.1.5. Utilisations de plante:.....	7
I.1.5.1. Médicinales :	7
I.1.5.2. Économique:	7
I.1.6.Les principaux métabolites de la famille des Rosacées	9
II. Les flavonoïdes:	10
II.1. Généralités:	10
II.2. Définition et structure chimique:	11
II.3. Biosynthèse des flavonoïdes:.....	12
II.4. Classification des flavonoïdes	12
II.5. Identification des flavonoïdes:.....	14
II.5. 1. Techniques d'identification de structure:	14
II.5.1.1. Facteur de retard et comportement chromatographique:	14
II.5.1.2. Coloration sous UV:	15
II.6. Identification spectrale :.....	15
II.6.1. Spectrophotométrie UV-Vis:	15

II.6.2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	19
II.6.2.1. La RMN du proton (RMN ¹ H) :	19
II.6.2.2. RMN du carbone (RMN ¹³ C) :	19
II.7. L'hydrolyse acide des glycosides:	19
III. Dosages des phénols	20
III.1. Dosage des composés phénoliques totaux:	20
III.2. Dosage des composés flavonoïdes totaux:	21
IV. Activités biologiques	21
IV.1. Activité antioxydant ::	21
IV.1.1. Principaux antioxydants:	22
IV.1.2. Mécanismes d'action des antioxydants:	22
IV.1.3. Principaux tests d'activité antioxydant :	22
IV.1.3.1. Inhibition du radical stable DPPH :,	22
IV.1.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS• ⁺	23
IV.1.3.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)	24
IV.1.3.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² - phénantroline: ...	25
IV.2. Activités enzymatiques	26
IV.2.1. Evaluation de l'activité antidiabétique ::	26
IV.2.1.1. Inhibition de l'alpha amylase:	26

Chapitre 2 Matériel et méthodes

I. Etude phytochimique de la plante	27
I.1-Récolte du matériel végétal:	27
I.2- Extraction de la plante:	27
I.3-Séparation et purification	30
I.3.1-Fractionnement de l'extrait n-BuOH par VLC sur gel de silice:	30

I.3.2.Étude de la fraction F'3:.....	31
I.3.3.séparation et purification de la sous fraction f4:	33
II.Détermination du totat polyphénols et flavonoïdes :	36
II.1. Dosage des polyphénoles:.....	36
II.1.1.Principe de la réaction :	36
II.1.2.Protocole expérimentale::	36
II.2. Dosage des flavonoïdes totaux :	37
II.2.1.Principe de la réaction:	37
II.2.2.Protocole expérimentale::	37
III. Activité biologique:	39
III.1. Activité antioxydante: :	39
III.1.1.Activité anti-radicalaire au DPPH:	39
III.1.2.Activité du piégeage du cation radical ABTS ^{·+} ::.....	40
III.1.3.Activité du pouvoir réducteur (FRAP): :.....	41
III.1.4.Activité de de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² phenanthroline:	42
III.2. Activité enzymatique:.....	42
III.2.1. Activité inhibitrice de α amylase	42
<i>Références bibliographique</i>	44

Chapitre 3 Résultats et discussion

I .Identification structurale du composé P ₁ :.....	51
I .1. Comportement chromatographique:.....	51
I.2.. Données spectrométrie :	51
I.2.1. Données spectrométrie UV-Visible :	51
I.2.2. Données spectroscopiques RMN ¹ H :	53
I.3. L'hydrolyse acide :.....	55

II. L'étude quantitative de la plante étudiée:	56
II.1. Détermination du contenu total en polyphénols	56
II.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes.....	58
III. Activité antioxydant ::	59
III.1. Test de l'activité antiradicalaire au DPPH	59
III.2. Test de l'activité du piégeage du cation radical ABTS ^{•+}	61
III.3. Test de l'activité du pouvoir réducteur (FRAP)	62
III.4. Test de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² - phénantroline	64
IV. L'activité enzymatique :	67
IV.1. Activité inhibitrice de α amylase:	67
<i>conclusion général</i> :	68

Introduction
générale

Les humains ont toujours compté sur l'environnement pour se nourrir, se protéger et se soigner. Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remède pour la prise en charge des maladies humaines [1].

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurales et urbaines en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent [2], Malgré les grandes avancées de la science et de la médecine moderne au cours de ces dernières décennies, ces plantes continuent de contribuer de façon importante à l'amélioration de l'état de santé des populations, notamment celle des pays en développement [1].

Le monde végétal est la source majeure de médicaments, grâce à la richesse des produits métaboliques dits secondaires (les composés terpéniques, les saponines, les alcaloïdes, et les composés phénoliques).

Les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses études et de nouvelles approches pour valoriser les métabolites secondaires et les polyphénols en général, notamment dans la santé et la lutte contre les maladies malignes (cancer) et dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés, représentés par la famille des polyphénols, sont très recherchés pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, Anti-allergiques et anticancéreuses. On note que la forte efficacité de ces substances pour prévenir les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est principalement due à leur structure phénolique à groupements hydroxyles. A cet effet, le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement aux États-Unis est d'environ 1800, et les progrès dans le domaine des antioxydants sont encore plus marqués [3].

Dans ce contexte l'objectif globale de cette étude est l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, ainsi que l'activité antioxydante d'une plante de la famille des Rosacées. Le manuscrit est réparti en trois chapitre comme suit:

- Le premier chapitre est consacré à des généralités bibliographiques sur la famille des Rosacées et sur les flavonoïdes ainsi que des généralités sur l'évaluation de l'activité biologique antioxydantes et enzymatique.

Introduction générale

- Le deuxième chapitre consacré à la partie expérimentale comportant la description des travaux phytochimique et biologique.
- Le troisième chapitre comprend les résultats phytochimique et biologique.
- Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

❖ **Références bibliographiques**

- [1] Ouedraogo S., Yoda J., Traore T. k., Nitiema M., Sombie B.C., Diawara H. Z., Yameogo J. B.G., Djande A., Belemnaba L., Kini F. B., Ouedraogo S., Semde R., (2021). Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *Journal. Biol. Chem. Sci.* 15(2) : 750-772.
DOI : <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v15i2.28>
- [2] Hadjadj K., Benaissa M., Mahammedi M., Ouragh A., & Rahmoune A., (2019). Importance des plantes médicinales pour la population rurale du parc national de djebel Aissa (sud-ouest Algerien). *Lejeunia revue de botanique* N°199.
- [3] Small E., Catling P.M. Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario) ; Canada ; 2000 ; 281.

Chapitre I :

Aperçu

bibliographique

I. Rosales

L'ordre des Rosales renferme 09 familles et environ 7725 espèces. Les familles sont les Rosaceae, Les Rhamnaceae, Les Moraceae, Les Cannabaceae, Les Urticaceae et Les Ulmaceae, Les Elaeagnaceae, Les Dirachmaceae, Les Barbeyaceae [1]. Nous abordons ici la famille des Rosaceae.

I.1.Famille des Rosacées

I.1.1. Généralité

Rosacées est une famille botanique de l'ordre des Rosales qui comprend environ 3000 à 4000 espèces, et une centaine de genre.

La famille doit son nom au Rosier, et les pétales de certaines espèces sont utilisés pour préparer l'essence de rose. De nombreux genres ont des fruits comestibles : les prunes, les pêches, les cerises et les abricots [2].

La famille des Rosacées est une famille hétérogène qui comprend des herbes (Fraisier : *Fragaria vesca*) des arbustes (Rosier : *Rosa canina*) ou des arbres (cerisier : *Prunus vulgaris*) [3].



Fragaria vesca



Rosa canina



Prunus vulgaris

Figure 1 : quelques espèces appartenant à la famille des Rosacées [4].

I.1.2. Distribution géographique

La distribution géographique des Rosacées s'étend sur presque toute la surface du globe, mais de façon prépondérante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. [5] Les genres les plus importants sont *Potentilla*, *Cotoneaster*, *Rubus* et *Alchemilla*, *prunus*, *Sorbus*, *Crataegus*, *Rosa* [6], et d'autres genres comme les fraisier, les pommiers, les poiriers, les geum, etc., sont aussi ceux que l'on rencontre partout. Il y a cependant des genres qui sont propres à certaines régions : il y a que l'on rencontre qu'en Chine ou au Japon ; D'autres, en Amérique du Sud (Andes, etc.). Les arbres fruitiers cultivés, qui presque tous appartiennent à cette famille végétale, sont originaire de l'Iran et ont été transplantés un peu partout. Seul l'icaquier est originaire de l'Amérique équatoriale et a été trouvé aussi à l'état spontané dans l'Afrique centrale [2].

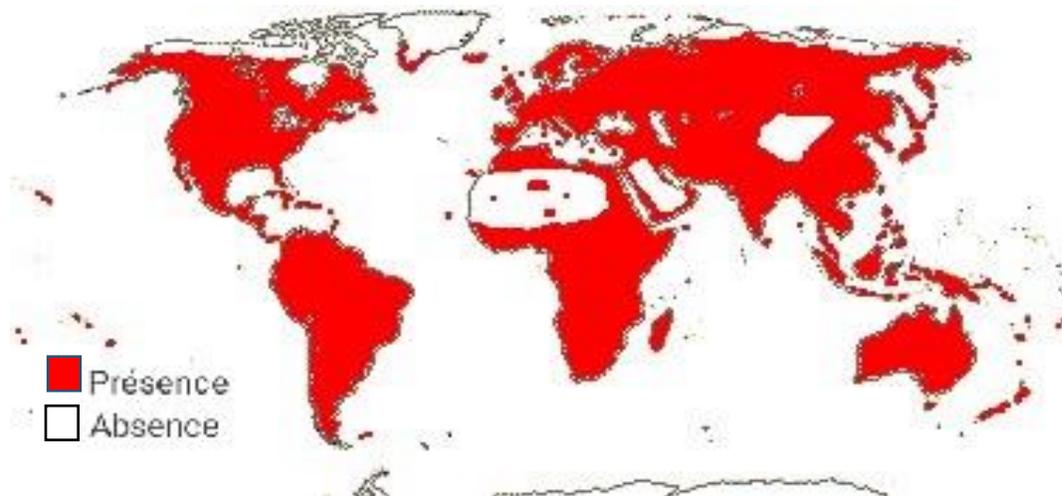


Figure 2 : Répartition géographique de la famille des Rosacées dans le monde [7].

I.1.3. Caractéristiques botaniques des Rosacées

Les plantes qui appartiennent à cette famille sont caractérisées par :

❖ **Appareil végétatif:**

- Les feuilles toujours alternes très exceptionnellement opposées et stipulées avec des folioles dentées parfois grandes ou petites.
- Les tiges sont dressées, plus rarement étalées ou rampantes. Elles sont dotées souvent de poils simples ou étoilés, comme les feuilles.
- Poils épidermiques, massifs et lignifiés transformés en aiguillons crochus et piquants [5].

❖ **Appareil reproducteur:**

- Les inflorescences sont variables. Il s'agit le plus souvent de grappes (ou des formes dérivées : épi, corymbe, panicule) [5].
- Les fleurs sont hermaphrodites, pentamère, actinomorphe et cyclique.
- Un calice persistant à 5 sépales libres ou soudés en tube dans une étendue variable.
- Une corolle composée de 5 pétales plus rarement 4 et insérés sur un disque plus au moins épais.
- Le gynécée est formé de carpelles libres en nombre variable ou de carpelles soudés donnant naissance à un ovaire à plusieurs loges [6 ,8].
- Les fruits sont très divers ; secs ou charnus, multiples ou simple, souvent très gros (pommes, poires, coings, etc.) [9].
- La formule florale des Rosacées : $5S+5P+n \times 5E+ 5C$ [5].

I.1.4. Classification

La position systématique de la famille des Rosacées [10] :

- Règne : Plantae
- Division : Angiospermae
- Classe : Magnolipsida
- Ordre : Rosales
- Famille : Rosaceae

I.1.5. Utilisations de plante

I.1.5.1. Médicinales :

Le tableau ci-dessous montre l'usage médical de certains types appartenant à la famille des Rosacées [8]

Tableau 1 : Quelques espèces appartenant à la famille des Rosacées et leurs utilisations médicales.

Espèces	Partie de plante	Intérêt médicinales
<i>Crataegus oxyacanth</i> et <i>Crataegus monogyna</i>	Fruit et Fleur	Cardiotonique Hypotenseur
<i>Fragaria vesca</i>	Feuille et Rhizome	Contre les troubles gastrine et rénaux. Anti diarrhée
<i>Prunus dulcis</i>	Graine	Anti inflammatoire Laxatif
<i>Prunus laurocerasus</i>	Feuille et Fruit	Antispasmodique Stimulant respiratoire
<i>Prunus africana</i>	/	Contre l'hyperplasie bénigne de la prostate.
<i>Filipendula ulmaria</i>	/	Anti inflammatoire Analgésique
<i>Rosa canina</i>	Fruit	Anti diarrhée Astringent

I.1.5.2. Économique (Alimentaires) :

Cette famille contribue à l'économie alimentaire, car elle est responsable de la production d'une grande partie des fruits largement consommés, nous trouvons en particulier [9] :



Prunier
(*Prunus domestica*)



Cerisier
(*Prunus cerasus*)



Pêcher
(*Prunus Persica vulgaris*)



Cognassier
(*Cydonia oblonga*)



Poirier Beurré Hardy
(*Pyrus communis Beurré Hardy*)



Abricotier
(*Prunus Armeniaca*)



Amandie
(*Prunus amygdalus, dulcis*)



Framboisier
(*Rubus idaeus*)



Cerisier bigarreau
(*Prunus avium*)

Figure 3 : Quelque fruits de la famille des Rosacées [11].

D'autres utilisation [9]:

- ✓ Distillation.
- ✓ Une source abondante de vitamine C.
- ✓ Produite de beauté (huile d'amande).

- ✓ Menuiserie intérieur et extérieur (industrie du meuble et de l'ébénisterie).
- ✓ Bonne source de bois de chauffage et de charbon.

I.1.6. Les principaux métabolites de la famille des Rosacées :

L'ensemble des réactions chimiques qui se produisent dans tout organisme vivant sont appelé **le métabolisme** (du grec : métabole, changement) est un processus très dynamique [12]. Chez les végétaux on peut distinguer deux types : métabolites primaires et secondaire.

Les métabolites primaires sont les molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaire à la vie de plante (Croissance, Reproduction, Développement). Ils sont à la base de la machinerie moléculaire de la cellule. Le plus important de ces métabolites : Glucides, Lipides et Protéines [12].

Les métabolites secondaires sont des produits chimiques d'un groupe taxonomique particulier, qui sont soit des produits finaux, ou des déchets du métabolisme, soit des substances de réserve pour une mobilisation réorientée. Ils ne jouent aucun rôle dans le métabolisme primaire [13].

On distingue classiquement quatre grandes catégories de métabolites secondaires chez les plantes : les composés terpéniques, les saponines, les alcaloïdes, et les composés phénoliques [12,13].

- **Les terpènes** : appelés aussi les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une unité simple à 5 atomes de carbone, isoprène (C_5H_8) [12].

On peut classer tous terpènes en fonction du nombre de leur unités isoprène : monoterpénoïde (2 unités isoprène) diterpénoïdes (4 unités terpènes). Les terpénoïdes jouent plusieurs rôles chez les plantes, certains sont des pigments photosynthétiques ou des hormones et autres sont utilisés en tant que composants de la structure des membranes ou transporteurs d'électrons [14].

Il existe aussi des glycosides terpéniques [13], ou appelés **les saponines**, qui sont des composés terpéniques. La combinaison d'un triterpène hydrophobes et d'un glucide hydrophile confère aux saponines des propriétés tensioactives [12].

- **Les alcaloïdes** : formant un groupe très large, sont des composés azotés c'est à dire possèdent presque tous une molécule d'azote (-N—) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées [15].

Les alcaloïdes sont hétérocycles dérivent des acides aminés, et caractérisés par la solubilité dans l'eau [12].

- **Les composés phénoliques** ou les polyphénols ou les dérivés phénylptopanoïdes, forment une grande famille de composés chimiques très divers depuis les acides phénoliques jusqu' aux grandes polymères complexes [12], ils contiennent tous un groupement hydroxyle (OH) attaché à un cycle aromatique et se retrouvent dans toutes les plantes et dans toutes leurs parties [14]. Principaux sont les flavonoïdes, les tanins et la lignine.

Dans notre étude nous mettrons en évidence un des composés phénoliques des métabolites secondaires précisément les flavonoïdes.

II. Les flavonoïdes

II.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [16], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ;(flavus = jaune) [17].

Les flavonoïdes ont été découverts par Albert Szent-Gyorgyui en 1936 ,désignés sous le nom de vitamine P [17], Du fait de leur efficacité dans la normalisation de la perméabilité des vaisseaux sanguins [18], Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées[19].

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le

thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydants, vasculoprotectrices, Antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, Anti-ulcéreuses et même Anti-tumorales significatives [19].

II.2. Définition et structure chimique :

Les flavonoïdes sont des produits chimiques appartiennent au groupe des composés phénoliques et constituent un groupe important de métabolites secondaires en raison de leur propriété biochimique [20]. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [21].

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carbone de 15 atomes de carbone composé de deux cycles aromatique (appelés les cycles A et B) reliés par une unité à trois carbones (qui forme généralement un troisième cycle appelé le cycle C) [22].

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de trois unités, $C_6-C_3-C_6$ [20], formant ainsi une structure diphényl-propane dont l'unité centrale est une benzo- γ -pyrone. De multiples groupes hydroxyle, sucre, oxygène ou méthyle sont attachés à cette structure centrale [17].

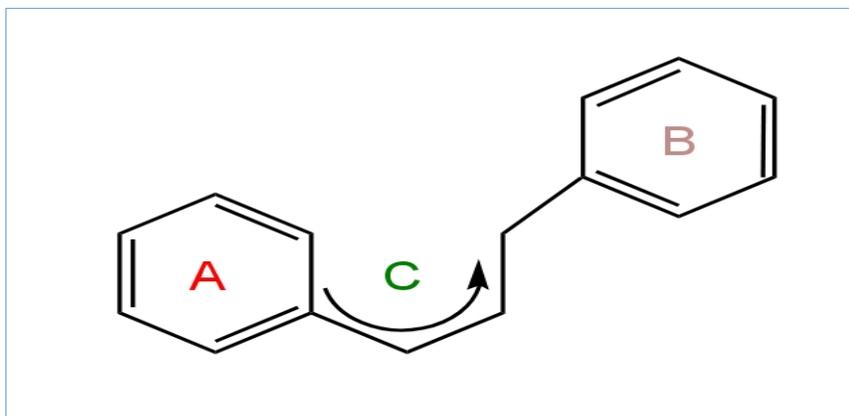


Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes.

II.3. Biosynthèse des flavonoïdes :

Le cycle B et la chaîne à trois carbone (cycle C) sont issus de la voie de l'acide shikimique via la phénylalanine et l'acide p-coumarique. Les six atomes de carbone du cycle A dérivent de l'acide malonique, sous la forme d'un complexe malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA). L'enzyme clé est la chalcone synthase (CHS) qui provoque la condensation séquentielle de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule de p-coumaroyl-CoA, formant de la naringénine-chalcone. Une chalcone est une séquence C6-C3-C6 dans laquelle le cycle C n'est pas encore fermé [12].

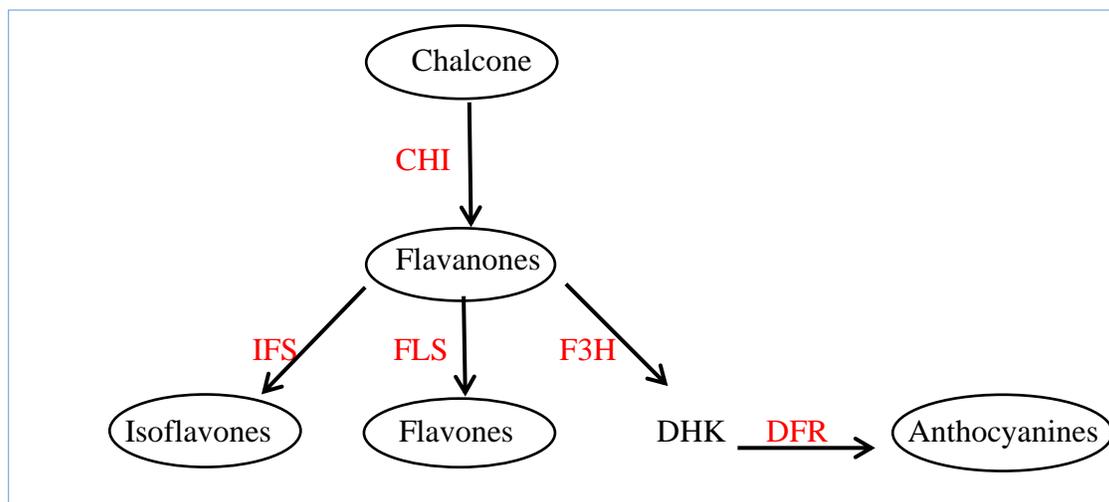


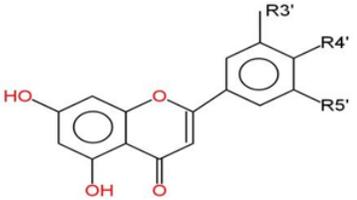
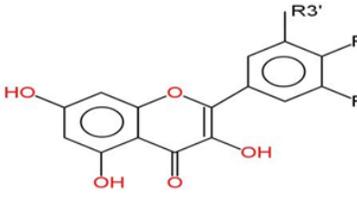
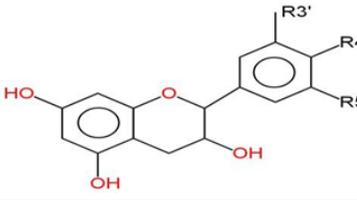
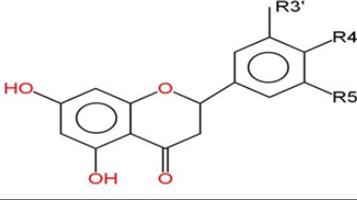
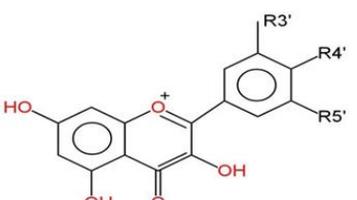
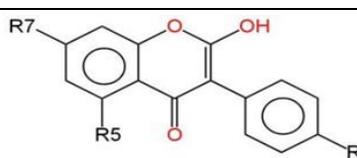
Figure 5 : Voie de synthèse des flavonoïdes [23].

CHI : chalcone isomérase, FLS : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, F3H : flavone-3-hydroxylase, DFR : dihydroflavone réductase.

II.4. Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs classe de molécules sont : Les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les Anthocyanidines, les isoflavones. Indique dans le tableau suivant.

Tableau 2 : Principales classes des flavonoïdes [24,25].

Classes	Structures chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

Donc structurellement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécule selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C [26]. Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire [27,28].

II.5. Identification des flavonoïdes :

II.5. 1. Techniques d'identification de structure :

L'identification des flavonoïdes utilise généralement une combinaison de propriétés chromatographiques des flavonoïdes, telles que la fluorescence sous lumière UV-Vis et sous lumière de Wood, les valeurs Rf dans divers systèmes de solvants. Aussi elle est réalisée par Plusieurs techniques spectroscopiques, comme la spectrophotométrie UV-Vis, la résonance magnétique nucléaire (RMN) [29,30].

II.5.1.1 Facteur de retard et comportement chromatographique

Ce facteur, noté Rf, est défini comme le rapport de la distance entre la tache de produit et l'origine et la distance entre l'origine et le front de solvant.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

La valeur Rf dépend du type de solvant utilisé (organique ou aqueux), du type de support chromatographique (silice, polyamide, cellulose), de la morphologie du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), et de la disposition des différents substituant sur le squelette flavonique. Le tableau 3 montre l'effet de la substitution du squelette de flavone sur les valeurs Rf [29,30] :

Tableau 03 : La relation entre Rf et la structure flavonique.

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupes hydroxyles	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.
Méthylation des hydroxyles	Rf augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux.
Glycosylation	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

II.5.1.2. Coloration sous UV (la fluorescence sous la lumière de Wood).

L'examen des flavonoïdes sous lumière UV 365 nm est souvent utilisé pour leur détection. Tous les flavonoïdes apparaissent sous forme des taches colorées sous UV, fournissant des informations pour déterminer leur structure [31]. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique :

Tableau 04 : relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structure flavoniques.

la fluorescence	Les structures
Violette noire	Flavones avec 5, 6, 7 ou 5, 7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR Chlacones
Bleue	Flavone ou Flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Bleu-verte	Flavanone sans 5-OH

II.6. Identification spectrale

II.6.1. Spectrophotométrie UV-Vis

C'est la méthode la plus importante pour l'identification partielle des structures de flavonoïdes. Il repose essentiellement sur l'enregistrement de spectres en milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) caractérisé par deux bandes principales d'absorption. (Fig 6) [31].

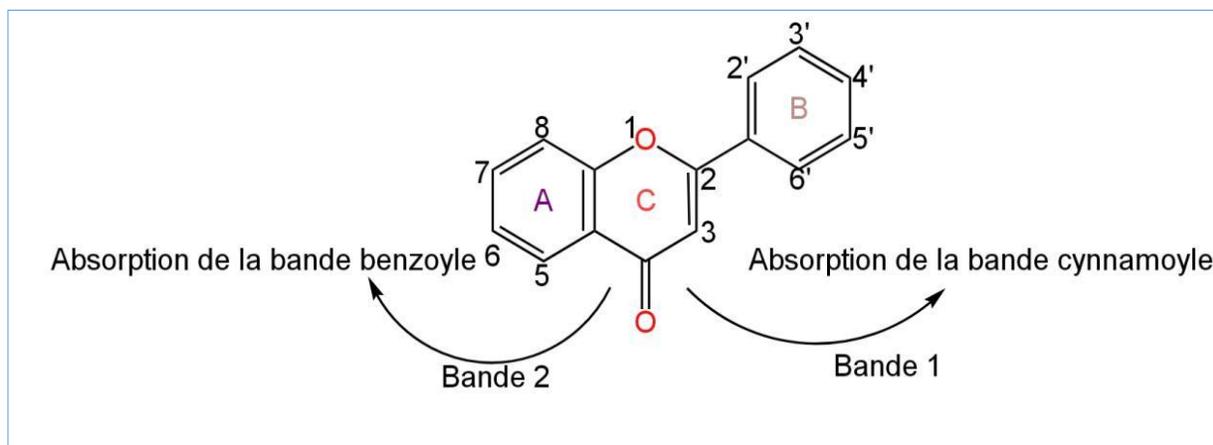


Figure 6 : les deux bandes d'absorption des flavonoïdes.

La bande I :

Le maximum d'absorption à 300–400 nm est attribué à l'absorption du système cinnamoyle due à la conjugaison du groupe carbonyle avec la double liaison C₂-C₃ et le noyau B, éclairant ainsi les changements conformationnels du cycle B et hétérocycle C [32].

La bande II :

Il existe un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, qui est attribué à l'absorption du système benzoyle résultant de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A, éclairant les changements structuraux du cycle A.

Le tableau 5 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes :

Tableau 5 : Position des bandes I et II en fonction du type de flavonoïdes.

Type de flavonoïdes	Bande I , λ_{\max} (nm)	Bande II, λ_{\max} (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Isoflavones	310-330	245-275
Flavanoneset dihydroflavanols	300-330	275-295
Chalcones	340-390	230-370 faibles intensités
Aurones	380-430	230-370faibles intensités

❖ **Le spectre UV en présence de réactifs :**

L'ajout de divers réactifs aux flavonoïdes permet la localisation de substituants sur le squelette des flavonoïdes, où la présence d'hydroxyles libres provoque généralement un effet bathochrome (passage à des longueurs d'onde plus longues). Les réactifs souvent utilisés sont : NaOH, NaOAc, NaOAc + H₃BO₃, AlCl₃ et AlCl₃+HCl. Certains d'entre eux forment des complexes tels qu'AlCl₃ et NaOAc.

Le déplacement exact et l'intensité des deux bandes I et II du spectre effectuée dans le méthanol illustrent la nature de la structure du flavonoïde ainsi que sa substitution, conformément au tableau 6.

Tableau 6 : Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II après l'addition des différents réactifs.

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

II.6.2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

C'est une méthode très précise et très efficace, elle est trouvée un grand emploi pour la détermination des flavonoïdes [33].

II.6.2.1. La RMN du proton (RMN ^1H) :

Elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître :

- ✓ Position et nombre de protons différents portés par les flavonoïdes.
- ✓ Le nombre de substituants méthoxyle sur le squelette flavonique.
- ✓ Le nombre et le type de sucres attachés à l'aglycone.

II.6.2.2 RMN du carbone (RMN ^{13}C) :

Donne des informations utiles et parfois nécessaire pour mieux identifier la molécule telle que [31] :

- ✓ Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
- ✓ Connaissance des types de liaisons sucre -C- et/ou -O-.

II.7. L'hydrolyse acide des glycosides :

Pour connaître la nature du sucre avec les O-glycosides, on a recours à l'hydrolyse acide qui permet la rupture de la liaison entre l'aglycone et le sucre ainsi extraire le sucre et identifier par CCM, en présence de plusieurs sucres témoins à noter que les C- glycosides sont résistants à l'hydrolyse acide.

On prend un volume de P_1 dans un tube à essai, au quel on rajoute le même volume d'une solution HCl (4N), on fait chauffer dans un bain-marie à 100°C pendant 1 heure.

Ensuite, on procède à des extractions liquide-liquide avec :

- ✧ L'éther diéthylique (3fois)
- ✧ Acétate d'éthyle(3fois)

✧ Le *n*-Butanol (1 seul fois)

Lorsqu'on termine, la phase aqueuse doit être chassée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite.

L'identification du sucre se fait par chromatographie :

Sur plaque de gel de silice aspergée avec NaH_2PO_4 puis séchée dans l'étuve à 100°C durant 1 heure, on réalise des piqûres correspondant aux sucre témoins et à la phase aqueuse de produits testés.

Cette plaque éluée dans un système :

Acétone /eau (9 ;1, v/v).

Après séchage de la plaque, on l'asperge encore par un mélange de :

- ✧ 1 g d'acide malonique.
- ✧ 3 mL d'acide phosphorique concentré.
- ✧ 1 mL d'aniline.
- ✧ 100 d'éthanol.

III. Dosages des phénols

Comme mentionné précédemment, les phénols sont les éléments les plus importants du groupe biochimique des plantes médicinales internationales (métabolisme secondaires des plantes), qui sont souvent adoptés dans fabrication de nombreux médicaments [34]. Par conséquent, connaître leur quantité exacte est nécessaire pour déterminer l'étendue de cette efficacité thérapeutique.

La détermination des concentrations des phénols totaux de l'extrait brut est effectuée à l'aide des plusieurs méthodes différentes pour plusieurs scientifiques.

III.1. Dosage des composés phénoliques totaux :

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg d'EAG/g MVS) [34].

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

La concentration des flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg d'EQ/g MVS) [34].

IV. Activités biologiques

IV.1. Activité antioxydant :

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [35].

❖ Les radicaux libres :

Un radical libre est une entité chimique (atome ou molécule), possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) [36].

❖ Les antioxydants :

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ERO (espèces réactives de l'oxygène). Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule [37].

IV.1.1. Principaux antioxydants :

A. Antioxydants endogènes (Enzymatique) : la catalase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase [38,39].

B. Antioxydants exogènes (Non enzymatique) :

1. Les vitamines :

Vitamine C, Vitamine E, β -Carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques [40,41,42].

IV.1.2. Mécanismes d'action des antioxydants [43].

Mécanisme d'action des antioxydants sont divers :

- Incluant le captage de l'oxygène singulier.
- La désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente.
- La réduction de radicaux ou de peroxyde.
- La chélation des métaux de transition

IV.1.3. Principaux tests d'activité antioxydant :

IV.1.3.1. Inhibition du radical stable DPPH :

Le composé 2,2-diphényl-1-picrylhyrazyl (DPPH) a été découverte en 1922[44] a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [45], est une molécule stable soluble dans le méthanol caractérisée par sa couleur violet foncé (fig7) avec un maximum d'absorption à 515 nm [46], Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote [45], lorsqu'il est réduit par un antioxydant ou une espèce radicale (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), la coloration devient incolore ou jaune pâle qui pourrait être facilement surveillée avec un spectrophotomètre. Ce test est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante d'extraits bruts ou de composés purifiés de plantes [46].

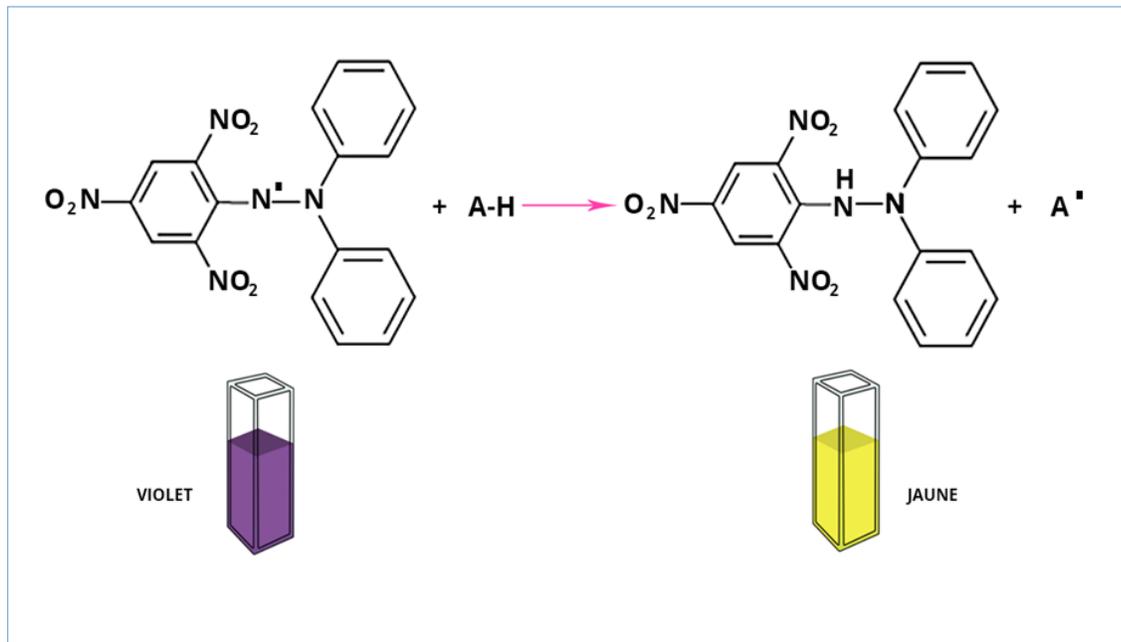


Figure 7 : Équation du radical DPPH transformé en DPPH

IV.1.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+}

L'activité ABTS a été déterminée par la méthode de [47]. Cette technique implique la production directe du chromophore ABTS^{•+} bleu/vert par une réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium. Ceci a des maximums d'absorption aux longueurs d'onde 645,734 et 815 nm. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la consommation du radical ABTS^{•+} suite à l'addition d'un échantillon antioxydant. Ce dernier réagit avec ABTS^{•+} (en excès) par transfert d'électrons pour redonner l'ABTS incolore (Figure 8) [48].

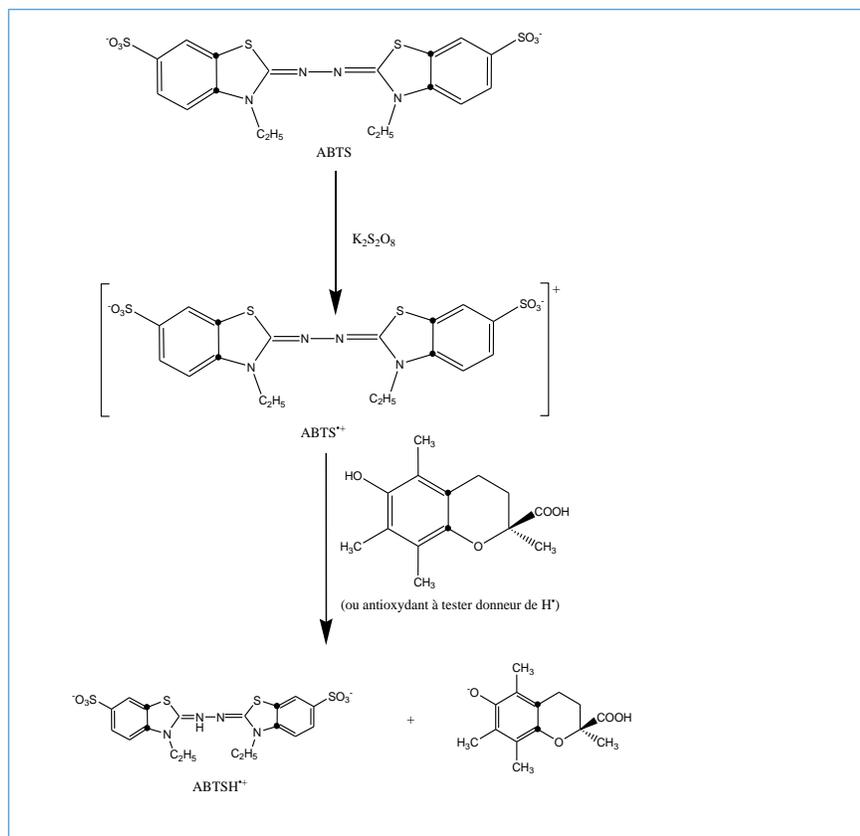


Figure 8 : Formation et piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H⁺ [49].

IV.1.3. 3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{+2}) et la formation de ferrocyanure de potassium ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Figure9) [50].

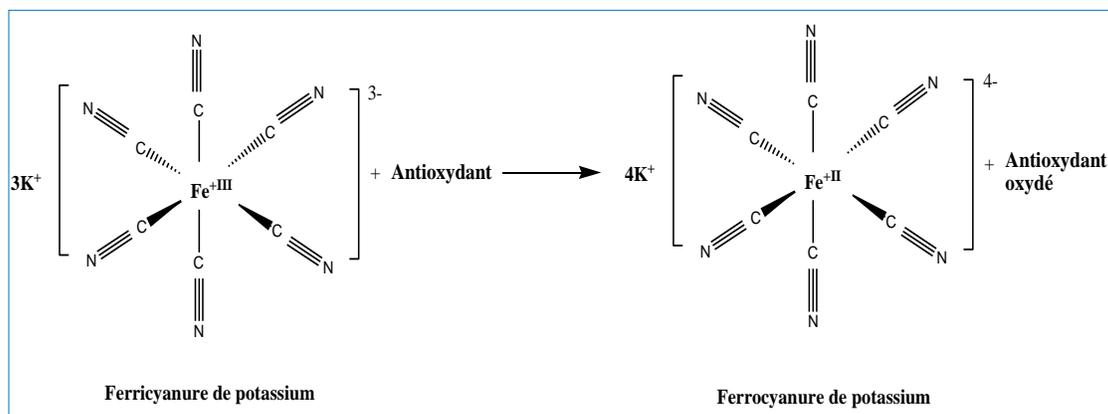


Figure 9 : Mécanisme réactionnel du test FRAP [49].

Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue/verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant [51]. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance est directement reliée à l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

IV.1.3.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺²- phénantroline

Le complexe Fe (II)-phénantroline est largement appliqué dans la méthode spectrophotométrique classique pour la détermination du fer [52]. Cette technique est basée sur la formation du complexe Fe⁺²-phénantroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction (Figure 10). Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm [53].

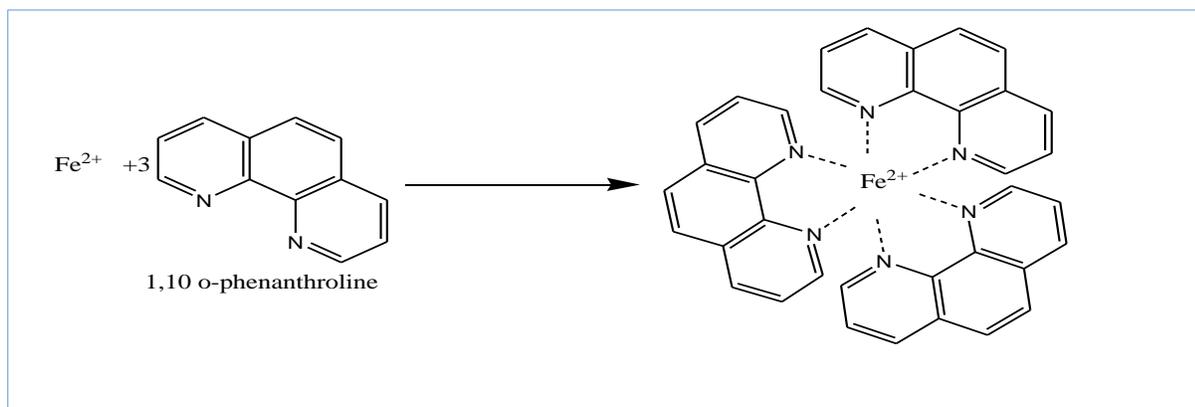


Figure 10 : Formation du complexe Fe⁺²-phénantroline [54].

IV.2. Activités enzymatiques

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle clé dans les réactions biochimiques nécessaires à la croissance, à la maturation et à la reproduction des organismes. Leur quantification par la mesure de l'activité catalytique dans des échantillons biologiques est importante dans divers domaines [55].

IV.2.1. Evaluation de l'activité antidiabétique :

Les inhibiteurs antidiabétiques synthétiques actuellement utilisés provoquent des effets secondaires gastro-intestinaux tels que diarrhée, gaz et ballonnements. Par conséquent, les inhibiteurs naturels de l' α -amylase peuvent être utilisés en thérapeutique pour traiter l'hyperglycémie postprandiale avec des effets secondaires minimes [56].

III.2.1.1. Inhibition de l'alpha amylase :

L' α -amylase est une enzyme digestive produite par les glandes salivaires et le pancréas, et également synthétisée dans les fruits lors de la maturation des plantes. C'est l'une des endoamylases les plus importantes et elle hydrolyse les liaisons α (1-4) glycosidiques dans les chaînes d'amidon pour produire des molécules de maltose (disaccharides α -glucose). Cette enzyme est importante pour l'absorption et la digestion des amidons et des glucides dans les aliments et peut être une cible thérapeutique pour le diabète de type 2.

Les inhibiteurs naturels de l' α -amylase, tels que les flavonoïdes et les phénols végétaux, ont été proposés comme approches alternatives pour la prévention et le traitement du diabète de type 2 avec peu ou pas de risque d'effets secondaires [57].

Chapitre II

Matériel

et Méthodes

I. Étude phytochimique de la plante :

I.1. Récolte du matériel végétale :

La plante a été récoltée dans la région de Constantine au mois de mai 2021 après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires la partie aérienne a été broyée et pesée ($m=679\text{g}$).

I.2. Extraction de la plante :

Une masse de 679 g de la matière végétale a été macérée dans un mélange hydralcoolique (EtOH/ H₂O, 7/3, v/v) à température ambiante pendant 48 heures. La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après concentration à une température ne dépassant pas 40°C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée.

Après une nuit de repos, la solution est filtrée et la phase aqueuse résultante est évacuée successivement des extractions liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole puis le chloroforme après l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.



Figure 11 : Les différentes étapes de macération, de filtration, d'évaporation et de l'extraction liquide-liquide de l'extrait hydralcoolique d'une plante de la famille des Rosacées.

Les phases organiques récupérées sont évaporées sous pression réduite à sec et pesées.

Le tableau 7 présente les masses des extraits obtenues.

Tableau 7 : les masses des extraits obtenues.

Extrait	Masse (g)
Éther de pétrole	0,05g
Chloroforme	0,69g
Acétate d'éthyle	4,39g
<i>n</i> -butanol	17,24g

La figure suivante résume l'ensemble des opérations de l'extraction de la plante.

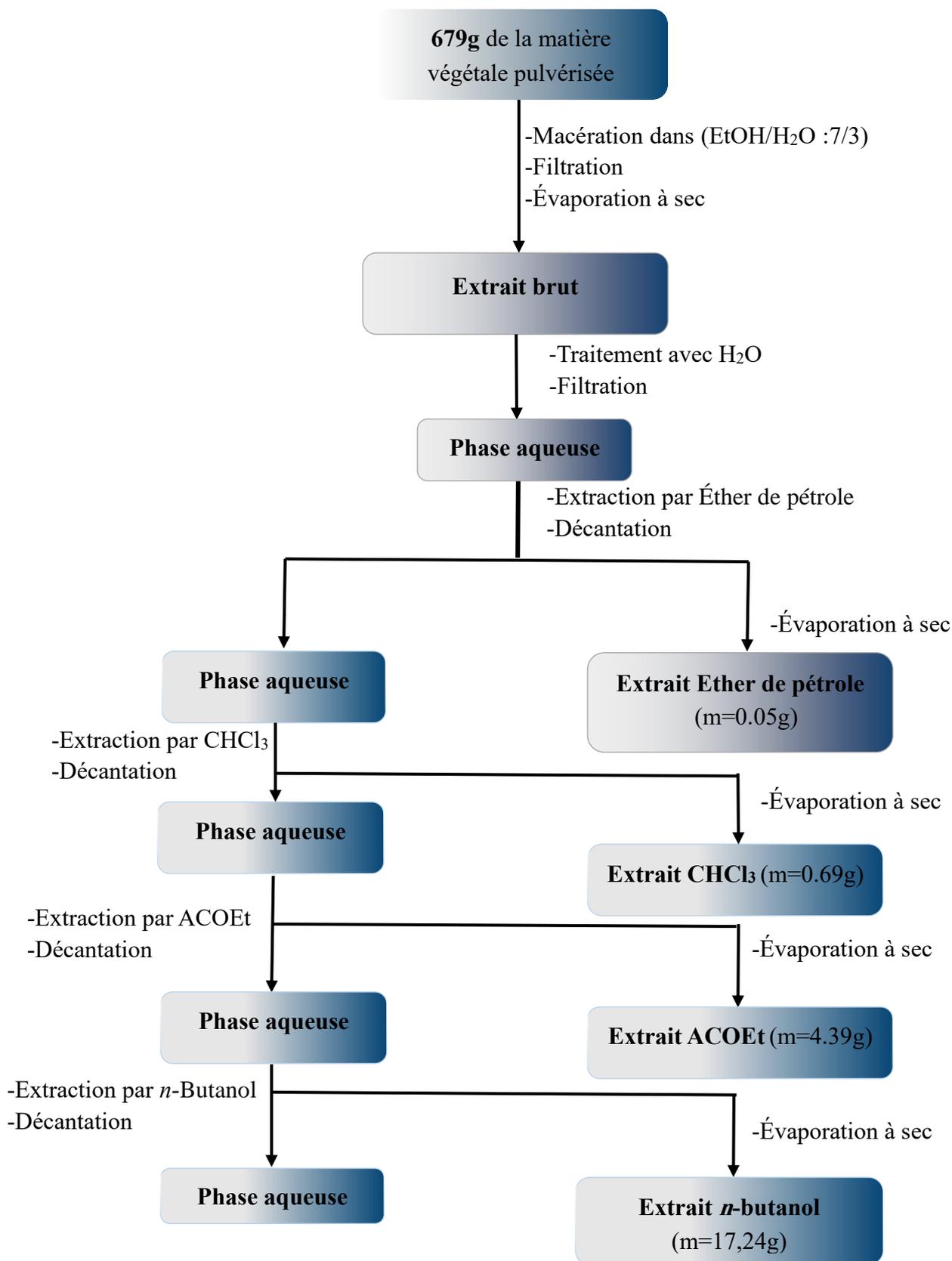


Figure 12 : Le protocole d'extraction de la plante.

I.3. Séparation et purification :

Les analyses par les plaques CCM des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol montrent la richesse de la phase *n*-butanol en flavonoïdes.

I.3.1 Fractionnement de l'extrait *n*-butanol par VLC sur gel de silice :

L'extrait brut (15g) est dissout dans le minimum de méthanol puis déposé sur VLC de gel de silice en phase inverse (Rp18) éluée avec un gradient de polarité du système H₂O : MeOH (80/20,70/30,60/40,50/50,40/60,30/70,20/80, 0/100) chaque système répété 3 fois, des tests chromatographique CCM ont été utilisés, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées avec un mélange acide acétique, d'acide sulfurique et de l'eau (80/16/4).



Figure 13 : montage montre la processus VLC.

Tableau 8 : Résultats du fractionnement de l'extrait *n*-butanol par VLC

N° de la fraction	Nom de la fraction	Système d'éluion		Observation
		H ₂ O%	MeOH%	
1-3	F ₁	80	20	Mélange de produits
4-6	F ₂	70	30	Mélange de produits
7-9	F ₃	60	40	Mélange de produits flavoniques
10-12	F ₄	50	50	Mélange de produits flavoniques
13-15	F ₅	40	60	Mélange de produits
16-18	F ₆	30	70	Mélange de produits
19-21	F ₇	20	80	Mélange de produits
22-24	F ₈	10	90	Mélange de produits
25-27	F ₉	0	100	Mélange de produits

Les fractions similaires ont été regroupées en fonction de leurs profils en CCM visualisé sous la lampe UV (254 et 365 nm). Parmi les fractions obtenues, nous nous sommes intéressés à la fraction **F'3** qui est simple et séparable.

I.3.2. Étude de la fraction **F'3** :

La fraction **F'3** (**5,03g**) a subi une chromatographie sur colonne de gel de polyamide préparé dans le toluène, le système d'élution utilisé est le toluène/méthanol d'une polarité croissante, des fractions de 125 mL ont été collectées.

Tableau 9 : Résultats de séparation de la fraction **F'3** par chromatographie sur colonne

Lot de fraction	Système d'élution	
	Toluène%	MeOH%
0-3	100	0
4-16	98	2
17-39	95	5
40-57	90	10
58-107	85	15
108-143	80	20
144-168	75	25
162-184	65	35
185-189	40	60
190-192	0	100



Les fractions obtenues ont été analysées par CCM avec différents systèmes :

- ✧ **Système 1** : (CH₂Cl₂/MeOH) (9,5/0,5) (v/v).
- ✧ **Système 2** : (AcoEt/MeOH/H₂O) (10/1/0,5), (10/1,5/0,5), (10/2/0,5), (10/2,5/0,5)

Ces fractions sont visualisées sous la lampe UV (254 et 365nm) et révélées dans un mélange d'acide sulfurique, acide acétique et de l'eau.

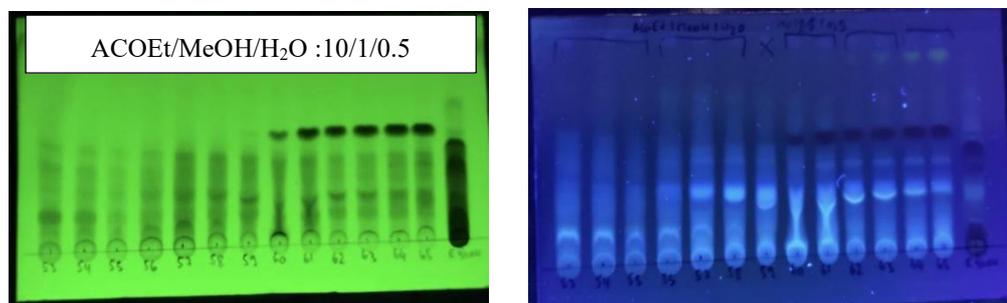


Figure14 : plaques CCM de quelques fractions obtenues par chromatographie sur colonne sous la lampe UV (254 et 365nm).

Le tableau 10 résume le regroupement final des fractions obtenues.

Tableau 10 : Résultat du regroupement final des fractions.

Lot de fraction	N° de la fraction	Observation
0-8	f ₁	Graisses et cires
9-15	f ₂	Mélange de compés en petites quantités
17-59	f ₃	Mélange de compés en petites quantités
60-66	f ₄	Mélange de produits séparable
67-73	f ₅	Mélange séparable
74-91	f ₆	Mélange séparable
92-98	f ₇	Mélange séparable
99-112	f ₈	Mélange séparable
113-129	f ₉	Mélange non séparable
130-137	f ₁₀	Mélange non séparable
138-165	f ₁₁	Mélange non séparable

Nous nous sommes intéressés à la fraction f₄ à cause de sa simplicité.

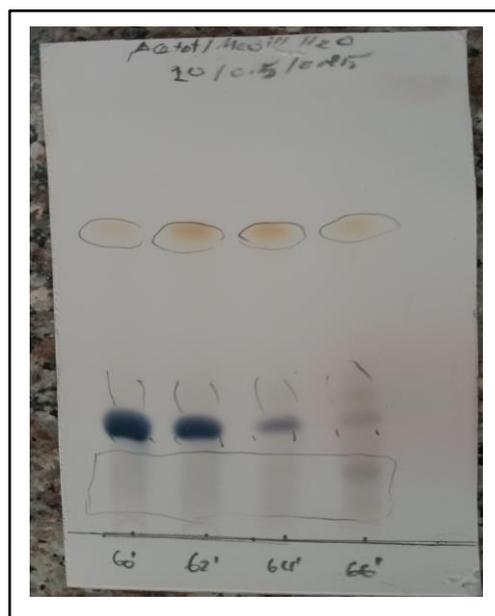


Figure15 : plaque CCM du regroupement de la sous fraction **f₄**

I.3.3. Séparation et purification de la sous fraction **f₄ :**

Une masse de 240 mg de cette sous fraction a été subi une deuxième séparation sur colonne iso-cratique de gel de silice, l'éluion est réalisée par le système (AcOEt/MeOH/H₂O) (10/0,5/0,25) (v/v).

Le suivi de la séparation et le rassemblement finale des fractions sont présentés dans le tableau11.

Tableau 11 : Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de la sous fraction **f₄**

systeme	Lot de fraction	N° de la fraction	Observation
Iso-cratique AcOEt/MeOH/ H₂O 10/0,5/0,25	1-4	f₄₋₁	Produits en faible quantité
	5-6	f₄₋₂	Produits en faible quantité
	7-13	f₄₋₃	Produit pure (P₁)
	14-18	f₄₋₄	Mélange des deux produits P₁ et P₂
	19-30	f₄₋₅	Produit pure (P₂)
	31-50	f₄₋₆	Mélange non séparable



Cette separation nous a conduit à séparer deux produits purs **P₁** et **P₂**.

La figure 16 résume les différentes étapes de séparation de l'extrait *n*-butanol.

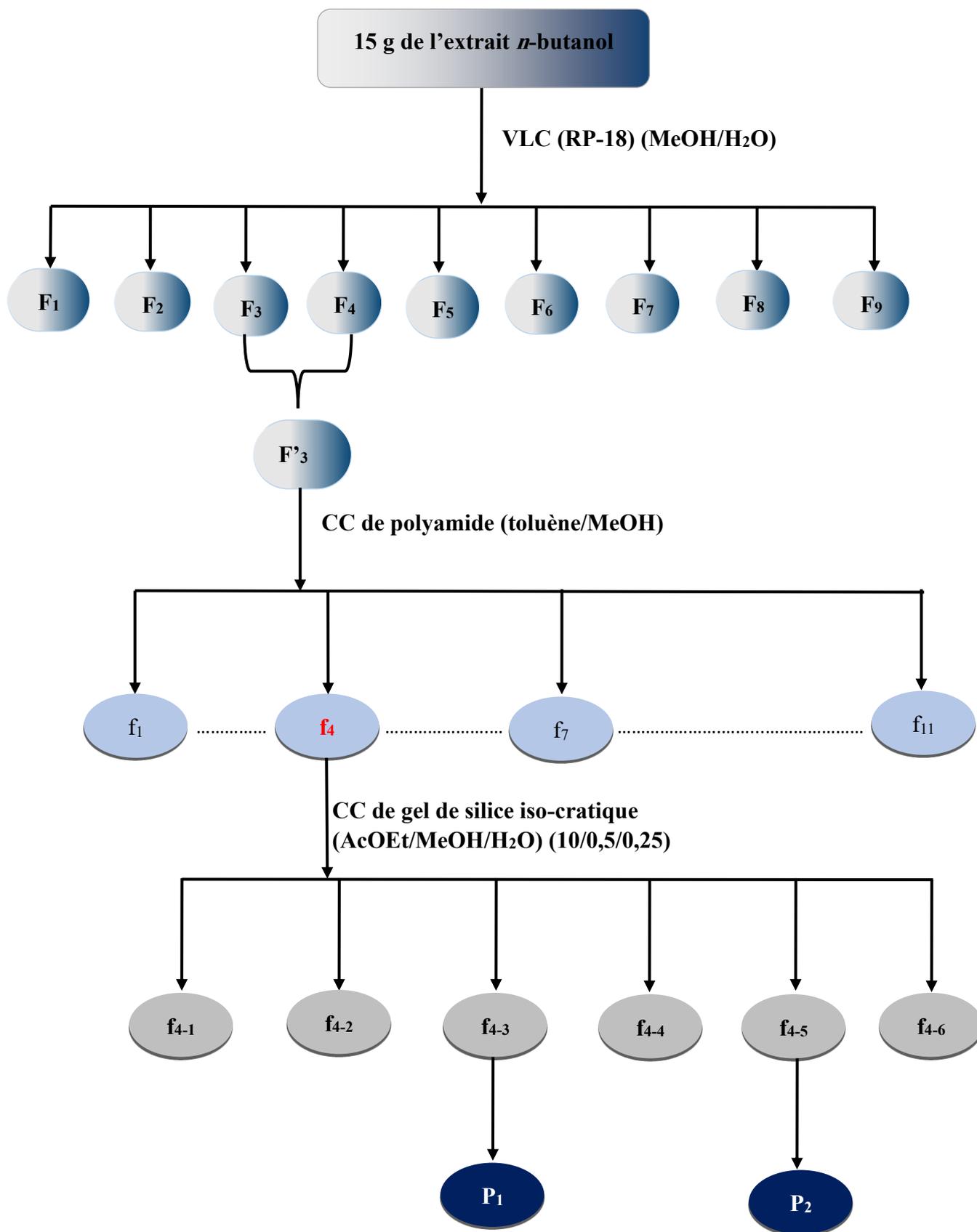


Figure16 : Schéma résume les différentes étapes de séparation de l'extrait *n*-butanol

II. Détermination du total polyphénols et flavonoïdes :

II.1. Dosage des polyphénoles :

II.1.1. Principe de la réaction :

Selon la méthode de dosage micro-plaque décrite par Muller [58]. Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

II.1.2. Protocole expérimentale:

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

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

- **Préparation de échantillon:**

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

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

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

- **Procédure:**

20 μ l d'extrait de plante avec 100 μ l de FCR dilué (1 :10) et 780 μ l de carbonate de sodium (7,5%) puis mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h après lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol.

- **Gamme d'étalonnage:**

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique :**

On prend 1 mg de l'acide gallique et on le dissolvé dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S_1 (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme suit :

Tableau 12 : les dilutions préparées de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.

Les dilutions	Les concentrations
25µg/ml	25µl de S1+ 175µl de MeOH
50 µg /ml	50µl de S1+ 150µl de MeOH
75µg/ml	75µl de S1+ 125µl de MeOH
100µg/ml	100µl de S1+ 100µ de MeOH
125µg /ml	125µl de S1+ 75µl de MeOH
150µg /ml	150µl de S1+ 50µl de MeOH
175 µg /ml	175µl de S1+ 25µl de MeOH
200µg /ml	200µl de S1

- **Procédure:**

20µl de chaque dilution sont transférés dans une micro-plaque avec 100 µl FCR (1 :10) et 80µl de Na₂CO₃ (7,5%) puis incubation pendant 2h après lecture à 765nm.

II.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

II.2.1. Principe de la réaction :

Le dosage des flavonoïdes totaux est déterminé selon la méthode de Topçu [59], Utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur micro-plaque 96 puits. Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al⁺³ et les flavonoïdes.

II.2.2. Protocole expérimentale:

- **Préparation des solutions:**

Pour 1M Potassium acétate (CH₃COOK) on dissout 9.80 g de (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution S₁.

Pour 10% nitrate d'aluminium (Al (NO₃)₃, 9H₂O) on pèse 10g de ce produit dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de l'échantillon:**

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

- **Procédure:**

50 μ l extrait de plante (S2) avec 130 μ l (MeOH) et 10 μ l (S₁) (CH₃COOK) puis 10 μ l (Al (NO₃)₂, 9H₂O) après 40 min en fait la lecture à 415 nm par lecture micro-plaque. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μ l extrait avec 150 μ l méthanol).



Figure 17: lecture micro-plaque

- **Gamme d'étalonnage:**

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de la Quercetin :**

On prend 1 mg de la Quercetin et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2 mg/ml. Les dilutions sont préparées dans des Eppendorf comme suit :

Tableau 13 : les dilutions préparées de la gamme d'étalonnage de la Quercetin

Les dilution	Les concentrations
25µg/ml	25µl de Sm+ 175µl de MeOH
50 µg /ml	50µl de Sm+ 150µl de MeOH
75µg/ml	75µl de Sm+ 125µl de MeOH
100µg/ml	100µl de Sm+ 100µ de MeOH
125µg /ml	125µl de Sm+ 75µl de MeOH
150µg /ml	150µl de Sm+ 50µl de MeOH
175 µg /ml	175µl de Sm+ 25µl de MeOH
200µg /ml	200µl de Sm

● **Procédure:**

50 µl de chaque dilution sont transférés dans une micro-plaque 96 puits avec 130 µl (MeOH) et 10 µl (S_i) (CH₃COOK) puis 10 µl (Al (NO₃)₂, 9H₂O) après 40 min en fait la lecture à 415 nm.

III. Activité biologique :

III.1. Activité antioxydante :

L'étude de l'activité antioxydante des extraits (*n*-butanol, Chloroforme, Acétate d'éthyle, éthanol) a été testée selon quatre méthodes : piégeage du radical libre DPPH, pouvoir réducteur (FRAP), réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phenanthroline, piégeage de l'ABTS.

III.1.1. Activité anti-radicalaire du DPPH :

a. Principe de la réaction:

L'activité de piégeage des radicaux libres a été menée selon la méthode de Blois [60]. L'acide ascorbique et Trolox sont utilisés comme standards antioxydantes.

b. Protocole expérimentale:**● Préparation de DPPH:**

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm à 517 nm dans le spectrophotomètre.

● Préparation des solutions mères de concentration 4mg/ml :

On mélange 4mg de chaque extrait avec 1 ml de MeOH absolu dans un eppendorf.

● Procédure:

40 µl/1ml MeOH de l'échantillon à différentes concentrations ont été déposés sur une micro-plaque à 96 puits, puis on ajoute 160 µl de DPPH à chaque puits.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol, après incubation pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante, L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{DPPH}\% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}}$$

III.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+} :**a. Principe de la réaction:**

Ce test est déterminé selon la méthode de Re [61], avec une légère modification le radical ABTS^{•+} est produit par l'oxydation de l'ABTS, par le persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert bleu. Le radical formé est stable.

b. Protocole expérimentale:**● Préparation de L'ABTS^{•+}:**

Mélange 19,2 mg (7 mM) de l'ABTS avec 5 ml H₂O et 3,3 mg (2.45 mM) de persulfate de potassium (K₂S₂O₈) avec 5 ml de H₂O et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16h, L'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (éthanol ou H₂O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

● Procédure:

160 de la solution ABTS^{•+} ont été ajoutée à 40 µL de différentes concentrations de l'extrait étudié après incubation pendant 10 min, L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm.

III.1.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) :**a. Principe de la réaction:**

L'activité du pouvoir réducteur est déterminée par la méthode de Oyaizu [62] avec une légère modification, Basée sur la réaction chimique de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺.

b. Protocole expérimentale:**● Préparation de l'acide tri-chloroacétique à 10% :**

1 g de TCA et sont dissouts dans 10 ml d'eau distillé.

● Préparation de potassium ferricyanide à 1% :

1 g de K₃Fe(CN)₆ et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

● Préparation de ferric chloride à 0,1% :

0,1 g de FeCl₃ et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

● Procédure:

10 µl de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 40 µl d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50 µl d'une solution de potassium ferricyani K₃Fe(CN)₆ (1%) , L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 µL de l'acide tri-chloroacétique (TCA) à 10%, 40 µL d'eau distillée et 10 µL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl₃ à 0,1% sont additionnés. La lecture de L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700 nm. Une augmentation de L'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

L'acide ascorbique et Trolox sont utilisés comme standards dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,50} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

III.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline :**a. Principe de la réaction:**

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydlowska-Czerniak [63].

b. Protocole expérimentale:**● Préparation de Phénanthroline à 0.5%:**

0,05 g de phénanthroline dans 10ml de MeOH.

● Préparation de Ferric chloride FeCl₃ à 0.2%

0.02g de FeCl₃ dans 10 ml de H₂O.

● Procédure:

Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec 50 µl de chlorure de fer à 0,2% et 30 µl de phénanthroline à 0,5% et 110 µl de méthanol. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min et l'absorbance est mesurée à 510 nm.

L'acide ascorbique et Trolox sont utilisés comme standards dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,50} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50d d'absorbance.

III.2. Activité enzymatique :**III.2.1. Activité inhibitrice de α amylase :****a. principe de la réaction:**

L'activité de α amylase est déterminée par la méthode de Zengin [64].

b. Protocole expérimentale:**● Préparation de amidon à 0,1%:**

Mettre la solution dans la microonde à plusieurs cycles de 15 secs.

● Préparation de HCl:

Ajouter doucement à 45,83 ml d'eau un volume de 4,17 ml d'HCl pure.

● Préparation de solution IKI:

Dissoudre 3 g de KI dans 100 ml d'eau et ajouter 127 mg d'iode (5mM), puis agiter jusqu'à dissolution complète.

● **Procédure:**

Un volume de 25 µl de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec 50 µl solution α amylase et incubé pendant 10 min à 37 °C puis ajouter 50 µl d'amidon à 0.1% et incubé la deuxième fois pendant 10 min à 37 °C après, 25µl de HCl avec 100µl de IKI sont additionnés. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 630 nm.

Acarbose est utilisé comme standard dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{INH}\% = 1 - \frac{(A_c - A_e) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_e)}$$

A_c = Absorbance [Amidon + IKI + HCl + Vol de solvant d'extrait + Vol tampon Enzyme]

A_e = Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCl + Vol de solvant d'extrait]

A_s = Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + IKI + HCl]

A_b = Absorbance [Extrait + IKI + 125µl de tampon]

Chapitre III

Résultats et

Discussion

I. Identification structural du composé P₁ :

Le composé isolé a été identifié par les analyses spectrales, particulièrement la RMN-¹H et UV-Visible, sans négliger les autres caractéristiques physico-chimique (hydrolyse acide, R_f et la fluorescence sous lumière de Wood).

I.1. Comportement chromatographique :

Tableau 14 : comportement chromatographique du produit P₁.

Système	SI
R _f	0,45
Fluorescences sous lumière de Wood	Violette

SI : (AcOEt / MeOH / H₂O) (10 /0.5 /0.25), (v/v)

I.2. Données spectrométrie :

I.2.1. Données spectrométrie UV-Visible :

Le produit P₁ a été analysé en spectrophotométrie UV-Visible en présence d'une série de réactifs permettent de tirer les observations dans le tableau suivantes :

Tableau 15 : Données de la série spectrale UV-Visible du produit P₁.

Réactifs	Bande I λ _{max} (nm)	Autres bandes λ _{max} (nm)	Bande II λ _{max} (nm)	Interprétation
MeOH	350	-	266	Flavone où Flavonol (3-OR)
NaOH	403	326	275	4'-OH
NaOAc	368	-	274	7-OH
NaOAc + H ₃ BO ₃	354	-	267	Pas d'Ortho di-OH sur le cycle B
AlCl ₃	399	349	268	Pas d'Ortho di-OH sur le cycle B
AlCl ₃ +HCl	398	348	274	5-OH

Interprétation :

- Le comportement chromatographique dans le système SI indique que le composé **P₁** est un flavonoïde monoglycosyle.
- Les données du spectre UV du produit effectué dans le méthanol (Figure16, Tableau 15), et de la fluorescence violette de ce composé sous la lumière de Wood et la valeur de la bande I ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) indiquent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol substitué en 3.
- L'addition de NaOH induit un effet bathochrome de la bande I ($\Delta \lambda = +58 \text{ nm}$) avec augmentation de l'intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 326 nm montre la présence d'un OH en 7.
- La présence d'un effet bathochrome de la bande II ($\Delta \lambda = +18 \text{ nm}$) après l'addition de NaOAc par rapport au spectre MeOH confirme la présence d'un OH en 7.
- Le déplacement bathochrome ($\Delta \lambda = +45 \text{ nm}$) de la bande I observe dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- Le faible déplacement de la bande I ($\Delta \lambda = +4 \text{ nm}$), en comparant le spectre ($\text{MeOH} + \text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) avec le spectre enregistré dans le MeOH indique l'absence d'un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B. Ceci est confirmé par le faible effet hypsochrome de la bande I ($\Delta \lambda = -1 \text{ nm}$) après l'addition de HCl au système ($\text{MeOH} + \text{AlCl}_3$).

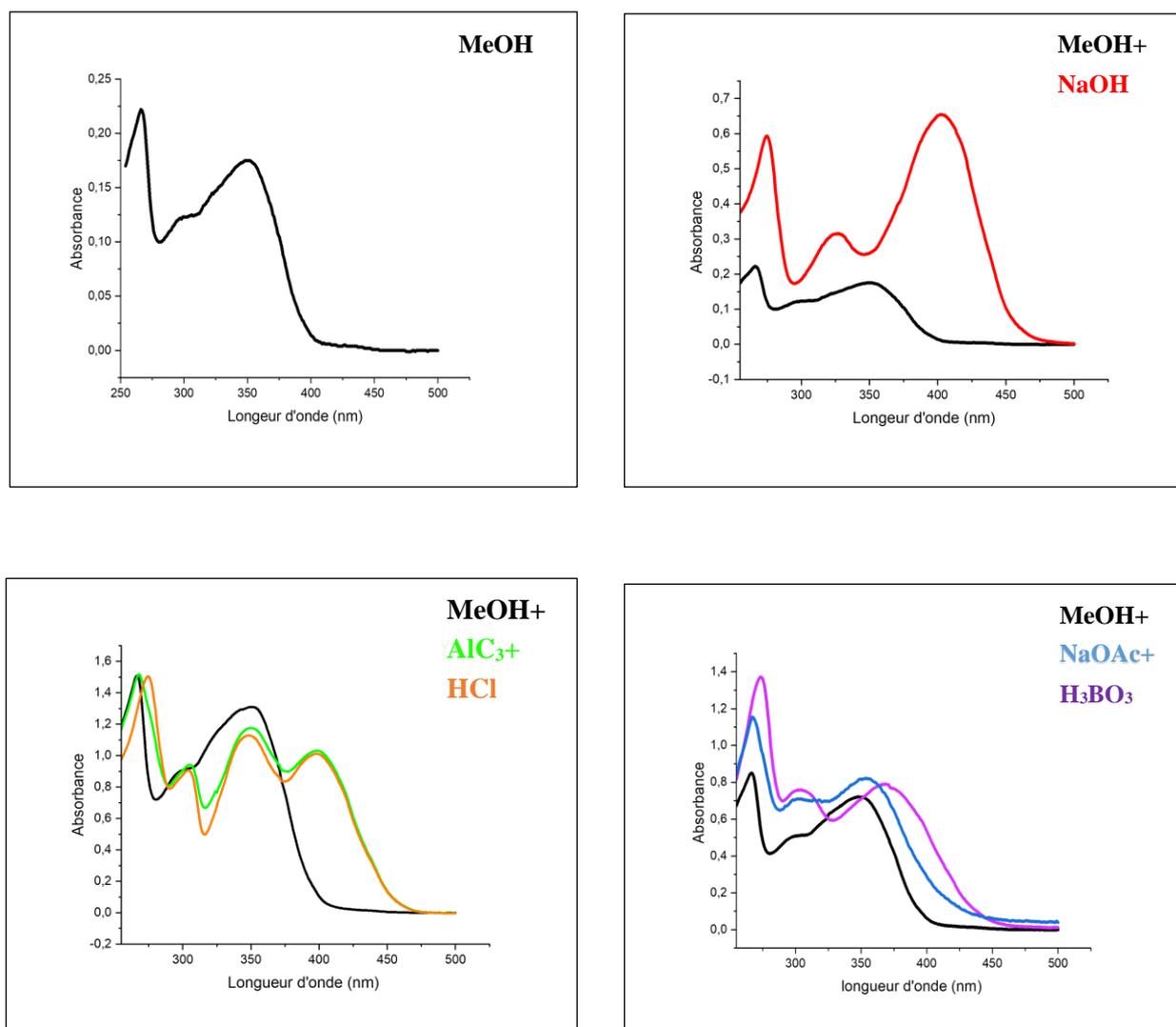
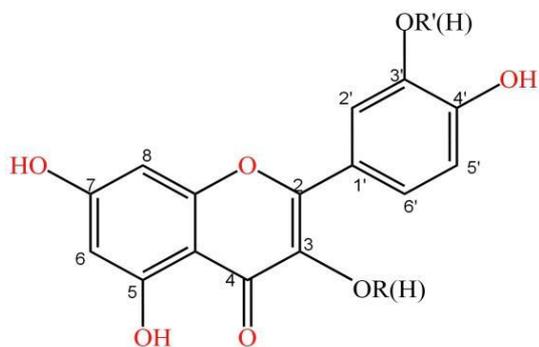


Figure 18 : Série spectrale UV- Visible de produit P1

Ces données permettent la proposition de la structure partielle du produit P1 :



I. 2.2. Données spectroscopique RMN ¹H :

Le tableau résume les données spectroscopiques RMN¹H du produit P1

Tableau 16 : Données spectroscopiques RMN ¹H

Déplacement Chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage <i>J</i> (Hz)	Attribution
8,16	2H	d	7,3	H _{2',6'}
6,97	2H	d	7,3	H _{3',5'}
6,56	1H	d	2,0	H ₈
6,31	1H	d	2,0	H ₆
5,40	1H	d	7,4	H _{1''}

Interprétation:

Le spectre RMN¹H (figures 19,20 ; Tableau16) montre des signaux caractéristiques d'un flavonol (3-OR) mono-substitué sur le cycle **B**, apparaissent comme suit :

- Deux signaux sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta = 8,16$ ppm et $\delta=6,97$ ppm avec une constante de couplage $J= 7,3$ Hz (un couplage Ortho) attribuable successivement aux protons H_{2',6'} et H_{3',5'}.
- Deux signaux sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta =6,56$ ppm et $\delta= 6,31$ ppm avec une constante de couplage $J= 2,0$ Hz (un couplage méta) attribuable successivement aux protons H₈ et H₆.
- L'apparition d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 5,40$ ppm avec une constante de couplage $J= 7,4$ Hz caractéristique d'un proton anomérique d'un sucre.
- Les autres protons du sucre résonnent entre [3,20-3,90] ppm.

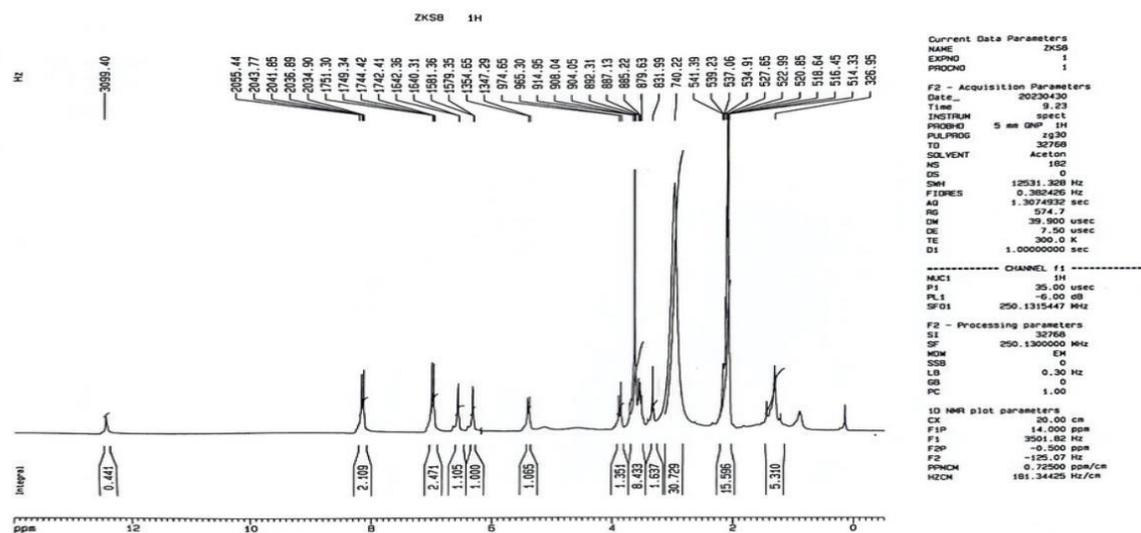


Figure 19 : spectre RMN-¹H (250 MHz, CD₃COCD₃) du produit P1

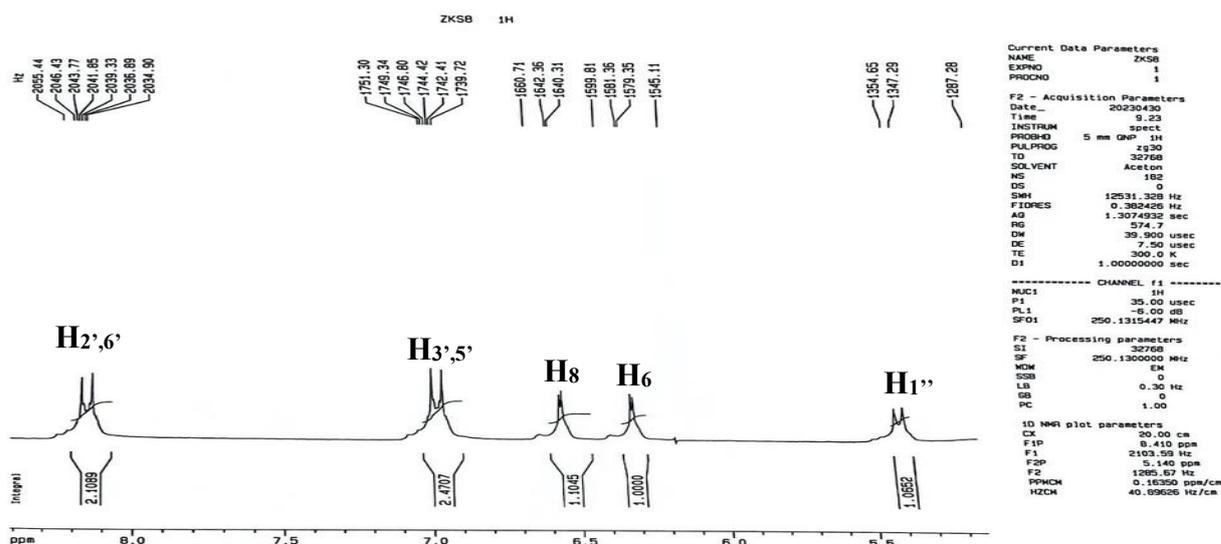


Figure 20 : spectre RMN-¹H (250 MHz, CD₃COCD₃) du produit P1 étalé

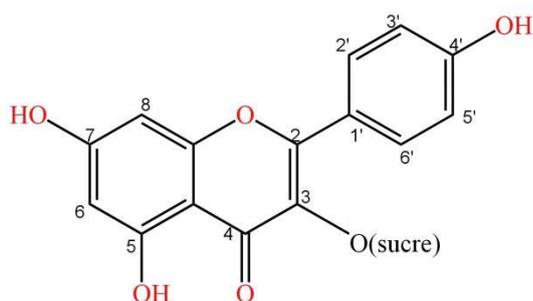
I.3. L'hydrolyse acide :

La détermination de la structure finale du composé P₁, nécessite une hydrolyse acide

- L'aglycone obtenue, après l'hydrolyse acide, donne une **fluorescence jaune** sous la lampe UV et une valeur de la bande I à $\lambda_{\text{max}} = 369 \text{ nm}$ du spectre enregistré dans le méthanol indiquant la présence d'un flavonol (**3-OH**), ces résultats nous permettent d'attribuer le sucre à la position 3.

- Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer la nature du sucre du produit **P₁**, car ce dernier n'est pas similaire avec les deux sucres témoins (galactose et glucose) disponibles dans notre laboratoire.

Donc la structure finale du produit **P₁** est :



Kaempferol-3-O-sucre

II. L'étude quantitative de la plante étudiée :

L'étude quantitative de la plante a été effectuée par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. Les résultats sont présentés dans le tableau 17 :

Tableau 17. La teneur en composés phénoliques et flavonoïdes.

	Total phénolique ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g QE/mg}$)
CHCl₃	140,27 \pm 16,93	112,5 \pm 4,12
n-BuOH	570,07 \pm 52,64	193,05 \pm 34,17
EtOH	126,84 \pm 24,28	100,97 \pm 0,29
ACOEt	741,05 \pm 42,74	209,93 \pm 42,13

II.1. Détermination du contenu total en polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode spectrophotométrique suivante :

- **Méthode de Folin-Ciocalteu :** utilisée pour la détermination du contenu total des polyphénols. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 765 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une

courbe d'étalonnage (Figure 21), ayant l'équation suivante : $y = 0,0034x + 0,2205$ avec $R^2 = 0,9624$

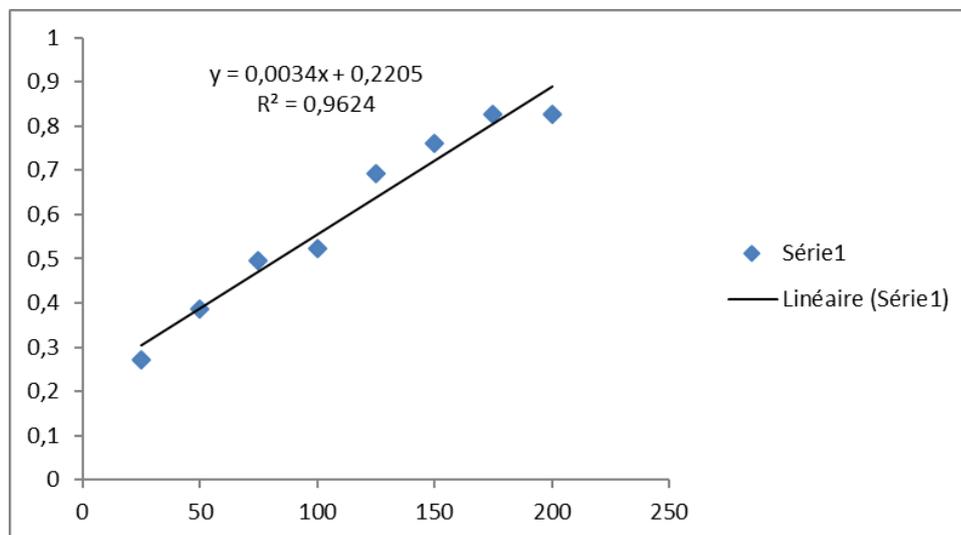


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La figure suivante montre les résultats obtenus :

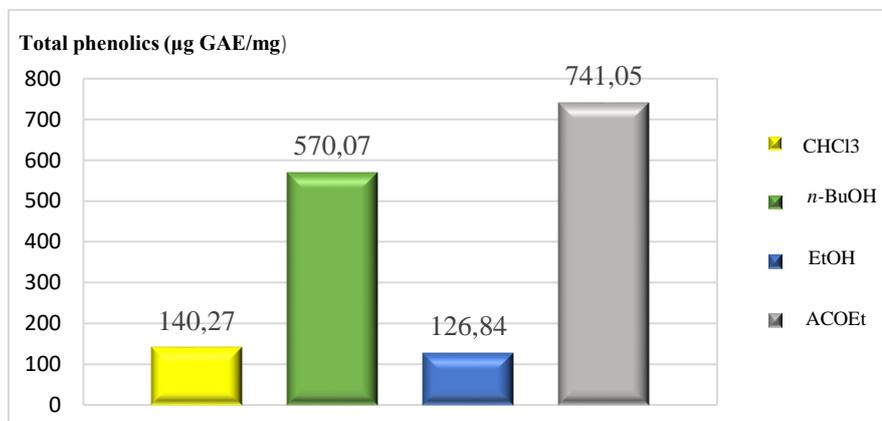


Figure 22 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits étudiés.

Les résultats montrent que les deux extraits butanolique et acétate d'éthyle sont les extraits les plus riches en polyphénols avec une teneur de $570,07 \pm 52,64$ et $741,05 \pm 42,74$ µg EAG/mg respectivement.

II.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes est réalisée par la méthode de nitrate d'aluminium $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$

Méthode de nitrate d'aluminium $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$: utilisée pour dosage des flavonoïdes. La quercétine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 415 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (Figure 23) ayant l'équation suivante : $y=0,0026x$ avec $R^2=0,9571$

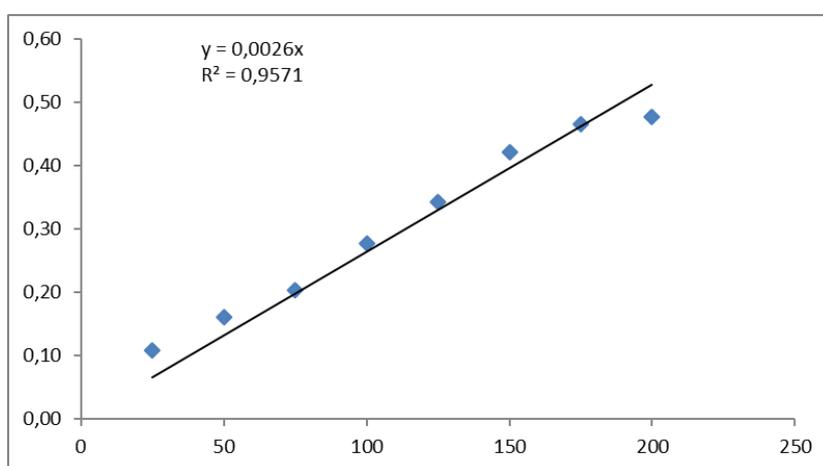


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La figure suivante montre les résultats obtenus :

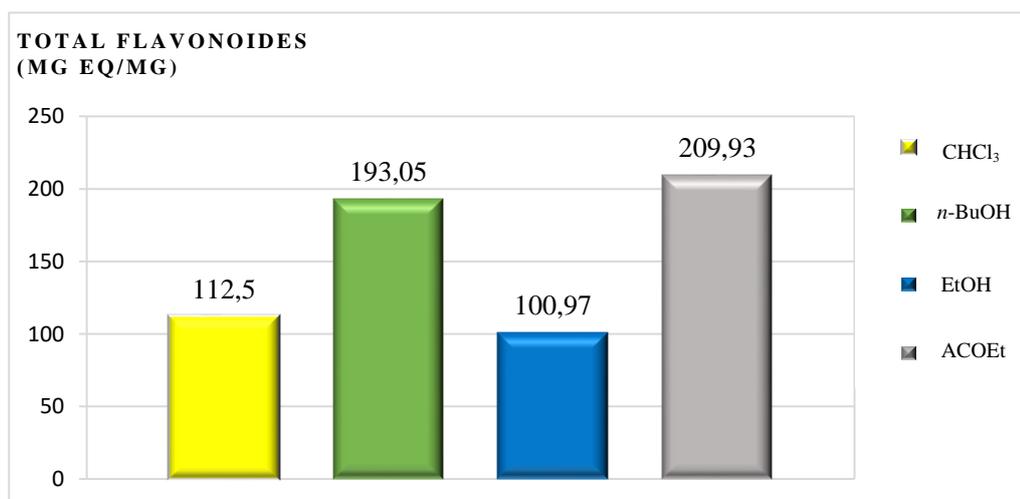


Figure 24 : Evaluation des flavonoïdes totaux des extraits étudiés.

Les résultats montrent que les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique sont riches en flavonoïdes avec des teneurs de $209,93 \pm 42,13$ et de $193,05 \pm 34,17$ $\mu\text{g EQ/mg}$, respectivement.

III. L'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des quatre extraits CHCl_3 , ACOEt, *n*-BuOH et EtOH a été réalisée par l'utilisation des quatre méthodes. L'acide ascorbique, Trolox sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et ils sont utilisés comme control positif.

III.1. Activité antiradicalaire au DPPH

Dans cette étude, l'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % (CI_{50}), en se basant sur la capacité d'une substance à réduire le radical DPPH, par rapport à des antioxydants standards Trolox et Acide ascorbique, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Les résultats sont présentés au-dessous :

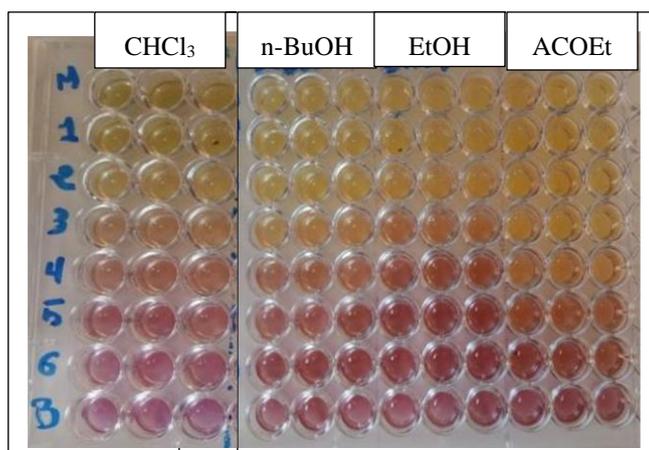
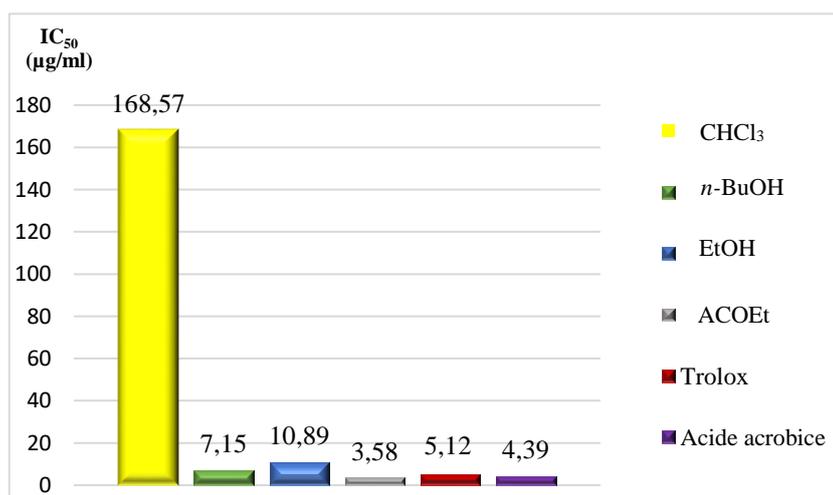


Figure 25 : Photos prise lors de dosage de l'activité antiradicalaire DPPH

Les résultats obtenus sont décrits dans le (**tableau 18**) :

Tableau 18 : Inhibition du radical DPPH par les extraits étudiés.

Extraits	% inhibition							CI ₅₀ (µg/ml)
	12.5	25	50	100	200	400	800	
CHCl ₃	8,00±0,82	15,01±1,08	25,15±1,57	33,64±4,18	57,32±1,10	67,93±0,91	58,11±3,18	168,57±4,53
	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	
<i>n</i> -BuOH	11,34±2,74	25,36±1,30	46,43±1,34	70,75±2,57	82,37±1,06	83,65±0,24	83,97±0,82	7,15±0,20
EtOH	8,26±2,09	18,30±2,00	31,20±2,07	56,79±3,98	78,82±0,55	82,91±1,06	82,64±0,80	10,89±0,89
ACOEt	22,60±1,99	46,38±1,39	71,49±2,36	83,60±0,84	83,12±0,16	83,97±1,12	81,10±4,60	3,58±0,19
	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	
Trolox	6.42±0.91	13.33±2.14	30.19±0.67	61.48±2.98	87.16±0.28	88.46±0.11	87.72±0.47	5.12±0.21
L'acide ascorbique	0.31±1.02	12.90±0.28	29.69±0.39	76.67±0.37	84.94±0.84	87.78±0.49	86.36±0.21	4.39±0.01

Figure 26 : les valeurs des CI₅₀ du test DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en CI₅₀. D'après les résultats obtenus, on constate que l'extrait acétate d'éthyle a présenté une activité antiradicalaire puissante par rapport aux autres extraits avec une valeurs de CI₅₀ : 3,58±0,19 µg/ml, il est considéré comme meilleure que les standards, Trolox (CI₅₀ : 5,12 ± 0,21 µg/mL) et l'acide ascorbique (CI₅₀ : 4,39 ± 0,01 µg/mL). Sans négliger les deux autres extraits butanolique et éthanolique, qui possèdent également une activité excellente avec CI₅₀ : 7,15±0,20 et 10,89±0,89 µg/ml successivement.

III.2. L'activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+} :

Dans ce test, l'antioxydant réagit avec ABTS^{•+} de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour redonner l'ABTSH^{•+} incolore. Cette transformation a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards Trolox et l'acide ascorbique. Les résultats obtenus dans le **tableau 19**.

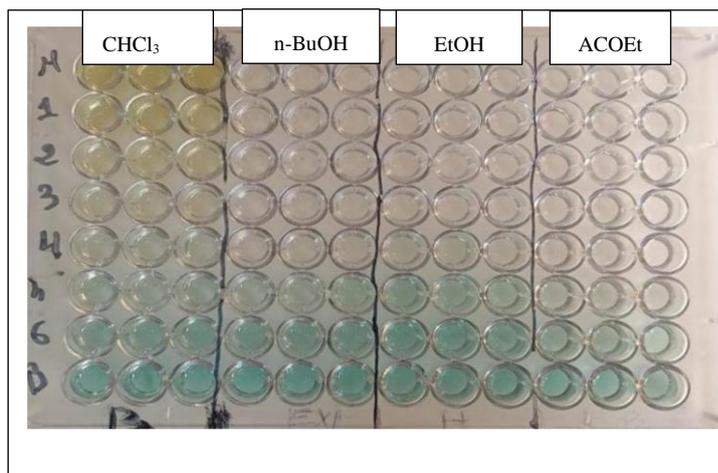


Figure 27 : Photos prise lors de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+}

Tableau 19 : Inhibition du cation radical ABTS^{•+} par les extraits étudiés.

Extraits	% inhibition							IC ₅₀ (µg/ml)
	12.5	25	50	100	200	400	800	
CHCl ₃	37,57±2,27	58,86±1,16	71,71±1,64	77,42±1,23	78,58±1,41	74,91±3,89	58,59±3,78	19,77±0,94
	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	
<i>n-BuOH</i>	34,99±1,98	64,37±0,12	89,12±1,43	90,68±0,12	90,75±0,47	91,09±0,24	91,36±0,31	2,36±0,06
EtOH	21,25±0,89	43,56±3,72	68,58±2,74	90,41±0,93	91,23±0,20	91,02±0,41	90,62±0,41	4,22±0,22
ACOEt	36,35±1,84	66,88±2,66	91,16±0,31	91,50±0,66	90,34±0,66	90,28±1,30	88,44±3,59	2,26±0,10
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	
Trolox	14,74±0,37	26,15±0,65	51,70±1,51	89,72±0,67	92,89±0,19	92,89±0,19	91,84±1,19	3,21±0,06
l'acide ascorbique	13,43±0,82	28,76±0,67	52,94±0,94	93,21±0,11	93,08±0,19	92,40±0,88	92,96±0,11	3,04±0,05

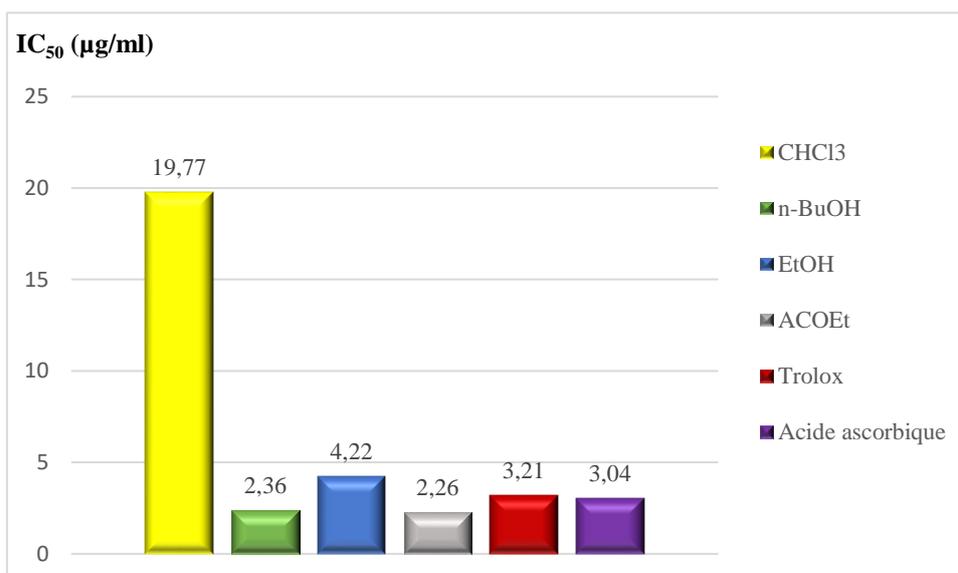


Figure 28 : les valeurs des IC₅₀ du test ABTS

Dans ce test, on remarque que la capacité de piégeage des radicaux libres présentée par les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique ($IC_{50}=2,26\pm 0,10$ µg/ml et $IC_{50}=2,36\pm 0,06$ µg/ml respectivement) est excellente, les deux extraits ont une activité antiradicalaire mieux que les deux standards, l'acide ascorbique ($IC_{50}=3,04\pm 0,05$ µg/mL) et le Trolox ($IC_{50} : 3,21\pm 0,06$ µg/mL). L'extrait éthanolique à son tour présente une bonne activité antioxydante avec $CI_{50}=4,22\pm 0,22$ µg/ml)

Alors que l'extrait chloroformique est manifesté une activité moyenne avec $CI_{50}=19,77\pm 0,9422$ µg/ml, par rapport aux autres extraits.

III.3. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (pouvoir réducteur) :

En présence d'un antioxydant le ferricyanide de potassium est réduit et donnée une couleur bleu-vert (fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+}) qui à un maximum d'absorbance à 700 nm, en mesurant les valeurs de $A_{0,50}$ et par comparaison avec les standards acides ascorbique et trolox, le test nous a permis d'obtenir les résultats suivants (Tableau 20), l'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en $A_{0,5}$:

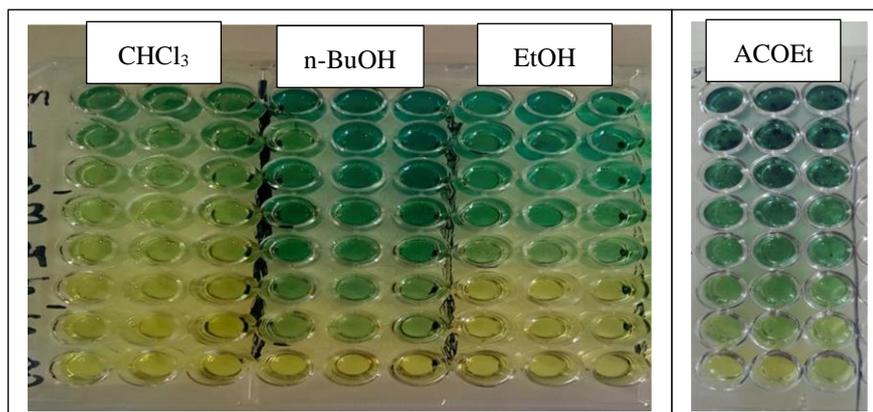


Figure 28 : Photos prise lors de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits étudiés.

Tableau 20 : Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits étudiés.

Extraits	% inhibition							A _{0,5} (µg/ml)
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
CHCl ₃	0,08±0,01	0,12±0,02	0,19±0,00	0,22±0,04	0,31±0,03	0,54±0,02	0,74±0,05	91,41±2,94
<i>n-BuOH</i>	0,27±0,03	0,39±0,03	0,69±0,05	0,76±0,09	0,83±1,11	1,11±0,03	1,58±0,05	8,56±0,47
EtOH	0,10±0,00	0,10±0,01	0,37±0,07	0,57±0,10	0,67±0,02	1,12±0,05	1,19±0,17	22,13±3,31
ACOEt	0,29±0,07	0,53±0,01	0,86±0,05	1,17±0,14	1,59±0,25	1,63±0,13	2,53±0,42	5,87±0,19
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	
Trolox	0.07±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.13±0.00	0.19±0.02	0.28±0.05	0.60±0.04	5.25±0.20
Acide ascorbique	0.07±0.00	0.09±0.01	0.12±0.01	0.17±0.01	0.25±0.02	0.47±0.03	0.79±0.09	3.62±0.29

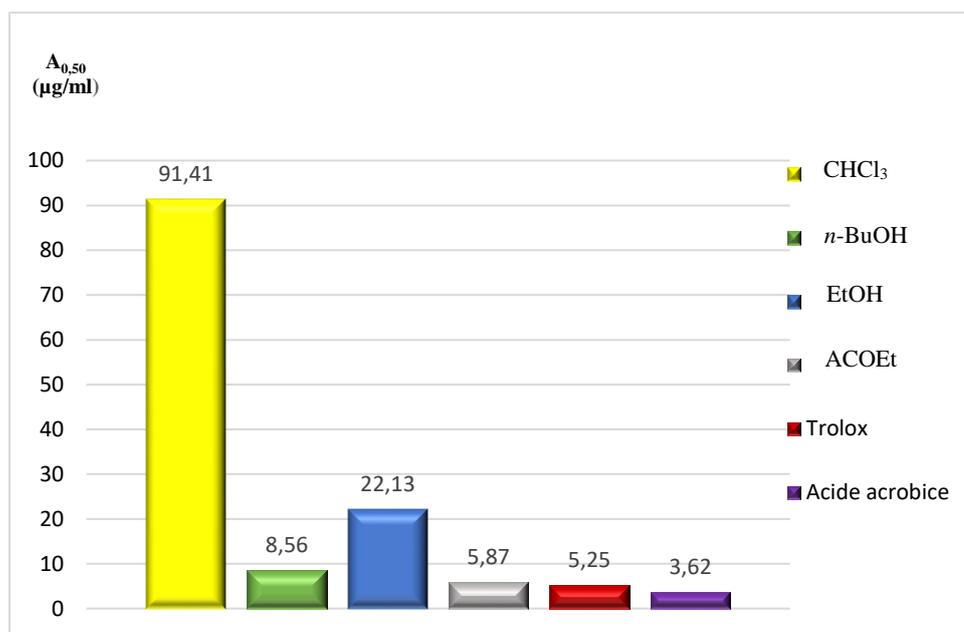


Figure 30 : les valeurs des $A_{0,50}$ du test pouvoir réducteur

D'après les résultats obtenus, la plupart des extraits ont un bon potentiel antioxydant. Selon les résultats figurant dans le Tableau 20 et la Figure 30, on peut déduire que les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique présentent un meilleur pouvoir réducteur avec les valeurs de $A_{0,50}$: $5,87 \pm 0,19$ et $8,56 \pm 0,47$ µg/ml par rapport aux autres extraits chloroformique et éthanolique. Le pouvoir réducteur des extraits acétate d'éthyle et butanolique sont plus proche aux standards trolox et l'acide ascorbique dont les valeurs $A_{0,50}$ sont de l'ordre de $5,25 \pm 0,20$ et $3,62 \pm 0,29$ µg/ml respectivement, L'extrait le plus important c'est l'extrait de l'acétate d'éthyle. Ce bon résultat est peut-être dû à la présence de composés donneurs d'électrons, puisque la méthode du pouvoir réducteur suit le mode d'action du transfert d'électron (ET).

III.4. Test de l'activité de de réduction par la formation du complexe Fe²⁺-phenanthroline :

En présence d'un antioxydant, le fer ferrique (Fe³⁺) est réduit en fer ferreux (Fe²⁺), ce dernier forme un complexe stable avec la phenanthroline de couleur rouge orange, qui a un maximum d'absorbance à 510 nm, les résultats sont présentés dans le tableau 21.

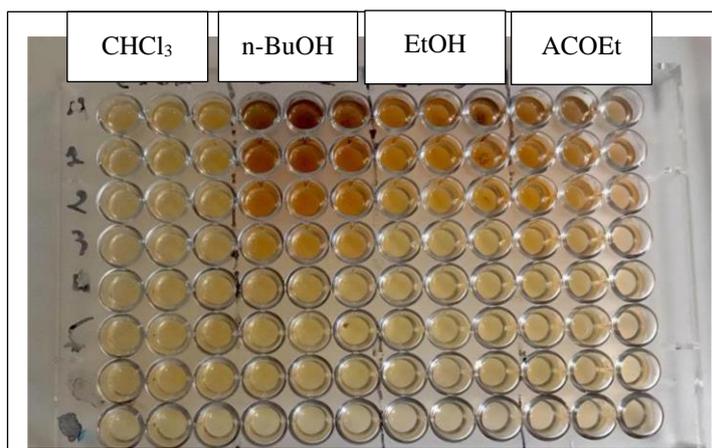


Figure 31 : Photos prise lors de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénanthroline

Tableau 21 : Absorbance du complexe Fe^{+2} - phenanthroline des extraits étudiés.

Extraits	% inhibition							$A_{0,50}(\mu\text{g/ml})$
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
CHCl₃	0,13±0,00	0,15±0,01	0,16±0,03	0,14±0,01	0,15±0,01	0,18±0,01	0,26±0,03	>200
n-BuOH	0,16±0,01	0,16±0,01	0,19±0,01	0,25±0,01	0,46±0,03	0,73±0,07	1,02±0,18	57,73±5,21
EtOH	0,15±0,02	0,18±0,02	0,18±0,01	0,20±0,01	0,27±0,02	0,37±0,04	0,64±0,01	146,60±3,49
ACOEt	0,15±0,01	0,17±0,01	0,21±0,01	0,25±0,03	0,40±0,03	0,56±0,03	0,83±0,11	82,09±1,84
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	
Trolox	0.25±0.01	0.24±0.01	0.26±0.01	0.26±0.00	0.32±0.01	0.38±0.01	0.56±0.02	5.21±0.27
Acide acrobique	0.26±0.01	0.29±0.00	0.29±0.02	0.31±0.01	0.37±0.01	0.50±0.00	0.80±0.00	3.08±0.02

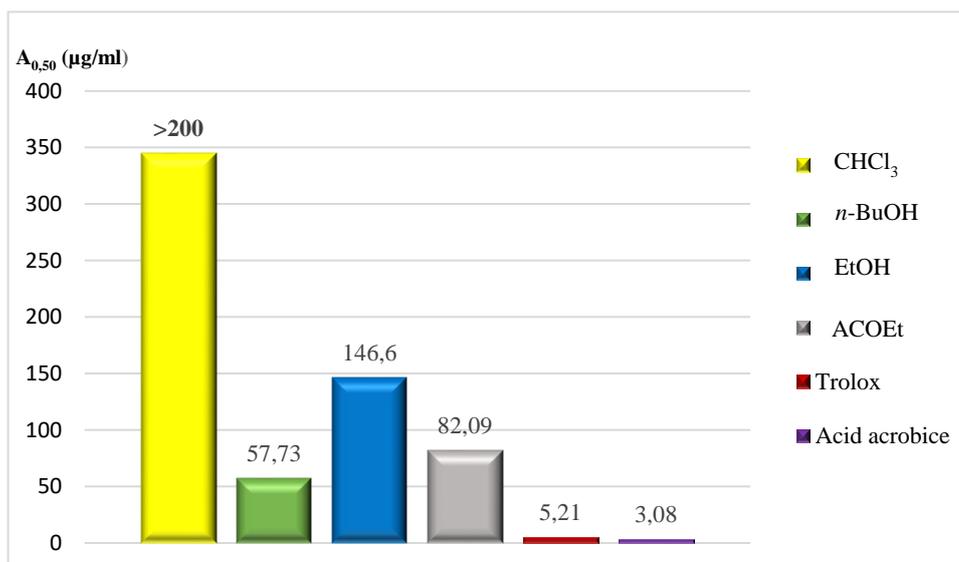


Figure 32 : les valeurs des A_{0,50} du test Fe²⁺-phénanthroline

Le test de phénanthroline confirme que la plupart des extraits ont une activité antioxydante moyenne, selon les résultats figurants dans le Tableau 21 et la Figure 32. L'extrait butanolique présente une meilleure activité de réduction de fer avec A_{0,50} : 57,73±5,21 µg/ml, suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec A_{0,50} : 82,09±1,84 µg/ml. Les deux extraits chloroformique et éthanolique ont mis en évidence des valeurs de A_{0,50} loin de Trolox et acide ascorbique estimées à >200 et 146,60 µg/ml respectivement.

Conclusion :

D'après les résultats qu'on a obtenus, en générale les trois extraits, acétate d'éthyle, butanolique et éthanolique possèdent une activité antioxydante très puissante.

L'extrait acétate d'éthyle a montré une excellente activité avec les méthodes du DPPH, de l'ABTS et du FRAP par rapport aux autres extraits, alors que l'extrait butanolique a montré une meilleure activité avec le test de phénanthroline.

Les résultats obtenus confirment la relation polyphénols-flavonoïdes avec l'activité antioxydante, plus la matière végétale est riche en polyphénols et flavonoïdes, plus la bonne efficacité antioxydante est élevée.

Pour notre cas, les extraits ***n*-BuOH** et **ACOEt** sont fortement riche en polyphénols (570,07±52,64 ; 741,05±42,74 µg GAE/mg) et en flavonoïdes (193,05±34,17 ; 209,93±42,13 µg QE/mg), ce si a conduit à une activité antioxydante excellent.

IV. L'activité enzymatique :

IV.1. Activité inhibitrice de α amylase :

Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase des différents extraits étudiés a été effectuée par la détermination des concentrations inhibitrices CI_{50} par rapport au standard l'acarbose, en se basant sur la capacité d'une substance à inhiber cette enzyme.

Les résultats sont présentés dans le tableau 22 :

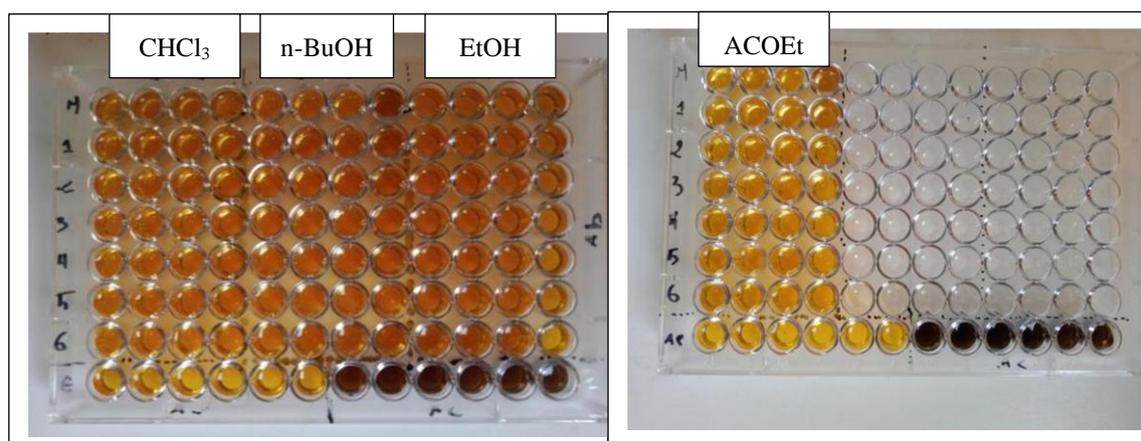


Figure 33 : Photos prise lors de dosage de l'activité inhibitrice de α amylase

Tableau 22 : Inhibition du l' α amylase par les extraits étudiés.

Extraits	% d'inhibition							IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	62,5 μg	125 μg	250 μg	500 μg	1000 μg	2000 μg	4000 μg	
CHCl ₃	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/
n-BuOH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/
EtOH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/
ACOEt	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/
Acarbose	7,76 \pm 0,17	8,08 \pm 0,30	9,46 \pm 0,11	10,70 \pm 0,96	31,81 \pm 2,89	37,21 \pm 3,54	53,05 \pm 1,59	3650,93 \pm 10,70

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits n'ont pas d'activité anti-diabétique

Références

bibliographique

❖ **Références bibliographiques**

- [1] Birgitta B., Kare B., Mark W., Chase., Michael F. F., James L. Reveal., Douglas E. Soltis., Pamela S. Soltis and Peter F., (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.
- [2] Jodra S., (2023). Les Rosacées. *Imago Mundi*, Encyclopédie gratuite en ligne : www.cosmovisions.com (consultée le 10 mars 2023).
- [3] Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., (2008). *Botanique : biologie et physiologie végétales*. Editions Maloine. 512 p.
- [4] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apricot_Blossom._North_Bergen,_NJ.jpg?uselang=fr (consulté le 24 Mars 2023- 00:24 PM).
- [5] Dupont F., Guignard J-l., (2007). *Botanique Systématique moléculaire*. Elsevier Masson.162p.
- [6] Michel B., (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs* Lavoisier, p647.
- [7] Stevens P. F., (2001). Onwards, AP-Website : <http://hortical.com/mot691.html>(consulté le 19 Mars 2023).
- [8] Rodolphe-Edouard S., Vincent v., Murielle F., Daniel J., (2002). *Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des région tempérées et tropicales*. Presses polytechniques et universitaires romandes, p.208.
- [9] Annie et Jean Perrier., (2014). *Guide des arbres et arbustes de France*. Editions Sud-Ouest, p188.
- [10] Potter D., (2007). *Phylogeny and classification of Rosaceae*. *Plante Systematics and*

Références bibliographiques

Evolution. 266 (1-2) :5-43.

- [11] <https://www.jardiner-malin.fr/tag/rosacees/amp#> (consulté le 24 Mars 2023-07:13 AM).
- [12] Hopkins W.G., (2003). Physiologie végétale. Édition de boeck université-Bruxelles p : 267-283.
- [13] Richter G., (1993). Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. Pp : 317-339
- [14] Raven H., Evert R. F., Eichhorn S. E., (2000). Biologie végétale. 6e édition. Traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. De Boeck Université- Paris, 944p.
- [15] Vican P., (2001). La rousse encyclopédies des plantes médicinales. ed France .1259 pages.
- [16] Philippe, Blanchemaison., (juin 2000). Les phlébotoniques de 1930 à nos jours. Correspondences en médecine, 6: p286.
- [17] Malešev D., Kuntic V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoid complexing reactions. Journal of the serbian chemical society. 2007.72.921-939.
- [18] Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M., (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. American journal of clinical nutrition., 74 : 418-425.
- [19] Ghedira k., (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie., 3 (4) : 162-169.
- [20] Marine F.R., Frutos M.J., Perez-Alvarez J.A., Martinez-Sanchez. F., Delrio J.A. Flavonids as nutraceuticals: Structural related Antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation.
- [21] Bruneton j., (2009). Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier. 366.

Références bibliographiques

- [22] Verpoorter R., Alfermannv A.W., (2000). Metabolic Engineering of plant secondary Metabolism, Ed: Kluwer Academic 128.
- [23] Heller R., Esnault R., Lance C., (2004). Physiologie Végétale : Nutrition, Ed : Dunod 288-289.
- [24] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., et Krishna D. R., (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33: 2-16.
- [25] W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J., (2007). Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition., 137 (3 supp 1): 718 s-737 s.
- [26] Pietta P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, vol.63, p1035-1042.
- [27] Heim E.K., Tagliaferro A.R et Bobilya D.J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of nutritional Biochemistry., vol.13, p,572-584.
- [28] Julies A., Christin M., (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety, Annule Review of Nutrition, vol.22, p.19-44.
- [29] Das H.C., Wang J. H et Lien E. J., (1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. 133 –136. In: JuckerEed. Progress in Drug Research. Basel: Birkhauser Verlag. Das H. C. et Weaver G. M. (1972). Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances.J. Chromatogr. 67, 105 –111.
- [30] Bidet D., Gagnault J. C., Girard P et Troitin F., (1987). Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. L'actualité chimique. 89 - 97.

Références bibliographiques

- [31] Markham K.R., (1982). Techniques of flavonoids identification, Academic press, London.
- [32] Ngwendson J.N., Bedir E., Efange S.M.N., Okunji C.O., Iwu M.M., Schuster B.G., and Khan I.A.,(2003).Pharmazie. 58:587-589.
- [33] Markham K.R., and Geiger H., (1993). The Flavonoids Advances in research since 1986.Edited by J.B., Harborne, Chapman & Hall. London.
- [34] Ben Moussa M.T., Cherif R.A., Lekhal S., Bounab A., Hadeff Y., (2022). Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydant des extraits méthanoïques de *Brocchia cinerea* VIS de l'Algérie (Sud-Est), Algerian journal of pharmacy.Vol. 04 Num. 2602–975X.
- [35] Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 2005 ; 554-558.
- [36] Koechlin – Ramonatxo C., (2006) Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, oranother way for nutrition in respiratory diseases. Nutr. Clin. Et Métab., 20, 165-177.
- [37] Favier A. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique 2003 ; 108-117.
- [38] Mates J.M., Pérez-Gomez C., De Castro I.N., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem., 32(8): 595-603.
- [39] Théron P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand A., (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 3(5):373-84.
- [40] Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M., (2002). Oxidative stress and stress- activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabets, Endocr Rev, 23: 599-622.

Références bibliographiques

- [41] Allard J., Royall D., Kurian R., Muggli R., Jeejee bhoy K., (1994). Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 884 – 90.
- [42] Kohen R, and Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 2002 ; 30 : 620-650.
- [43] Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006 ; 64 : 390-396.
- [44] Ionita P. The Chemistry of DPPH Free Radical and Congeners. *Int. J. Mol.Sci.* 2021, 22, 1545. <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>.
- [45] Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- [46] Njoya E.M. Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. 2021.p 349-357.
- [47] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- [48] Roginsky V., and Lissi E.A., (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92, 235-254.
- [49] Gülçin İ., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86, 345-391.
- [50] Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., and Brighenti F., (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different in Vitro Assays. *Journal of Nutrition*. 133, 2812-2819.

Références bibliographiques

- [51] Chou S.-T., Chao W.-W., and Chung Y.-C., (2003). Antioxidative Activity and Safety of 50% Ethanolic Red Bean Extract (*Phaseolus radiatus* L. var. *Aurea*). *Journal of Food Science*. 68, 21-25.
- [52] Szydłowskaczerniak A., Dianoczki C., Recseg K., Karlovits G., and Szlyk E., (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
- [53] Adhikamsetty R.K., Gollapalli N.R., and Jonnalagadda S.B., (2008). Complexation kinetics of Fe²⁺ with 1,10-phenanthroline forming ferriox in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*. 40, 515-523.
- [54] Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S., Bektaşoğlu B., Berker K., and Özyurt D., (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 12, 1496-1547.
- [55] Glatz Z., (2006). Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 841, 23-37.
- [56] Nair S.S., Kavrekar V., and Mishra A., (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*. 3, 128-132.
- [57] Khan M., Alam A., Khan K.M., Salar U., Chigurupati S., Wadood A., Ali F., Mohammad J.I., Riaz M., and Perveen S., (2018). Flurbiprofen derivatives as novel α -amylase inhibitors: Biology-oriented drug synthesis (BIODS), in vitro, and in silico evaluation. *Bioorganic Chemistry*. 81, 157-167.
- [58] Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992–999.
- [59] Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822

Références bibliographiques

- [60] Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
- [61] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- [62] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- [63] Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008;7 6:899-905.
- [64] G. Zengin et al. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251.

Conclusion générale

❖ Conclusion générale :

La réalisation de ce travail est basée sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante et enzymatique d'une espèce de la famille des *Rosacées*, car cette famille est connue par sa richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes.

Au cours de cette étude phytochimique, la combinaison de différentes méthodes chromatographiques (chromatographie sur VLC, chromatographie sur colonne CC et chromatographie sur couche mince CCM), nous a permis d'isoler deux composés **P₁** et **P₂** à partir de l'extrait *n*-BuOH de la plante étudiée.

La détermination structurale préliminaire du composé **P₁** a été réalisée en utilisant des techniques spectroscopiques : la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelles (¹H) et l'hydrolyse acide sans négliger le comportement chromatographique (R_f), qui nous ont permis d'identifier la nature du produit. Il s'agit d'un **Kaempferol-3-O-sucre**.

Dans la présente étude, nous avons caractérisé d'une part, l'activité antioxydante de quatre extraits de cette plante de la famille des Rosacées par des méthodes standards, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction des fer FRAP et Phenanthroline. D'autres part, nous avons testé l'activité antidiabétique via l'inhibition de α -amylase.

Nos résultats ont montré des niveaux considérables en polyphénols et flavonoïdes totaux notamment pour l'extrait butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle. Concernant l'activité antioxydante, les résultats ont montré des activités importantes pour les quatre extraits testés particulièrement pour les deux extraits acétate d'éthyle et butanlique qui sont comparables aux références Trolox et Acide ascorbique dans les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS.

En Plus, les extraits étudiés ont présenté des activités variables dans les méthodes, FRAP et Phenanthroline.

L'activité inhibitrice des enzymes a montré que nos échantillons ne sont pas inhibés l' α amylase

En conclusion, la plante étudiée possède une excellente activité antioxydante en raison d'une quantité non négligeable des polyphénols et flavonoïdes.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats explique les propriétés pharmacologiques des plantes et fournit une base de données scientifiques à l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle algérienne.

Summary

In this work, our study was devoted to the phytochemical and biological study of a medicinal plant of the Rosaceae family.

Using the different chromatographic separation techniques VLC, CC, CCM, two products **P₁** and **P₂** were isolated from the *n*-**BuOH** extract of the studied species.

Characterization by spectroscopic techniques, ultraviolet (UV) and nuclear magnetic resonance (NMR¹H), allowed us to identify the flavonoid (P₁) **Kaempferol-3-O-sugar**.

The two extracts *n*-**BuOH** and **ACOEt** are shown a strong antioxidant activity, using the four methods DPPH and ABTS, FRAP and phenonhroline, this was confirmed by the determination of polyphenols and flavonoids which revealed a high quantity.

Keywords : Rosaceae, flavonoids, DPPH, ABTS, FRAP, phenonhroline, polyphenols, flavonoides

Résumé

Dans ce travail, notre étude a été consacrée à l'étude phytochimique et biologique d'une plante médicinale de la famille des Rosacees.

Grace à l'utilisation des différentes techniques chromatographiques de séparation VLC, CC, CCM, nous avons isolé deux produits **P₁** et **P₂** de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce étudiée.

La caractérisation par les techniques spectroscopiques, ultraviolette (UV) et la résonance magnétique nucléaire (RMN¹H), a permis d'identifier le flavonoïde (**P₁**) **Kaempferol-3-O-sucrose**.

Les deux extraits ***n*-BuOH** et **ACOEt** sont montrés une activité antioxydante forte, en utilisant les quatre méthodes DPPH et ABTS, FRAP et phénonthroline, cela a été confirmé par le dosage des polyphénols et flavonoïdes qui a révélé une forte quantité.

Mots clés : Rosacées, flavonoïdes, DPPH, ABTS, FRAP, phénonthroline, polyphénols, flavonoïdes

ملخص

في هذا العمل، قمنا بدراسة فيتوكيميائية وبيولوجية لنبته طبية من عائلة Rosacée، وعن طريق استخدام تقنيات كروماتوغرافية مختلفة من VLC، CC، CCM، قمنا بعزل مركبين من المستخلص البوتانولي للنبته المدروسة.

أدى استعمال تقنيات التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية (UV) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد للبروتون (^1H RMN) إلى تحديد البنية الأولية للمركب **Kaempferol-3-O-sucre (P1)**. أظهرت مستخلصات *n*-BuOH و ACOEt نشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة، باستخدام الطرق الأربعة DPPH و ABTS و FRAP و phénonthroline، وقد تم تأكيد ذلك من خلال فحص البوليفينول والفلافونويد الذي أظهر كمية عالية.

الكلمات المفتاحية: Rosacées، فلافونويد، DPPH، ABTS، FRAP، phénonthroline، البوليفينول، الفلافونويد.

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : BENSIMESSAOUDE Marwa & HIMROUCHE Samah

Etude phytochimique et biologique d'une plante de la famille des Rosacées

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

Résumé

Dans ce travail, notre étude a été consacrée à l'étude phytochimique et biologique d'une plante médicinale de la famille des Rosacées.

Grace à l'utilisation des différentes techniques chromatographiques de séparation VLC, CC, CCM, nous avons isolé deux produits **P₁** et **P₂** de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce étudiée.

La caractérisation par les techniques spectroscopiques, ultraviolette (UV) et la résonance magnétique nucléaire (RMN¹H), a permis d'identifier le flavonoïde (**P₁**) **Kaempferol-3-O-sucrose**.

Les deux extraits ***n*-BuOH** et **ACOEt** sont montrés une activité antioxydante forte, en utilisant les quatre méthodes DPPH et ABTS, FRAP et phénanthroline, cela a été confirmé par le dosage des polyphénols et flavonoïdes qui a révélé une forte quantité.

Mots-clés : Rosacées, flavonoïdes, DPPH, ABTS, FRAP, phénanthroline, polyphénols, flavonoïdes.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire d'Obtention de substances Thérapeutique (LOST), Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

Encadreur : M^{me}. **KHALFALLAH Assia**

MCA- CUM-Mila.

Président : M^{me}. **MOSBAH Asma**

MCA. UFM Constantine 1.

Examineur 2 : M^{me}. **BOUSETLA Ahlem**

MCA. UFM Constantine 1.

Date de soutenance : 19/06/2023