

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET

MOLECULAIRE

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

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé :

Étude phytochimique et évaluation de L'activité antimicrobienne de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. (Fabaceae)

Présenté par :

Djezzar Samia

Sebih Maroua

Sous la direction de :

Dr. Larit Farida

Devant le jury :

Président de jury : Dr. Chibani Salih MCA UFM Constantine 1

Rapporteur : Dr. Larit Farida MCA UFM Constantine 1

Examinatrice : Dr. Lehbili Meryem MCB UFM Constantine 1



Année universitaire : 2022/20223



Remerciements

Nous exprimons notre gratitude à Allah, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la patience et le courage pendant ces années d'études.

Nous souhaitons remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce projet de mémoire.

*Un grand merci au **Prof. ZAHIA KABOUICHE** de nous avoir accueilli dans son Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST). Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour sa précieuse aide et son soutien inestimable tout au long de la préparation de notre mémoire de master.*

*Nous adressons également nos remerciements à notre directrice de mémoire, **Dr. FARJDA LARJI**, pour sa patience, sa disponibilité, pour sa précieuse aide et surtout ses conseils avisés qui ont nourri notre réflexion.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude envers les membres du jury, **Dr. Salih Chibani** et **Dr. Meryem Lehbili**, pour avoir généreusement consacré leur temps à l'évaluation de ce travail.*

*Nous tenons également à adresser nos sincères remerciements au chef du laboratoire de Mycologie au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt), **M. Debbi Ali**, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire, pour leur chaleureux accueil et leur précieuse assistance tout au long de notre travail.*

*Un sincère remerciement aux doctorantes **Hajer Boubertekfi**, **Nour El Houda Felkaoui** et **Soumia Chebchoub**, qui ont rendu notre travail plus facile et agréable. Leurs bonnes humeurs, disponibilité et aide précieuse ont grandement facilité notre parcours.*

Nous souhaitons exprimer notre sincère gratitude envers toutes les personnes qui ont apporté une contribution significative à l'achèvement de notre mémoire de Master 2. Leur soutien et leur engagement ont joué un rôle crucial dans la réussite de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce mémoire de Master 2 à tous ceux qui ont soutenu et inspiré
mon parcours académique.*

*À ma mère, dont l'amour inconditionnel et le soutien constant ont été mes
piliers tout au long de cette aventure. Vos encouragements et votre
confiance en moi ont été des sources d'inspiration inépuisables.*

A la mémoire de mon père.

*À mon frère, qui m'a accompagné avec enthousiasme et compréhension,
même lorsque j'étais submergée par les responsabilités académiques.*

À ma grand-mère, Source d'espoir et de motivation et de bonheur.

*A mes oncles Djamel et Khaled et ma tante qui m'ont toujours encouragé
que dieu les protèges.*

*Sans oublier mon binôme pour son soutien moral et sa patience tout au
long de ce projet. Que cette dédicace témoigne de ma gratitude envers tous
ceux qui ont contribué à accomplir mon travail.*

Djezzar Samia

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma famille

*qui a joué un rôle majeur dans mes réalisations et l'atteinte de mes
objectifs*

*Spécialement mes parents mon père et ma mère qui m'ont soutenu et
m'ont encouragé à aller de l'avant*

*A toi mon frère wafid et ma sœur Houda qui m'ont a aussi soutenu et
encouragé*

*A mon binôme Samia pour son soutien moral et sa patience tout au long
de cette mémoire.*

Sebih Maroua

TABLE DE MATIERE

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux	III
Liste des Abréviations.....	IV
Introduction.....	1
CHAPITRE I: Aperçu Bibliographique.....	3
I.1. La famille des Fabaceae	3
I.1.1. Généralité sur la famille des Fabaceae	3
I.1.2. Classification	3
I.1.3. Répartition géographique de la famille des Fabaceae	4
I.1.4. Intérêts écologique, nutritionnel et économique de la famille des Fabaceae.....	5
I.1.5. Importance thérapeutique de la famille des Fabaceae	5
I.1.6. Caractères botaniques de la famille des Fabaceae.....	6
I.2. Présentation du genre <i>Cytisus</i>.....	7
I.2.1. Classification dans la systématique botanique	8
I.2.2. Description botanique du genre <i>Cytisus</i>	8
I.2.3. Utilisation du genre <i>Cytisus</i> en médecine traditionnelle	9
I.3. L'espèce de <i>Cytisus villosus</i> Pourr.....	11
I.4. Métabolites secondaires isolés du genre <i>Cytisus</i>	12
I.4.1. Flavonoïdes.....	13
I.4.2. Isoflavonoïdes.....	16
I.4.3. Les coumarines.....	17
I.4.4. Phénylpropanoïdes	18
I.5. Études pharmacologiques antérieurs sur le genre <i>Cytisus</i> et l'espèce <i>Cytisus villosus</i> Pourr.	18
CHAPITRE II: Matériel ET Méthodes	20
II.1. Extraction.....	20
II.1.1. Choix du matériel végétal.....	20
II.1.2. Récolte des espèces	20
II.1.3. Extraction	20
II.1.4. Calcul du rendement d'extraction.....	24
II.2. Méthodes d'analyse chromatographique	24
II.2.1. Chromatographie plaque CCM analytique	24
II.2.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	26
II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	28
II.3.1. Activité antifongique	29

II.3.1.1.	Matériel fongique	29
II.3.1.2.	Préparation du milieu de culture.....	30
II.3.1.3.	Ajout des extraits végétaux.....	31
II.3.1.4.	Effet des extraits de <i>C. villosus</i> sur la croissance mycélienne de FOL	31
II.3.1.5.	Lecture des résultats	32

CHAPITRE III : Résultats Et Discussion 34

III.1. Extraction..... 34

III.2. Etude phytochimique 35

III.2.1. Analyses qualitatives

III.2.1.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

III.2.1.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....

III.2.1.3. Description des profils chromatographique de l'HPLC

III.3. Tests Biologiques 47

III.3.1. Activité antifongique

III.3.1.1. Extrait hydroalcoolique

III.3.1.2. Extrait Dichlorométhane.....

III.3.1.3. Extrait Acétate d'éthyle

III.3.2. Effet fongicide-fongistatique

Conclusion..... 54

Perspectives..... 55

Références bibliographiques

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

CHAPITRE I : Aperçu Bibliographique

Figure I. 1. Carte de répartition géographique de la famille des Fabaceae.....	4
Figure I. 2. Famille des Fabaceae.	7
Figure I. 3. Différentes espèces du genre <i>Cytisus</i>	9
Figure I. 4. Différentes parties de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	11
Figure I. 5. <i>Cytisus villosus</i> Pourr. (Syn. <i>Cytisus triflorus</i> L'Hérit.).....	12

CHAPITRE II: Matériel et Méthodes

Figure II. 1. Parties aériennes broyées de la plante <i>Cytisus villosus</i>	21
Figure II. 2. Évaporateur Rotatif.....	21
Figure II. 3. Extraction liquide-liquide de l'extrait hydroéthanolique de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	22
Figure II. 4. Organigramme d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	23
Figure II. 5. Schéma d'une chromatographie sur couche mince.....	24
Figure II. 6. Calcul du rapport frontal.....	25
Figure II. 7. Schéma de principe de chaine HPLC.	26
Figure II. 8. HPLC (SHIMADZU).	28
Figure II. 9. Extraits testés contre <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i>	29
Figure II. 10. Préparation du milieu de culture.....	30
Figure II. 11. Préparation des échantillons.	31
Figure II. 12. Incubation des cultures.	32

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

Figure III. 1. Histogramme des rendements (%) d'extraction liquide-liquide des parties aériennes de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	35
Figure.III. 2. Profils CCM des extraits des extraits EEP et EHA.Système d'élution (Hexane/ AcOEt : 7/3 ; v/v).....	36
Figure III. 3. Profils CCM des extraits EEP et EDM. Système d'élution (Hexane / AcOEt : 7/3 ; v/v).....	37
Figure.III. 4. Profils CCM des extraits EEP, EDM et EHA. Système d'élution (hexane/ diéthyle éther : 5/5 et 3/7 ; v/v).....	37
Figure.III. 5. Profils CCM de l'extrait EAE.Système d'élution (DCM / AcOEt : 8/2 et 7/3 ; v/v).....	38
Figure.III. 6. Profils CCM des extraits EAE, EBT et EHA.Système d'élution (dichlorométhane/ AcOEt /acide formique : 3.5/4.5/1 ; v/v/v).....	39

Figure.III. 7. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) des standards (Chlorure de kuromaine; Catéchine, Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside et rutine hydratée).	41
Figure.III. 8. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) des standards (Acide caféique ; Hypéroside (Quercetin -3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside) ; Myricitrine (myricetin -3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside); Myricétine-3'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside; Acide p-coumarique). .	42
Figure.III. 9. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) de l'Acide rosmarinique ; Myircétine; Hespérétine et Chrysine.	43
Figure III. 10. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) de kaempferol.	44
Figure.III. 11. Profil HPLC ($\lambda=254$ nm) de l'extrait Acétate d'éthyle.	44
Figure.III. 12. Les structures des composés phénoliques (5-8-12-13-14) identifiés dans l'extrait Acétate d'éthyle de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	46
Figure.III. 13. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 50).....	48
Figure.III. 14. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 100).....	48
Figure III. 15. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 200).....	48
Figure III. 16. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 50).....	49
Figure.III. 17. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 100).....	49
Figure.III. 18. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 200).....	49
Figure.III. 19. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 50).....	50
Figure.III. 20. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 100).....	50
Figure.III. 21. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 200).....	50
Figure.III. 22. Taux d'inhibition des extraits de <i>Cytisus villosus</i> sur le <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	51
Figure III. 23. Effet du transfert des isolats de FOL inhibés par l'extrait dichlorométhane (200 mg/ml).....	52

Liste des tableaux

Chapitre I : Aperçu Bibliographique

Tableau I. 1. Usage et propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Cytisus</i>	10
Tableau I. 2. Flavonoïdes et isoflavoïdes isolés de différentes espèces de <i>Cytisus</i> ...	13
Tableau I. 3. Isoflavoïdes isolés de différentes espèces de <i>Cytisus</i>	16
Tableau I. 4. Coumarines isolées de différentes espèces de <i>Cytisus</i>	17
Tableau I. 5. Phénylpropanoïdes isolés de différentes espèces de <i>Cytisus</i>	18
Tableau I. 6. Activités pharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Cytisus</i>	19

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Tableau II. 1. Les masses des extraits obtenus de l'extraction de l'espèce <i>Cytisus villosus</i>	22
Tableau II. 2. Gradient d'éluion HPLC pour l'analyse des polyphénols.....	27

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III. 1. Rendements des extraits.....	34
Tableau III. 2. Temps de rétention des composés phénoliques standards.	40
Tableau III. 3. Les composés phénoliques identifiés dans l'extrait d'acétate d'éthyle.	45
Tableau III. 4. Croissance mycélienne après trois jours (72h) en présence des extraits.	47
Tableau III. 5. Les pourcentages d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> par les extraits.	51

Liste des Abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

AF : Acide formique

CCM : Chromatographie sur couche mince

C18 : Chromatographie en phase inverse

DCM : Dichlorométhane

DEE : Diethyl ether

EAE : Extrait d'acétate d'éthyle

EAC 200 : Extrait acétate d'éthyle à concentration élevée

EAC 100 : Extrait acétate d'éthyle à moyenne concentration

EAC 50 : Extrait acétate d'éthyle à faible concentration

EBT : Extrait *n*-butanol

EDM : Extrait dichlorométhane

EDM 200 : Extrait dichlorométhane à concentration élevée

EDM 100 : Extrait dichlorométhane à moyenne concentration

EDM 50 : Extrait dichlorométhane à faible concentration

EEP : Extrait éther de pétrole

EHA : Extrait hydro éthanoïque

EHA 200 : Extrait hydro éthanoïque à concentration élevée

EHA 100 : Extrait hydro éthanoïque à moyenne concentration

EHA 50 : Extrait hydro éthanoïque à faible concentration

FOL : *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Fr : Fraction

HEX : Hexane

H₂O : Eau

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

MeOH : Méthanol

ml : Millilitre

R : Rendement

UV : Ultra-violet

µl : Microlitre

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction

Depuis l'Antiquité, l'homme s'est soigné en utilisant les plantes à sa disposition. À travers le temps, les connaissances sur les plantes médicinales se sont développées grâce aux traditions humaines, guidées par le hasard, la religion, la superstition et l'expérience.

Jusqu'au XIXe siècle, les médecins se contentaient principalement des remèdes naturels issus des plantes pour soulager les maux de leurs patients. Cependant, avec les avancées de la chimie, les chercheurs ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes, conduisant à la fabrication de molécules synthétiques au début du XXe siècle et à un déclin de la phytothérapie.

De nos jours, les traitements à base de plantes connaissent un regain d'intérêt, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques diminue et les effets secondaires préoccupent de plus en plus les utilisateurs. Ainsi, de nombreuses personnes se tournent vers des remèdes naturels efficaces et moins agressifs pour l'organisme.

L'Algérie possède une flore riche et diversifiée, comprenant plus de 3000 espèces de plantes médicinales et aromatiques utilisées dans le traitement de diverses maladies(**Quezel et Santa S 1962, Quézel et Santa S 1963**). Ces plantes sont depuis des siècles intégrées à la médecine traditionnelle en Algérie en raison de leurs propriétés thérapeutiques. Elles peuvent être utilisées sous différentes formes, telles que des tisanes, des décoctions, des infusions ou des extraits, pour traiter divers troubles tels que les problèmes digestifs, les maladies cardiovasculaires, les infections et les troubles du sommeil.

Le présent travail se concentre sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. (Syn. *Cytisus triflorus* L'Hérit.), une plante algérienne appartenant à la famille des Fabaceae. Nous nous intéressons particulièrement aux espèces du genre *Cytisus* en raison de leur endémisme, de la richesse en molécules bioactives de ce genre et de l'importance de la famille des Fabaceae. Notre recherche bibliographique sur le genre *Cytisus* a révélé sa richesse en métabolites secondaires, notamment les polyphénols (flavonoïdes, isoflavonoïdes), les terpénoïdes, les alcaloïdes et les phénylpropanoïdes.

Le manuscrit est divisé en trois Chapitres :

- ❖ Le premier chapitre présente une revue de la littérature sur les caractéristiques principales, la répartition géographique et les usages traditionnels de la famille des Fabaceae, du genre *Cytisus*. Il aborde également les métabolites secondaires isolés de ce genre et leurs activités biologiques.

- ❖ Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés dans nos travaux d'extraction et d'analyse de la *Cytisus villosus*. Nous présentons également les différentes méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits de la plante étudiée.

- ❖ Le troisième chapitre présente les résultats obtenus, leur discussion et leur interprétation.

- ❖ Le mémoire se termine par une conclusion générale et perspective.

CHAPITRE I:

Aperçu Bibliographique

I. Aperçu bibliographique

I.1. La famille des Fabaceae

I.1.1. Généralité sur la famille des Fabaceae

La famille des Fabaceae, également connue sous le nom de famille des Légumineuses, est la troisième famille en termes de nombre d'espèces parmi les plantes à fleurs, après les Orchidaceae et les Asteraceae. Elle regroupe environ 730 genres et 19 400 espèces, , comprenant des arbres tropicaux, des arbustes de toutes tailles, des lianes et de petites herbacées annuelles, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Wojciechowski et al. 2004). Le terme "légumineuses" fait référence aux plantes dont le fruit est une gousse. La gousse, également appelée légume, est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves, chacune portant une rangée de graines sans albumen. Les feuilles des légumineuses sont généralement composées de manière alternative, parfois stipulées, avec un pétiole épaissi à la base, elles sont dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, et toujours monocarpellées (DeWitt, 1963).

I.1.2. Classification

Les classifications traditionnelles classent les Fabaceae comme une famille distincte au sein d'un groupe de dicotylédones appelé "Rosides", en raison, en partie, de leurs fruits. La famille est divisée en trois sous-familles (qui ont parfois été considérées comme des familles distinctes au cours de l'histoire taxonomique) : les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Faboideae (également connues sous le nom de Papilionoideae):

- **Mimosoideae Caesalpinoideae** : regroupent principalement des buissons et des arbres tropicaux et subtropicaux, tels que le Mimosa et l'Acacia.
- **Faboideae** : La sous-famille Faboideae est principalement composée de plantes herbacées. Elle représente la sous-famille la plus évoluée dans l'arbre des Légumineuses, ayant divergé au sein de la famille des Fabaceae il y a environ 58,6 millions d'années (Lavin et al., 2005). Elle est également la plus vaste, comptant 483 genres et environ 12 000 espèces (Wojciechowski, 2003). La sous-famille est subdivisée en de nombreuses tribus, qui à leur tour sont subdivisées en plusieurs genres.

Les Faboideae se caractérisent par des feuilles imparipennées, des fleurs papilionacées (avec un calice tubulaire et une corolle à cinq pétales composée d'un étendard dressé à l'anthèse, de deux ailes et d'une carène constituée de deux pétales le plus souvent fusionnés, renfermant les parties fertiles), une initiation unilatérale des sépales, une valve hilaire sur la graine, et un profil chimique particulier permettant la synthèse d'alcaloïdes quinolizidine et d'isoflavones (**Polhill, 1981; Doyle et al., 2000**). Cette dernière est l'objet de notre étude.

I.1.3. Répartition géographique de la famille des Fabaceae

La famille Fabaceae est cosmopolite, ce qui signifie qu'elle est présente dans le monde entier. Cependant, elle est particulièrement bien représentée dans les zones tempérées. Dans les pays chauds, les formes arborescentes des Fabaceae prédominent, tandis que dans les régions tempérées, ce sont les formes herbacées qui sont plus fréquentes. Cette répartition géographique témoigne de l'adaptation des Fabaceae à différents climats et environnements. (**Dupont et al., 2007**).



Figure I. 1. Carte de répartition géographique de la famille des Fabaceae (**Heywood, 1993**) .

I.1.4. Intérêts écologique, nutritionnel et économique de la famille des Fabaceae

La famille des Fabaceae est l'une des plus grandes familles d'angiospermes, comprenant un nombre considérable de plantes qui ont un intérêt économique, alimentaire, agronomique, écologique, ornemental et industriel. Sur le plan économique et agricole, les Fabaceae occupent la deuxième place après les Poaceae et incluent diverses plantes ayant des utilisations alimentaires, ornementales, médicinales et pharmaceutiques.

Leur importance pour la santé humaine et l'alimentation est mise en évidence, bien qu'elles fournissent également des ressources en bois, résines, insecticides, fibres, fourrage, etc..(Bennett 2010, Andriamparany et al., 2014).

L'intérêt agronomique des Fabaceae réside principalement dans leur capacité à former des symbioses avec des bactéries du sol, notamment la bactérie "Rhizobium leguminosarum", pour former des nodules racinaires où ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante. Ainsi, les Fabaceae peuvent produire des protéines végétales en abondance même en l'absence de fertilisation azotée (Mylona et al., 1995).

Cette famille comprend également des variétés horticoles, et de nombreuses espèces sont récoltées à des fins alimentaires, que ce soit pour l'alimentation humaine (haricots, pois, fèves, soja) ou animale (trèfle, luzerne, sainfoin). Elles sont également utilisées pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leurs propriétés médicinales (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou leurs applications chimiques (Wojciechowski et al., 2004).

Dans le domaine industriel, on trouve l'utilisation de bois précieux comme le palissandre (*Dalbergia* spp.), ainsi que des sources exploitées de tanins trouvées dans l'*Acacia mearnsii* et *Caesalpinia* spp.

I.1.5. Importance thérapeutique de la famille des Fabaceae

Beaucoup d'espèces de la famille des Fabaceae possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Cette famille est reconnue comme l'une des cinq familles botaniques les plus riches en termes de propriétés thérapeutiques (Molares et Ladio, 2011). Dans la liste suivante, nous présentons quelques exemples d'espèces et de produits naturels ayant des propriétés médicinales :

- *Trigonella foenum-graecum*, communément appelé fenugrec, est une plante herbacée largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses

affections. Son nom vernaculaire est "halba". Parmi les utilisations médicinales courantes du fenugrec, on retrouve le traitement des plaies, des diarrhées, de l'acné, de la déshydratation, de l'anémie, de la bronchite, des maux d'estomac, de l'hypertension artérielle et de la constipation.

- **La physostigmine**, également connue sous le nom d'eserine, est un alcaloïde extrait de la fève de Calabar tropicale (*Physostigma venenosum*). Cet alcaloïde agit comme un inhibiteur des cholinestérases et possède des propriétés parasymphomimétiques indirectes. Cependant, il a été progressivement remplacé par des composés de synthèse tels que les méthyluréthanes, la néostigmine et la pyridostigmine.
- **Les sennosides**, qui sont des composés laxatifs présents dans *Cassia angustifolia* et *Cassia senna*, sont largement utilisés à des fins médicinales.
- **Le rutoside**, présent dans *Sophora Japonica*, est utilisé dans le traitement des symptômes liés à l'insuffisance veinolymphatique, à la fragilité capillaire, aux crises hémorroïdaires et aux troubles de la vision d'origine vasculaire tels que la diminution de l'acuité visuelle et les problèmes de champ visuel.

I.1.6. Caractères botaniques de la famille des Fabaceae

Les plantes de la famille Fabaceae se présentent sous différentes formes, allant des herbacées aux arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles. Elles ont un métabolisme azoté élevé et contiennent des acides aminés non protéogéniques. De nombreuses espèces de Fabaceae forment des nodules racinaires qui abritent des bactéries fixatrices d'azote telles que *Rhizobium*. Certains membres de cette famille produisent des alcaloïdes, parfois des composés cyanogénétiques. Les feuilles peuvent être entières ou parfois dentées, avec une nervure pennée. Les stipules, présentes, peuvent être minuscules à foliacées, voire transformées en épines. Les inflorescences sont généralement indéterminées, bien que parfois réduites à une seule fleur, et peuvent être terminales ou axillaires (Spichiger et al., 2002).

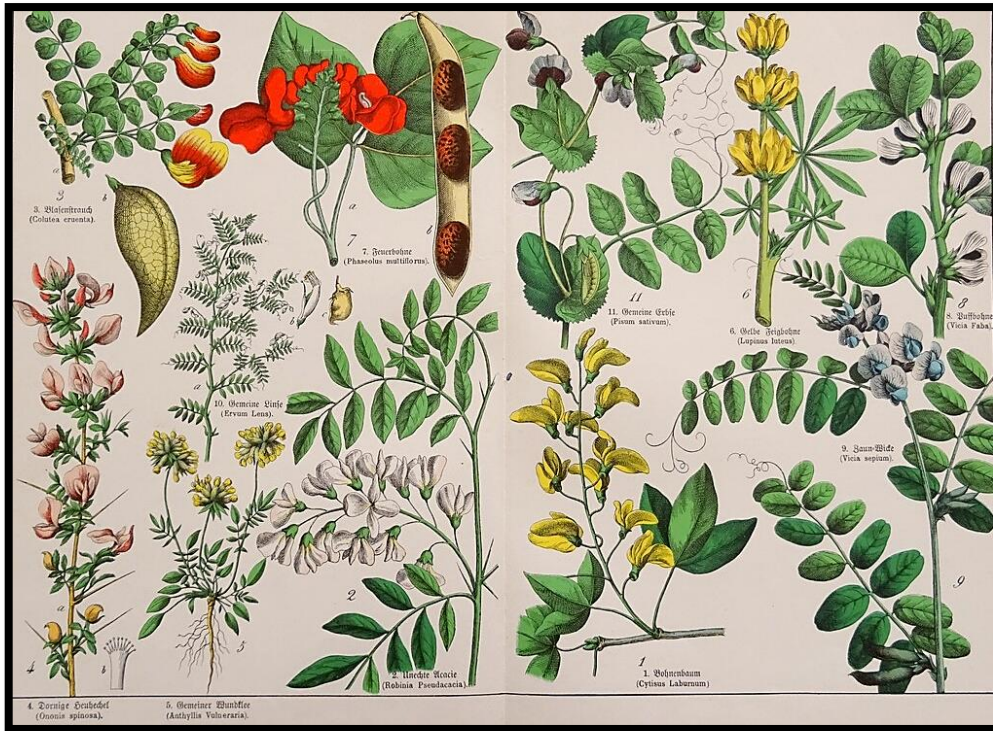


Figure I. 2. Famille des Fabaceae.

I.2. Présentation du genre *Cytisus*

Cytisus est un genre de plantes de la famille des Fabaceae (Légumineuses). Ses espèces sont généralement connues sous les noms de "genêts" ou "cytises". Le genre *Cytisus* est originaire des sites ouverts tels que les landes et les garrigues en Europe, en Asie occidentale et en Afrique du Nord. Il fait partie de la sous-famille des Faboideae et est l'un des nombreux genres de la tribu des Genisteae, couramment appelés "balais". Ces plantes sont des arbustes qui produisent des masses de fleurs en forme de pois, souvent très parfumées et aux couleurs vives. On reconnaît environ 60 espèces dans le genre *Cytisus* selon sa délimitation actuelle. (Cristofolini et Troia, 2006).

Différentes espèces de *Cytisus* sont largement appréciées comme plantes ornementales en raison de leurs fleurs colorées et parfumées. Elles sont couramment utilisées dans les jardins et les aménagements paysagers pour ajouter de la beauté et de la diversité. De plus, certaines espèces de *Cytisus* sont utilisées comme source de nourriture pour le bétail, en particulier pour les pâturages et les zones de pacage. Les animaux herbivores tels que les vaches et les moutons consomment les parties aériennes de ces plantes, ce qui en fait une ressource précieuse en alimentation animale.

Par ailleurs, les apiculteurs collectent également le pollen des fleurs de *Cytisus* pour l'utiliser dans la production de miel. Le pollen de *Cytisus* est apprécié pour sa valeur nutritive et son rôle dans la production de miel de qualité. Enfin, certaines espèces de *Cytisus* sont également utilisées en agriculture pour la fertilisation des terres. Les racines des plantes fixent l'azote atmosphérique dans le sol grâce à une symbiose avec des bactéries, ce qui améliore la fertilité du sol et contribue à la croissance des cultures environnantes (Rodríguez-Riaño et al. 1999, García Ciudad et al. 2004, Rodríguez-Riaño et al. 2004, Rodríguez-Riaño, Valtueña et al. 2006).

I.2.1. Classification dans la systématique botanique

<i>Cytisus</i>	
Royaume	Plantae
Sous-royaume	Tracheobiontae
Embranchement	Spermatophytae
Sous-embranchement	Angiospermae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae (Papilionaceae)
Sous-famille	Faboideae
Tribu	Genisteae
Genre	<i>Cytisus</i>

I.2.2. Description botanique du genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus* est composé d'arbustes à tiges brunes, avec des rameaux présentant une surface verte. Il est possible que des bourgeons adventifs se forment sur les racines. Les feuilles sont relativement petites, composées de trois folioles approximativement arrondies, chacune terminée par une petite pointe. Les feuilles inférieures ainsi que celles des rameaux non fleuris ont un court pétiole. Elles peuvent être plus ou moins coriaces, sans poils, et de couleur vert pâle en dessous. Contrairement à d'autres espèces, elles ne

noircissent pas lorsqu'elles se dessèchent.

Le calice est relativement court et dépourvu de poils. La fleur présente un étendard sans poils, qui est plus long que la carène courbée et se termine par une sorte de bec dressé. Le fruit mûr est également sans poils, assez aplati, mesurant entre 25 et 35 millimètres de longueur sur 9 à 11 millimètres de largeur (DeWitt, 1963) (Figure I.3).

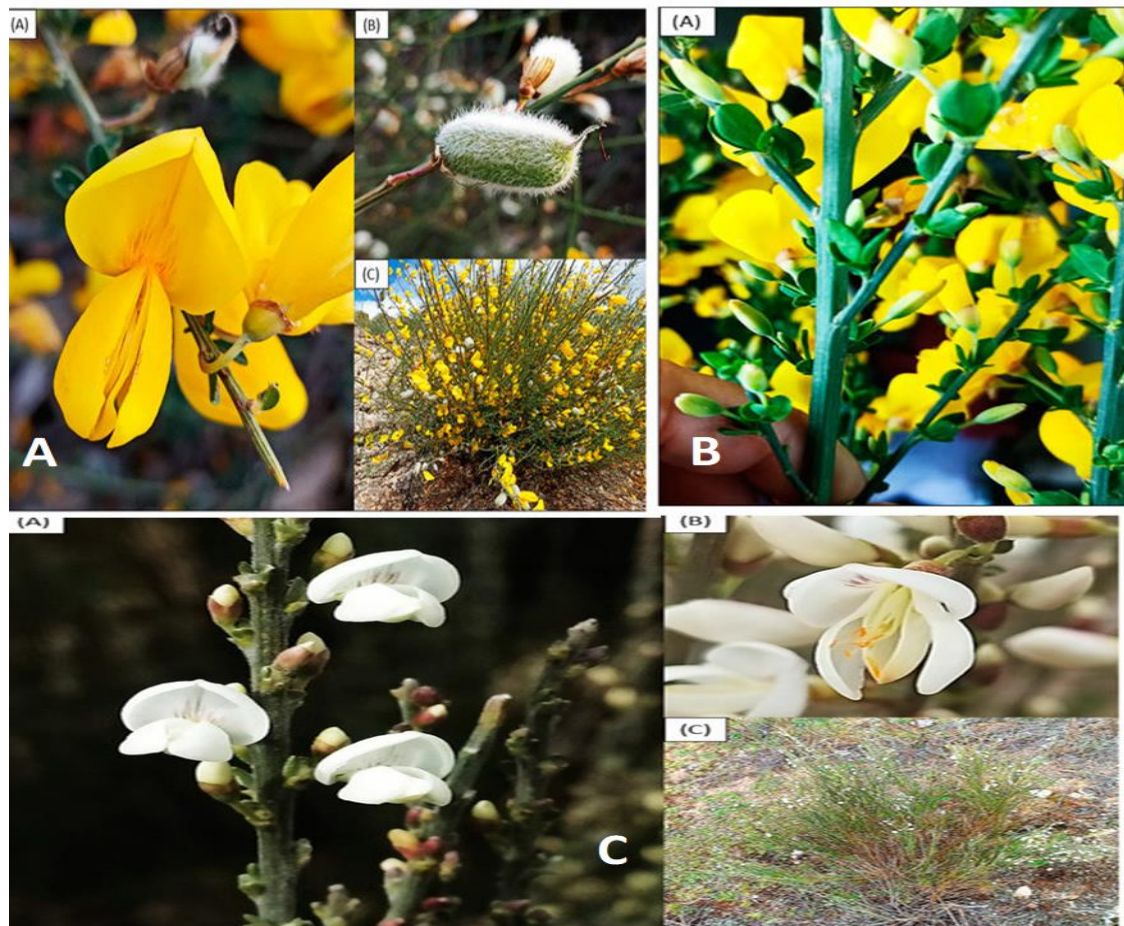


Figure I. 3. Différentes espèces du genre *Cytisus*.

A. *Cytisus striatus*, B. *Cytisus Scoparius*., C. *Cytisus multiflorus* (Caramelo et al. 2022).

I.2.3. Utilisation du genre *Cytisus* en médecine traditionnelle

Le genre *Cytisus* est réputé pour ses propriétés diurétiques et anti-hypertensives. La décoction des feuilles est couramment utilisée pour traiter les affections thoraciques (Hanganu, Vlase et al. 2010). Plusieurs espèces du genre *Cytisus* utilisées en médecine traditionnelle ont été étudiées pour leur potentiel thérapeutique. Elles présentent des propriétés antioxydantes, cytoprotectrices, diurétiques, hypnotiques, anxiolytiques,

sédatives, hépatoprotectrices, antispasmodiques, hypotensives, antiparasitaires, antidiabétiques et oestrogéniques. Ces propriétés variées font des espèces de *Cytisus* des plantes d'intérêt pour le traitement de différents troubles et affections (**Sundararajan et al. 2006, Di Giorgio et al. 2008, Nirmal et al. 2008, Barros et al. 2012, González et al. 2013, Jalili et al. 2013**).

En effet, *Cytisus scoparius* est une espèce largement utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise. Elle est réputée pour ses propriétés diurétiques stimulantes. Dans cette pratique médicinale, elle est utilisée pour revigorer le cœur et le foie et traiter l'insuffisance cardiaque et l'œdème. Ces utilisations traditionnelles suggèrent l'efficacité potentielle de *Cytisus scoparius* dans le soutien de la fonction cardiaque et l'élimination de l'excès de liquide dans le corps (**Sundararajan et Koduru, 2014**).

L'usage et propriétés de quelques espèces du genre *Cytisus* sont résumés dans le tableau ci-après :

Tableau I. 1. Usage et propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Cytisus*.

Espèce	Utilisation médicinale traditionnelle	Références
<i>Cytisus villosus</i> Pourr.	Hémostatique, Traitement des plaies, Cicatrisante	(Larit et al. 2018, Larit, Nael et al. 2018, Larit et al. 2019)
<i>Cytisus scoparius</i>	Diurétique, utile pour traiter l'insuffisance et l'œdème cardiaques	(Sundararajan et Koduru, 2014)
<i>Cytisus multiflorus</i> (genêt d'Espagne)	Diurétiques, anti-inflammatoires, anti-hypertenseurs et antidiabétique.	(Gião et al. 2007)
<i>Cytisus laburnum</i>	Antidépresseur naturel	(Mineur et al. 2007)

I.3. L'espèce de *Cytisus villosus* Pourr.

La *Cytisus villosus* Pourr., également connue sous le nom de *Cytisus triflorus*, est l'espèce étudiée dans ce travail. Elle a été récoltée dans le massif de Collo, situé dans le nord-est de l'Algérie et caractérisé par sa biodiversité et sa richesse en espèces végétales. Cette plante est communément appelée Cytise velu, Genêt velu ou Cytise à trois fleurs. Originnaire de la région méditerranéenne, cet arbrisseau velu atteint généralement une hauteur de 1 à 2 mètres et présente une structure dressée. Ses feuilles sont pétiolées et dotées de folioles larges et obovales. Les fleurs, quant à elles, sont de grande taille et arborent une couleur jaune éclatante (**Figure I.4-I.5**).

Le *Cytisus villosus* est largement répandu dans le nord de l'Algérie et est localement appelé "Lugga". Cette espèce est connue pour ses propriétés médicinales. Elle est renommée pour son action hémostatique, ainsi que pour ses propriétés cicatrisantes. Dans la médecine traditionnelle, elle est aussi utilisée pour traiter les ulcères gastroduodénaux. Les vertus hémostatiques, cicatrisantes et anti-ulcéreuses de la *Cytisus villosus* en font une plante intéressante dans le domaine médical (**Larit, 2017 ; Larit et al. 2018 ; Larit et al. 2019**).



Figure I. 4. Différentes parties de l'espèce *Cytisus villosus* (**Larit, 2017**) .



Figure I. 5. *Cytisus villosus* Pourr. (Syn. *Cytisus triflorus* L'Hérit.) (Photo originale, **F. Larit Mars 2021**).

I.4. Métabolites secondaires isolés du genre *Cytisus*

Les plantes du genre *Cytisus* (Fabaceae) sont connues pour contenir une variété de composés chimiques, notamment des alcaloïdes quinolizidines, des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des phényléthylamines, des lectines et des monoterpènes. Parmi ces composés, les alcaloïdes sont particulièrement abondants et représentent une classe importante de substances actives. Les alcaloïdes les plus couramment isolés du genre *Cytisus* comprennent la spartéine, la lupanine, l'isospartéine et leurs dérivés. Ces alcaloïdes ont montré diverses activités biologiques et pharmacologiques, et sont souvent associés aux effets thérapeutiques observés dans l'utilisation traditionnelle des plantes du genre *Cytisus* (**Iwu, 2014**).

En plus des composés mentionnés précédemment, le genre *Cytisus* est également riche en autres métabolites importants. Parmi eux, on trouve la tyramine, l'épinine, la salsolidine, la génistéine, la quercétine et leurs glycosides, ainsi que l'acide caféique (**Sundararajan et Koduru, 2014**). La

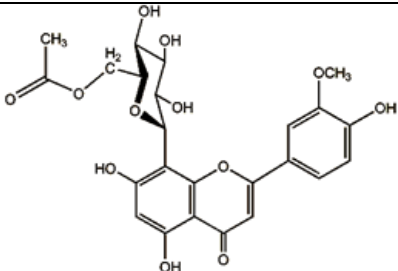
tyramine est un composé phényléthylamine présent dans de nombreux végétaux et est connue pour ses effets stimulants sur le système nerveux central. L'épinine est un alcaloïde qui a été étudié pour ses propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoire. La salsolidine est un alcaloïde quinolizidine présent dans certaines espèces de *Cytisus*, qui a montré des activités antimicrobiennes et antiparasitaires. La génistéine et la quercétine sont des flavonoïdes avec des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Larit, 2017). L'acide caféique est un acide phénolique présent dans de nombreuses plantes et est connu pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces métabolites confèrent aux plantes du genre *Cytisus* leurs propriétés bioactives et sont responsables des effets thérapeutiques potentiels observés dans leur utilisation en médecine traditionnelle.

Dans l'espèce *Cytisus scoparius*, plusieurs composés flavonoïdes et isoflavones ont été identifiés, tels que la flavone 6"-O-acétyl-scoparine, les flavonols kaempférol, rutine, quercétine, quercitrine et isorhamnetine, ainsi que les isoflavones génistéine et sarothamnoside (Sundararajan et Koduru, 2014). De même, les espèces *Cytisus nigricans* et *Cytisus albus* contiennent les isoflavones ononine et génistéine (Hanganu et al., 2010a; Hanganu et al., 2010b).

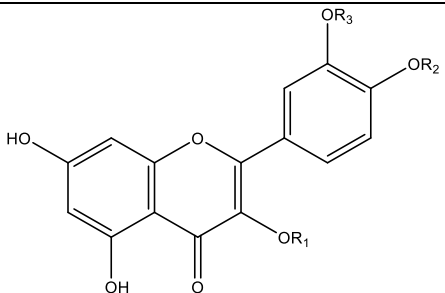
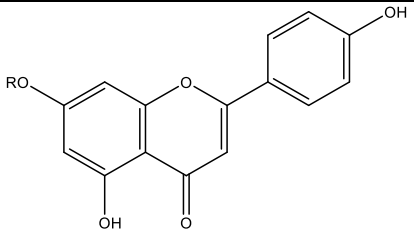
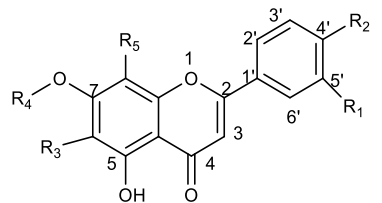
Les principaux composés phénoliques isolés des plantes du genre *Cytisus* sont présentés dans le tableau ci-dessous :

I.4.1. Flavonoïdes

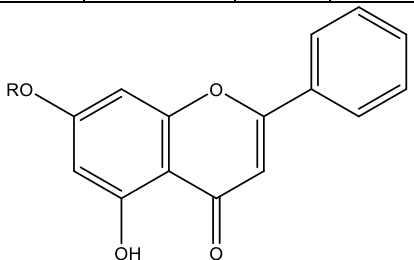
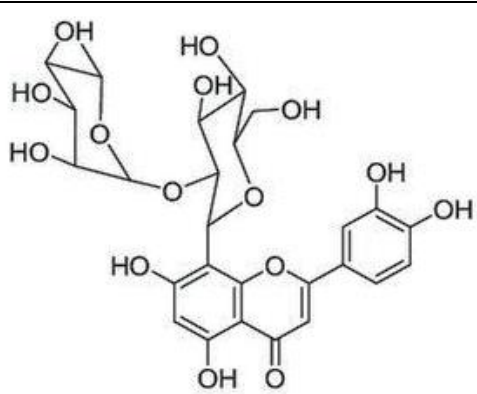
Tableau I. 2. Flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces de *Cytisus*.

N°.	Nom	Structure	Plante	Ref.
1	6"-O acétyl scoparine		<i>Cytisus scoparius</i>	(Brum et al. 1977)

CHAPITRE I: Aperçu Bibliographique

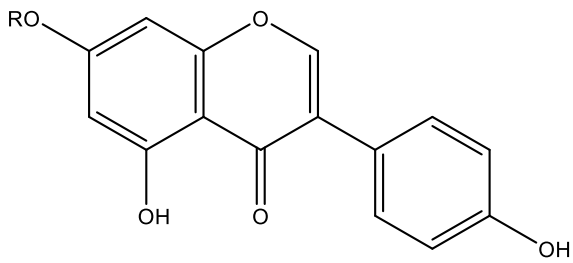
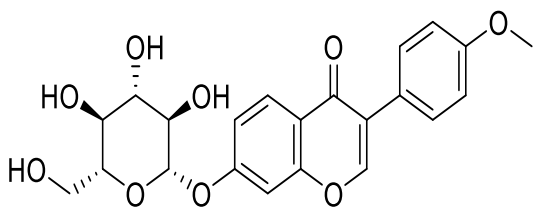
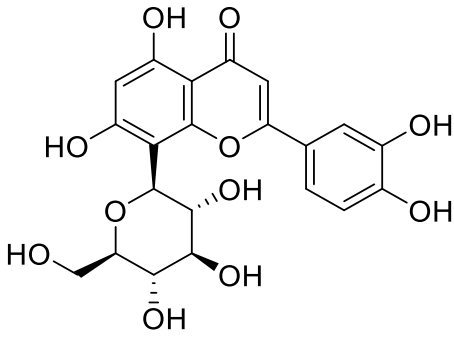
								
		R ₁	R ₂	R ₃				
2	Quercétine	H	H	H	<i>Cytisus scoparius</i>	(Lores et al. 2015)		
					<i>Cytisus multiflorus</i>	(Pereira et al. 2012)		
3	Rutine	β-Rut	H	H	<i>Cytisus multiflorus</i>			
4	Quercitrine	Rha	H	H	<i>Cytisus multiflorus</i>			
5	Kaempférol	H	H	H	<i>Cytisus scoparius</i>	(Lores et al. 2015)		
6	Isorhamnétine	H	H	CH ₃	<i>Cytisus scoparius</i>	(Barros et al. 2012)		
								
		R						
12	Apigénine	H			<i>Cytisus multiflorus</i>	(Pereira et al. 2013)		
13	Apigénine -7-O-glucoside	Glc						
								
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅		
14	2''-O-pentosyl- 6- C-hexosyl-lutéoline	OH	OH	Hex-Pent	H	H	<i>Cytisus multiflorus</i>	(Pereira et al. 2012)
15	2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-lutéoline	OH	OH	H	H	Hex-Pent		
16	2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl- apigénine	H	OH	Hex-Pent	H	H		

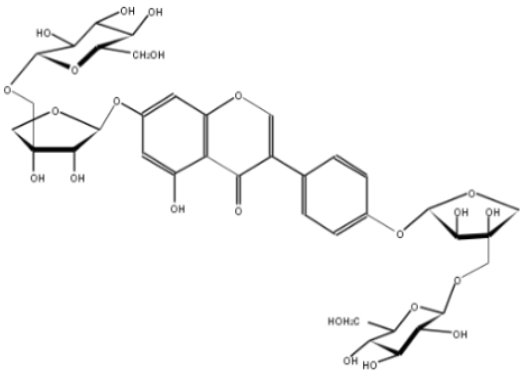
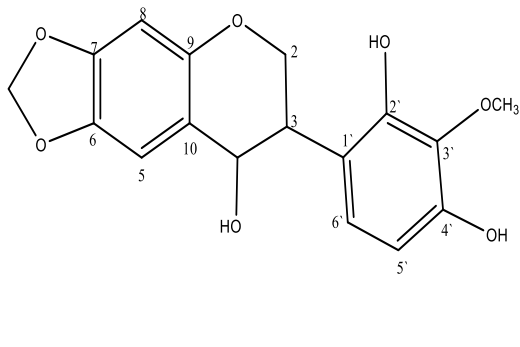
CHAPITRE I: Aperçu Bibliographique

17	2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl- apigénine	H	OH	H	H	Hex-Pent			
18	6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-lutéoline	OH	OH	H	H	Hex-Pent-HMG	<i>Cytisus multiflorus</i>	(Pereira et al. 2012)	
19	6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-apigénine	H	OH	H	H	Hex-Pent-HMG			
									
R									
20	Chrysine	H					<i>Cytisus multiflorus</i>		(Pereira et al. 2012)
							<i>Cytisus villosus</i> Pourr.		(Larit et al. 2018)
21	Chrysine-7-O-β-D-glucopyranoside	Glc					<i>Cytisus multiflorus</i>		(Pereira et al. 2012)
							<i>Cytisus villosus</i> Pourr.		(Larit et al. 2018)
22	2''-O-α-L-rhamnosylorientine						<i>Cytisus villosus</i> Pourr.	(Larit et al. 2018)	
Hex : Hexose, Pent : Pentose, Glc : Glucoes, HMG : 3-hydroxy-3-methylglutaroyl									

I.4.2. Isoflavonoïdes

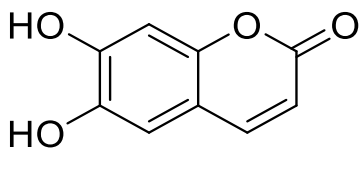
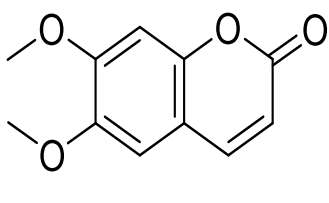
Tableau I. 3. Isoflavonoïdes isolés de différentes espèces de *Cytisus*.

				
		R		
1	Génistéine	H	<i>Cytisus scoparius</i>	(Viscardi et al. 1984)
			<i>Cytisus villosus</i> Pourr.	(Larit et al. 2018)
2	Génistine	Glc	<i>Cytisus albus</i>	(Hanganu et al. 2010)
3	Ononine		<i>Cytisus nigrians</i>	(Hanganu et al. 2010)
4	Orientine		<i>Cytisus multiflorus</i>	(Pereira et al. 2012)

5	Sarothamnoside		<i>Cytisus scoparius</i>	(Viscardi et al. 1984)
6	4-(8-hydroxy-7,8-dihydro-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-7-yl)-2-methoxybenzene-1,3-diol		<i>Cytisus villosus</i> Pourr.	(Larit et al. 2018)

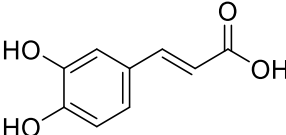
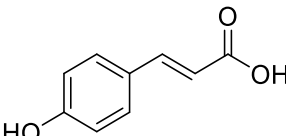
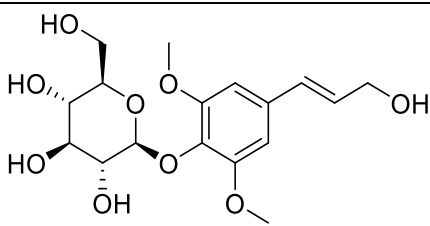
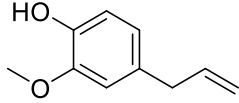
I.4.3. Les coumarines

Tableau I. 4. Coumarines isolées de différentes espèces de *Cytisus*.

N°	Nom	Structure	Plante	Ref.
1	Esculétine		<i>Cytisus scoparius</i>	(Brum et Paris 1974, Kurihara et Kikuchi 1980)
2	Scoparone			

I.4.4. Phénylpropanoïdes

Tableau.I. 5. Phénylpropanoïdes isolés de différentes espèces de *Cytisus*.

N°	Nom	Structure	Plante	Ref.
1	Acide caféique		<i>Cytisus scoparius</i>	(Kurihara et Kikuchi ,1980)
2	Acide paracoumarique			
3	Syringine		<i>Cytisus scoparius</i>	(Sundararajan et Koduru, 2014)
4	Eugénol			

I.5. Études pharmacologiques antérieurs sur le genre *Cytisus* et l'espèce *Cytisus villosus* Pourr.

De nombreuses études ont cité l'utilisation de plantes du genre *Cytisus* à des fins médicinales, notamment en tant qu'hypotenseurs, antidiabétiques, anti-inflammatoires et diurétiques. Des études pharmacologiques ont confirmé certaines des informations ethnomédicales.

Les plantes du genre *Cytisus* ont démontré des effets antidiabétiques, hypnotiques, sédatifs, antioxydants, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypotensifs et œstrogéniques (Nirmal et al. 2008, Pereira et al. 2012, Jalili et al. 2013).

Les propriétés thérapeutiques, notamment l'activité antioxydante, des différentes espèces de *Cytisus* sont liées à leur concentration élevée en composés phénoliques (Luis, Domingues et al. 2009, Larit, León et al. 2019).

Certains effets pharmacologiques des plantes du genre *Cytisus* et de l'espèce étudiée, *Cytisus villosus*, sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau I. 6. Activités pharmacologiques de quelques espèces du genre *Cytisus*.

Espèces	Zone de répartition	Parties/Extrais	Activités pharmacologiques	Références
<i>C. scoparius</i> Link	Inde	Feuilles	Diurétique	(Nirmal et al. 2008)
		Toute la plante	Hypnotique Anxiolytique	(Siegel, 1976)
	Brazil	Toute la plante	Antidiabétique	(Osório et Castro 1998) (Osório et Castro 2001)
	Portugal	Toute la plante	Antispasmodique Diurétique Antihypertenseur	(Gião et al. 2007)
<i>C. salvifolia</i>	Tunisie	Feuilles	Activité enzymatique	(Boubaker et al. 2004)
<i>C. syriacus</i>	Liban	Toute la plante	Antiparasitique	(Di Giorgio et al. 2008)
<i>C. striatus</i>			Antioxydante	(Pinela et al. 2011)
<i>C. multiflorus</i> ; <i>C. scoparius</i> ; <i>C. striatus</i>	Portugal	Fleurs	Activité Antioxydante	(Pinela et al. 2011)
<i>C. scoparius</i>	Espagne	Toute la plante	Antioxydante Anti bactérienne	(González, Ribeiro et al. 2013) (Lores et al. 2015)
<i>C. laburnum</i>	USA	Graines et de gosses	Antidépessante	(Papke et al. 2015)
<i>C. triflorus</i>	Tunisie	Feuilles	Activité enzymatique	(Boubaker et al. 2004)
<i>C. villosus</i> Pourr.	Algérie	Parties aériennes	Antioxydante, anti-inflammatoire, antitrypanosomien, MAO inhibition	(Larit et al. 2018, Larit et al. 2019)

CHAPITRE II:

Matériel Et Méthodes

II. Matériel et méthodes

Extraction

II.1.1. Choix du matériel végétal

Notre intérêt pour les espèces du genre *Cytisus* est dû à leur endémisme. La recherche bibliographique que nous avons menée sur le genre *Cytisus* a révélé sa richesse en métabolites secondaires, notamment les polyphénols.

Nous avons spécifiquement choisi d'étudier *Cytisus villosus* Pourr. (Syn. *Cytisus triflorus*) parmi les espèces du genre *Cytisus*. Cette décision est motivée par sa répartition dans la région d'étude, son utilisation dans la médecine traditionnelle, l'intérêt qu'elle suscite dans ce domaine, ainsi que sa richesse en molécules bioactives.

II.1.2. Récolte de l'espèce

Les parties aériennes de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. ont été récoltées dans la région de Collo au stade de floraison entre avril et mai 2021. Par la suite, elles ont été soigneusement séchées dans un lieu bien ventilé, à l'abri de la lumière directe du soleil. Une fois séchées, les parties récoltées ont été conservées à température ambiante en vue de l'étape d'extraction.

II.1.3. Extraction

Après avoir broyé les parties aériennes de la plante (**Figure II.1.**), elles ont été pesées. Ensuite, les parties aériennes broyées et pesées ont été mises à macérer dans un mélange hydroalcoolique (éthanol/eau ; 80:20 ; v/v) à température ambiante. Le premier extrait obtenu à partir de la plante est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 40°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor) (**Figure II.2.**). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, et chaque macération dure de 24 à 48 heures.

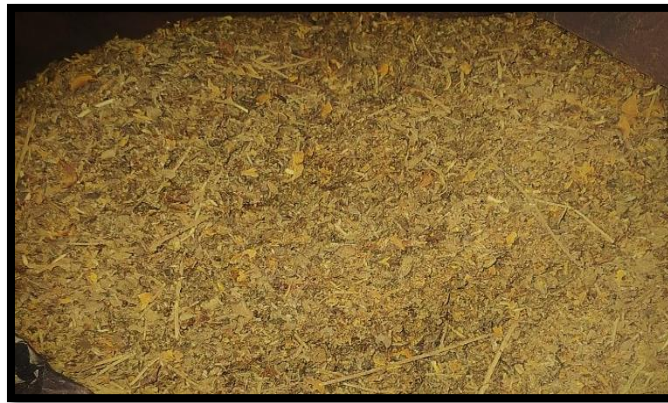


Figure II. 1. Parties aériennes broyées de la plante *Cytisus villosus* (Photo originale).



Figure II. 2. Évaporateur Rotatif (Photo originale).

Les extraits hydroéthanoliques recueillis sont regroupés, concentrés et pesés. À la solution concentrée, 200 ml d'eau sont ajoutés. La solution est ensuite laissée à froid pendant une nuit pour permettre la décantation. Cette étape permet la séparation de la chlorophylle, des cires, du sable, etc. Après filtration, on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse est ensuite soumise à une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole, puis le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol (**Figure.II.3.**). Les quatre phases organiques obtenues à partir de chaque espèce sont séchées, concentrées sous pression réduite jusqu'à séchage complet, puis pesées.



Figure II. 3. Extraction liquide-liquide de l'extrait hydroéthanolique de l'espèce *Cytisus villosus* (Photo originale).

Les extraits obtenus avec leurs masses respectives sont présentés dans le tableau ci-après :

Tableau II. 1. Les masses des extraits obtenus de l'extraction de l'espèce *Cytisus villosus*

Masse du matériel végétal : 304.89g					
L'extrait	Hydroéthanolique	Éther de pétrole	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol
Masse extraits (g)	63.63	00.12	00.60	01.19	14.30

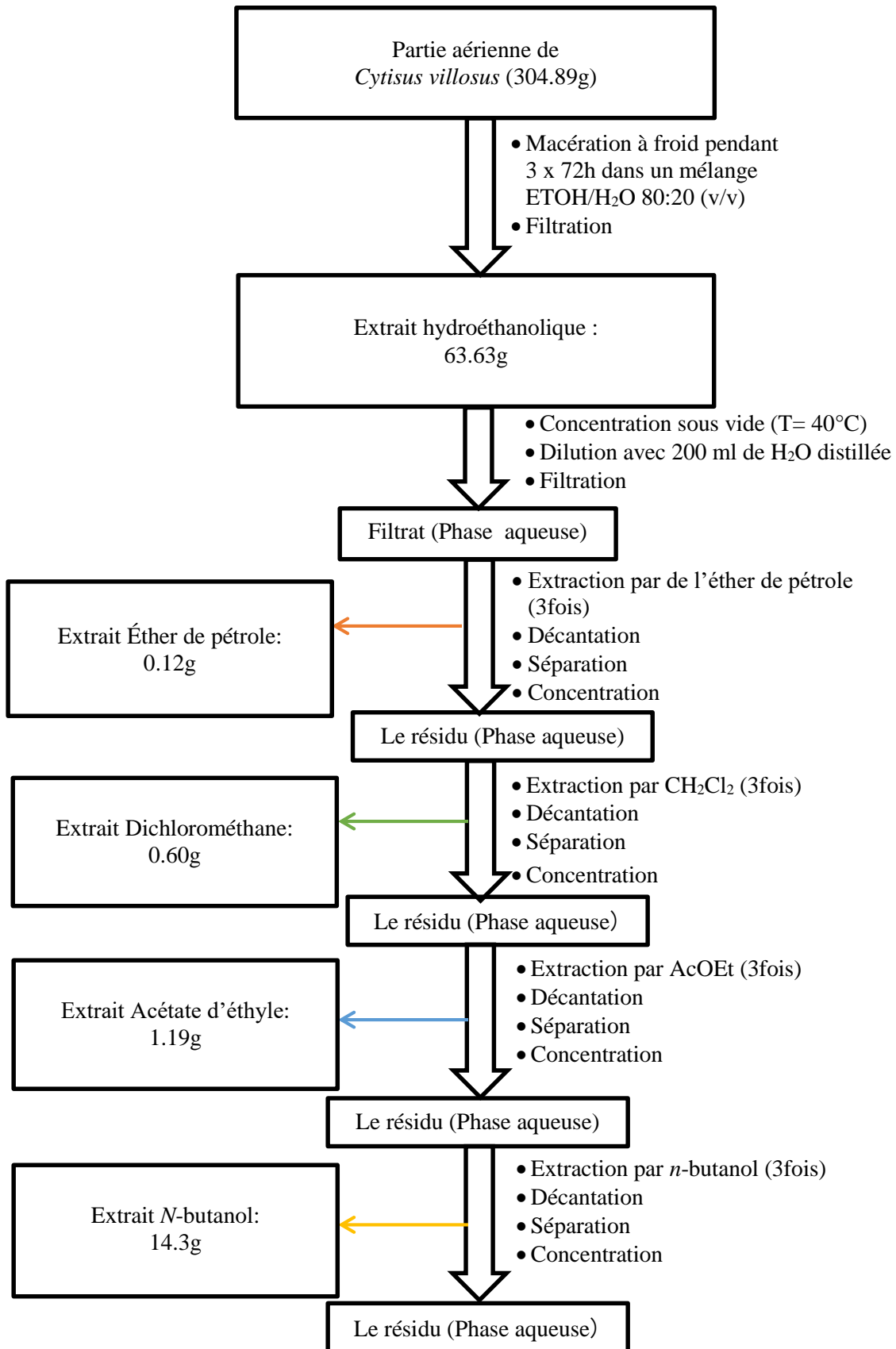


Figure II. 4. Organigramme d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Cytisus villosus*.

II.1.4. Calcul du rendement d'extraction

Les méthodes utilisées précédemment ont permis d'obtenir cinq extraits, dont le rendement a été calculé en utilisant la relation suivante :

$$R = (\text{poids de l'extrait obtenu (g)} / \text{poids de la matière végétale totale (g)}) \times 100.$$

R est le rendement en %.

II.2. Méthodes d'analyse chromatographique

II.2.1. Chromatographie plaque CCM analytique

La chromatographie d'adsorption est une technique de séparation des composés basée sur leur affinité différente avec une phase mobile et une phase stationnaire. Dans la chromatographie sur couche mince (CCM), qui est la méthode chromatographique la plus simple, une phase stationnaire est déposée sur une plaque d'aluminium. La phase mobile, appelée éluant, est transportée vers le haut de la plaque par capillarité. Cette technique est largement utilisée, en particulier dans la réalisation de colonnes chromatographiques, pour des analyses de composés. (Figure.II.5).

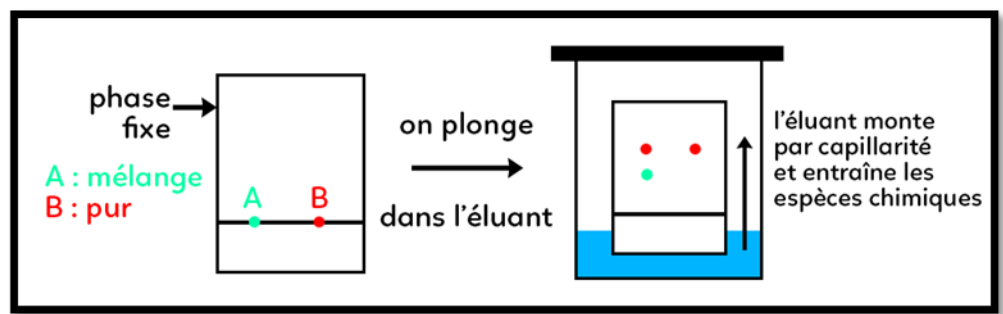


Figure II. 5. Schéma d'une chromatographie sur couche mince.

Les chromatographies par CCM analytique ont été réalisées sur des plaques de gel de silice en utilisant différents systèmes d'élution. Les CCM ont été analysées en utilisant à la fois la lumière visible et les UV à des longueurs d'onde de 254 et 356 nm, ce qui permet de différencier les différents métabolites secondaires possédant des chromophores. Ces analyses sont effectuées avant et après la révélation des plaques à l'aide de réactifs appropriés. Parmi les réactifs les plus fréquemment employés, on peut citer :

❖ **Réactif à la vanilline sulfurique**

Un révélateur universel largement utilisé en chromatographie sur couche mince. Il permet de révéler la plupart des composés organiques présents sur la plaque. Pour préparer ce réactif, on mélange 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et 100 ml d'éthanol. Une fois la plaque chromatographique pulvérisée avec ce réactif, elle est chauffée à l'étuve pendant quelques minutes à une température de 110°C. Cette réaction de révélation permet de visualiser les taches correspondant aux différents composés présents sur la plaque.

❖ **Réactif à l'acide sulfurique**

Pour préparer ce réactif, on mélange 4 ml d'acide sulfurique, 80 ml d'acide acétique et 16 ml d'eau. Une fois la plaque chromatographique pulvérisée avec ce réactif, elle est chauffée à l'étuve pendant quelques minutes à une température de 110°C.

Ces réactifs permettent de visualiser les taches des différents composés présents sur les plaques et facilitent leur identification.

❖ **Calcul de Rapport frontal (R_f)**

Chaque composant chromatographique est caractérisé par son rapport frontal, noté R_f . Le rapport frontal d'un constituant est défini comme le rapport entre la distance parcourue par ce composant et la distance parcourue par l'éluant en fin d'expérience. Il s'agit d'un paramètre qui permet d'évaluer la séparation et la rétention des différents composés sur la plaque chromatographique. Le R_f est calculé en mesurant les distances à partir des points d'application des échantillons jusqu'aux fronts des taches formées par les composants.

$$R_f = \text{distance composant} / \text{distance éluant}$$

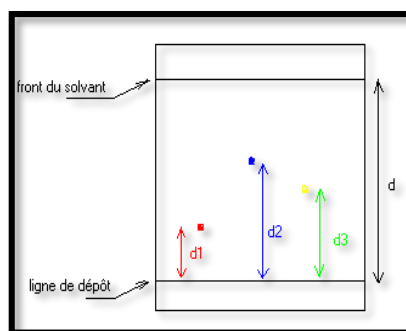


Figure II. 6. Calcul du rapport frontal.

$$R_{f1} = d_1/d \quad R_{f2} = d_2/d \quad R_{f3} = d_3/d$$

II.2.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC), également connue sous le nom de chromatographie en phase liquide (CPL) ou liquid chromatography (LC), est une technique séparative largement utilisée en analyse quantitative et qualitative, principalement dans le domaine de la chimie analytique. Elle est également appliquée dans des domaines variés tels que la toxicologie et la biochimie.

L'HPLC est une évolution de la chromatographie classique sur colonne ouverte, qui bénéficie d'une résolution considérablement améliorée grâce à l'utilisation de phases stationnaires composées de grains sphériques de petite taille. Cependant, en échange, la phase mobile doit être poussée sous une forte pression pour surmonter la perte de charge dans la colonne et assurer un débit contrôlé.

L'HPLC offre de nombreux avantages, tels qu'une grande sensibilité, une large gamme d'applications, une séparation rapide et efficace des composés, ainsi qu'une possibilité d'automatisation. Cette technique permet l'analyse de divers échantillons, qu'ils soient liquides, solides ou gazeux, et offre une excellente résolution des mélanges complexes de composés.

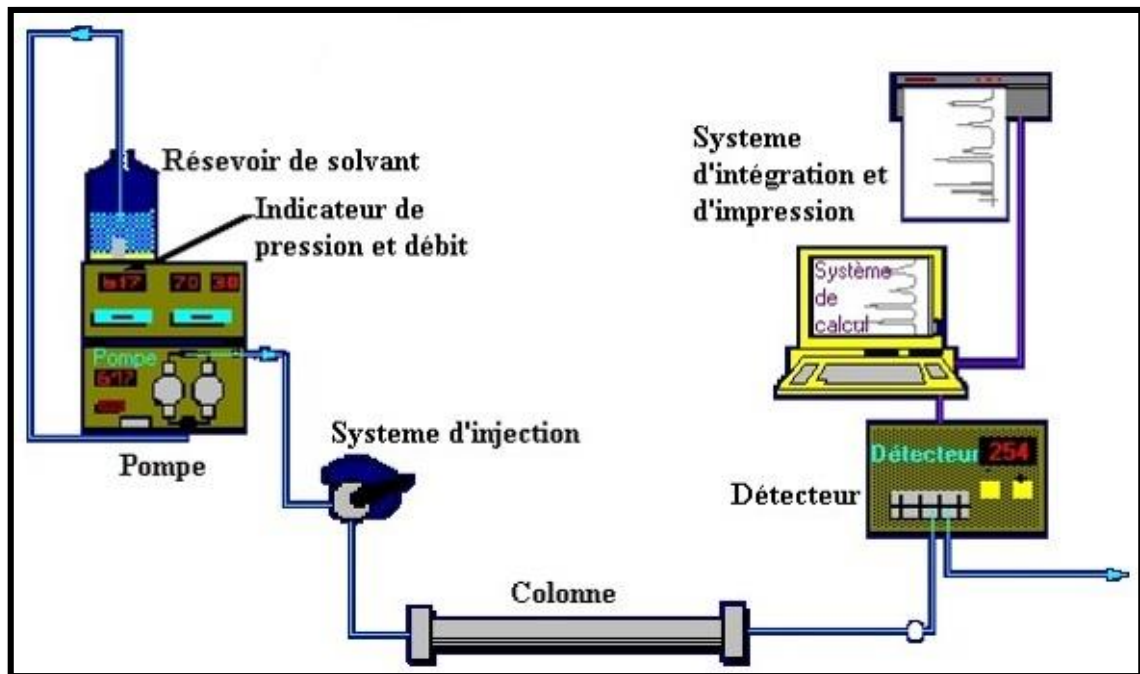


Figure II. 7. Schéma de principe de chaîne HPLC.

❖ Analyse par Chromatographie liquide à haute performance

L'analyse est réalisée au Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) à l'aide d'un chromatographe SHIMADZU SPD-10A. Ce chromatographe est de type HPLC-RP-C18 (**Figure II.8**) et est équipé des éléments suivants :

1. **Colonne** : Il s'agit d'une colonne RESTEK ultra C18 d'une longueur de 250 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm.
2. **Pompe** : Il s'agit de la pompe LC-10 AT prominence liquide chromatographie (SHIMADZU).
3. **Injecteur** : Il s'agit du SIL-20 A prominence auto sampler (SHIMADZU).
4. **Détecteur** : Il s'agit du SPD-20 prominence UV/VIS detector (SHIMADZU).
5. **Logiciel informatique** : Le logiciel Lab Solution est utilisé pour visualiser et enregistrer les signaux détectés par le détecteur.

- La phase mobile utilisée est de composition constante et fonctionne en mode gradient. Elle est composée d'une solution d'eau ultra pure contenant 1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant C). Le gradient de solvants permet de contrôler l'éluant et d'optimiser la séparation des composés dans l'échantillon.

- Les conditions opératoires sont les suivantes :

- ✓ Débit : 0.8 ml/min.
- ✓ Volume d'injection : 20 µl.
- ✓ La température est réglée à 30°C.
- ✓ Longueur d'onde : 254 nm.
- ✓ Concentration de l'échantillon : 10mg/ml.
- ✓ Temps d'analyse : 35min.

Tableau II. 2.Gradient d'éluion HPLC pour l'analyse des polyphénols.

Temps (min)	A (ml)	C (ml)
0,01	95	5
20	0	100
25	0	100
30	95	5
35	95	5

A = Eau Ultra pure acidifiée

C = Acétonitrile



Figure II. 8. HPLC (SHIMADZU) (photo originale).

II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne fait référence à la capacité d'une substance ou d'un agent à inhiber ou à détruire les micro-organismes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. L'objectif principal de l'activité antimicrobienne est de contrôler la croissance et la propagation de ces organismes pathogènes. L'activité antimicrobienne peut être mesurée de différentes manières, notamment par des tests de sensibilité aux antibiotiques ou des tests d'efficacité antivirale. Ces tests évaluent la capacité d'une substance à inhiber la croissance microbienne ou à tuer les micro-organismes.

II.3.1. Activité antifongique

Nous avons sélectionné une seule souche pour notre étude sur les propriétés antifongiques des extraits de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. (Syn. *Cytisus triflorus* L'Hérit.). Il s'agit de la souche *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL).

II.3.1.1. Matériel fongique

➤ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL)

La souche du champignon *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, responsable de la fusariose vasculaire de la tomate, a été fournie par le laboratoire de mycologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt). Les tests ont été réalisés dans le laboratoire de mycologie du CRBt. La fusariose est une maladie courante qui affecte les plants de tomate en attaquant leurs tissus vasculaires. Cette souche spécifique est l'agent pathogène responsable de cette maladie. Dans notre étude, nous utilisons cette souche pour évaluer l'activité antifongique des extraits de la plante étudiée. L'objectif est de comprendre l'efficacité potentielle de ces extraits dans le contrôle de la fusariose vasculaire de la tomate.

L'extrait hydroalcoolique, dichlorométhane et acétate d'éthyle de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. ont été sélectionnés pour évaluer leur activité antifongique ou leur pouvoir antimycosique (**Figure.II.9**).

L'activité inhibitrice des différents extraits sur la croissance du mycélium des agents phytopathogènes est évaluée en mesurant la croissance radiale du champignon sur un milieu PDA (pomme de terre, dextrose, gélose) contenant l'extrait testé.



Figure II. 9. Extraits testés contre *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*.

II.3.1.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phyto – pathogènes. On a préparé le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) en suivant le protocole ci-dessous :

1. Éplucher, laver et couper 200 g de pommes de terre en tranches.
2. Faire bouillir les tranches de pommes de terre dans 1 litre d'eau distillée pendant 20 minutes.
3. Laisser le bouillon de pommes de terre décanter ou filtrer-le à travers un morceau de coton propre pour éliminer les particules solides.
4. Ajouter 20 g de glucose et 15 g d'agar-agar en poudre au bouillon de pommes de terre. Mélanger pour assurer une dissolution complète.
5. Ajouter de l'eau distillée pour obtenir un volume final d'un litre.
6. Transférer le mélange dans des flacons ou des boîtes de culture stériles.
7. Stériliser le milieu de culture PDA en autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.
8. Laisser le milieu de culture refroidir à température ambiante avant utilisation.



Figure II. 10. Préparation du milieu de culture.

II.3.1.3. Ajout des extraits végétaux

Le protocole pour la préparation des échantillons à partir des extraits testés, à savoir l'extrait hydroalcoolique (EHA), l'extrait dichlorométhane (EDM) et l'extrait acétate d'éthyle (EAE) est le suivant :

1. Préparation d'une solution mère en mélangeant 50 mg de l'extrait avec 200 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde).
2. À partir de la solution mère, on a obtenu la première solution diluée en prélevant 60 ml de la solution mère et en ajoutant 60 ml de DMSO.
3. Ensuite, la deuxième dilution a été préparée en prélevant 30 ml de la solution mère et en ajoutant 90 ml de DMSO.



Figure II. 11. Préparation des échantillons.

II.3.1.4. Effet des extraits de *C. villosus* sur la croissance mycélienne de FOL

Dans cette étude, nous avons utilisé un total de 33 boîtes de Pétri pour évaluer l'activité antifongique des extraits.

Pour chaque extrait, nous avons préparé trois concentrations différentes :

- Une concentration élevée de 200 mg/ml (24 mg/120 μ l).
- Une concentration moyenne de 100 mg/ml (12 mg/120 μ l).
- Une concentration faible de 50 mg/ml (6 mg/120 μ l).

La préparation des boîtes de Pétri a commencé par l'ajout de la gélose de PDA, qui a ensuite été laissée refroidir et solidifier. En ce qui concerne les boîtes contenant les extraits à tester (EHA, EDM et EAE), nous avons utilisé une micropipette pour ajouter 40 μ l des différentes concentrations d'extrait dans les boîtes prévues. Ensuite, nous avons déposé un disque de 5mm contenant le champignon « FOL » au centre de chaque boîte.

Pour le témoin positif (FOL⁺), nous avons ajouté 120 μ l de DMSO sur le disque de champignon, tandis que pour le témoin négatif (FOL⁻), aucun ajout n'a été effectué.

Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant trois jours (72 heures) pour permettre la croissance du champignon.



Figure II. 12. Incubation des cultures.

II.3.1.5. Lecture des résultats

À la fin de l'incubation, nous avons mesuré le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de champignon dans les boîtes contenant les extraits. De plus, nous avons mesuré le diamètre de croissance moyen du champignon (en millimètres) pour chaque concentration d'extrait.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon pour chaque extrait, par rapport au diamètre moyen des colonies de chaque milieu cultivé sans contrôle. Ainsi, l'activité d'inhibition a été exprimée en pourcentage et a été calculée selon la formule suivante :

$$TI\% = T - TR/T \times 100$$

TI : taux d'inhibition.

T : C'est la croissance diamétrale du champignon dans le groupe témoin (sans traitement ou avec un contrôle).

TR : la croissance diamétrale du champignon dans le groupe traité avec l'extrait.

CHAPITRE III :

Résultats Et Discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Extraction

L'extraction des métabolites secondaires des parties aériennes de la plante *Cytisus triflorus* a été réalisée par macération du matériel végétal (304.89g) dans une solution hydroéthanolique (80/20 ; V/V). Par la suite, des extractions liquide-liquide ont été effectuées en utilisant quatre solvants : l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol, dans le but d'obtenir les extraits correspondants. L'utilisation de solvants présentant des polarités différentes permet de séparer les composés de l'extrait brut en fonction de leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les rendements calculés pour chaque extrait sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III. 1. Rendements des extraits.

Solvant d'extraction	Code	Masse de l'extrait (g)	Rendement (%)
Ether de pétrole	EEP	0.12	0,04
Dichlorométhane	EDM	0,6	0,20
Acétate d'éthyle	EAE	1,19	0,40
<i>n</i> -butanol	EBT	14.3	4.70

Le rendement est exprimé en pourcentage de la masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait butanolique de la plante *Cytisus villosus* (4,7%), suivi par l'extrait acétate d'éthyle (0,4%), et l'extrait dichlorométhane (0,2%), et enfin, l'extrait éther de pétrole qui présente le rendement le plus faible (0,04%). En générale, le rendement dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

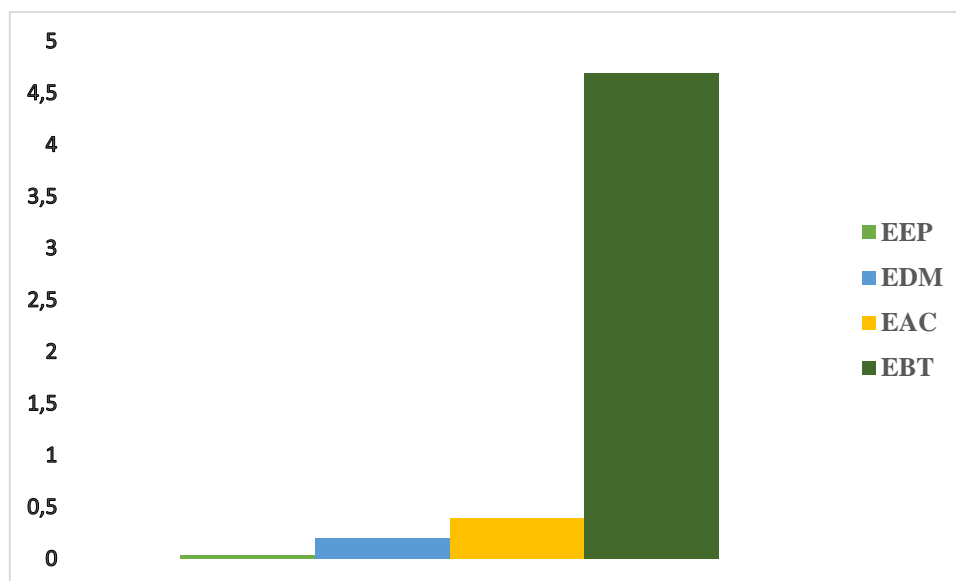


Figure III. 1. Histogramme des rendements (%) d'extraction liquide-liquide des parties aériennes de l'espèce *Cytisus villosus*.

III.2. Etude phytochimique

III.2.1. Analyses qualitatives

III.2.1.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Pour effectuer une caractérisation partielle des différents extraits des plantes étudiées, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée en utilisant divers systèmes solvants jusqu'à obtenir une séparation adéquate et une visibilité acceptable des tâches. Les chromatogrammes ont été observés sous une lampe UV à deux longueurs d'onde standard, à savoir 254 nm et 365 nm.

Les CCM visualisées sous UV à 365 nm ainsi qu'après immersion dans la solution de révélation (vanilline sulfurique et acide sulfurique) ont révélé des taches de différentes couleurs, telles que le violet, le brun, le bleu, le jaune et le rose. Ces différentes couleurs de taches peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. Les différentes classes de métabolites secondaires comprennent notamment les flavonoïdes, les terpènes et bien d'autres. Il est également observé qu'il existe des différences en termes de nombre et de couleur des taches entre les différents solvants d'extraction tels que l'éther de pétrole, le dichlorométhane, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle (**Figures III.2-III.6**). Ces variations peuvent être attribuées aux propriétés de solubilité différentes des métabolites secondaires présents dans les extraits végétaux. Certains solvants peuvent extraire plus efficacement certains types de métabolites, ce qui se traduit par une plus grande diversité de taches observées.

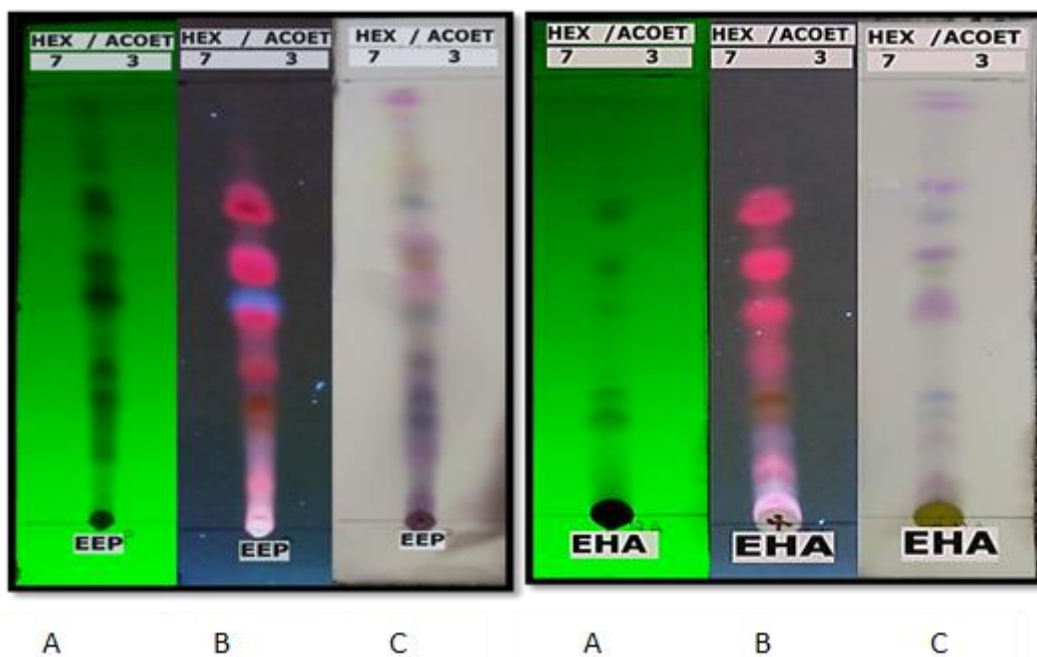


Figure.III. 2. Profils CCM des extraits des extraits EEP et EHA.Système d'éluant (Hexane/ AcOEt : 7/3 ; v/v).

Ces différences sont également observées pour les éluants testés pour chaque extrait. En effet, un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle dans un rapport de 7/3, et un mélange d'hexane et de diéthyléther dans un rapport de 3/7 ont été déterminés comme les éluants les plus efficaces pour obtenir une séparation appropriée des composés présents dans les extraits **EEP** (Extrait d'Éther de Pétrole) et **EDM** (Extrait de Dichlorométhane) lors de la chromatographie (**Figures III.3, III.4**).

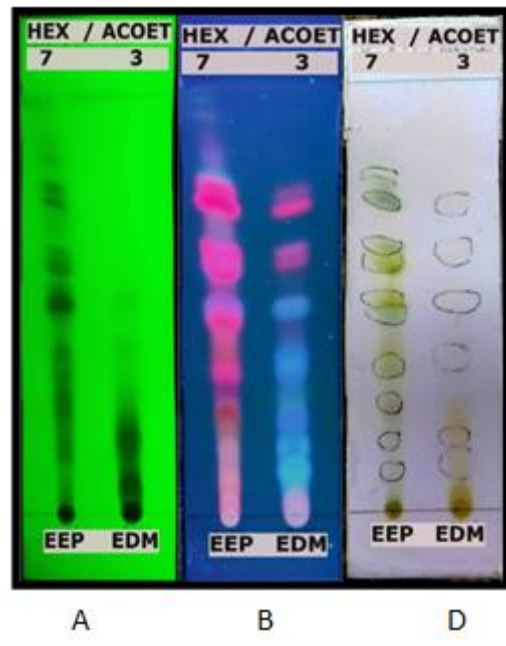


Figure III. 3. Profils CCM des extraits EEP et EDM. Système d'éluion (Hexane / AcOEt : 7/3 ; v/v).

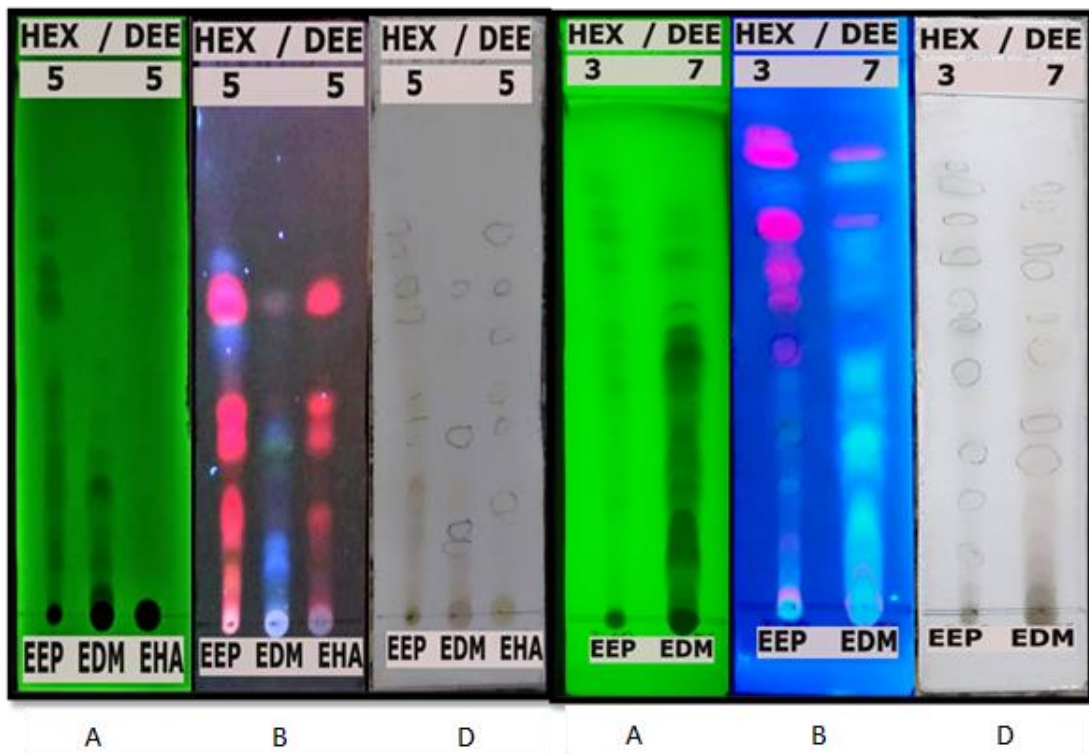


Figure.III. 4. Profils CCM des extraits EEP, EDM et EHA. Système d'éluion (hexane/ diéthyle éther : 5/5 et 3/7 ; v/v).

Pour l'extrait **EAE** (Extrait d'Acétate d'Éthyle), l'éluant optimal est un mélange de dichlorométhane (DCM) et d'acétate d'éthyle (AcOEt) dans un rapport de 7/3 (**Figure III.5**). Cette combinaison d'éluant a été déterminée comme la plus efficace pour obtenir une séparation adéquate des composés présents dans l'extrait EAE lors de la chromatographie.

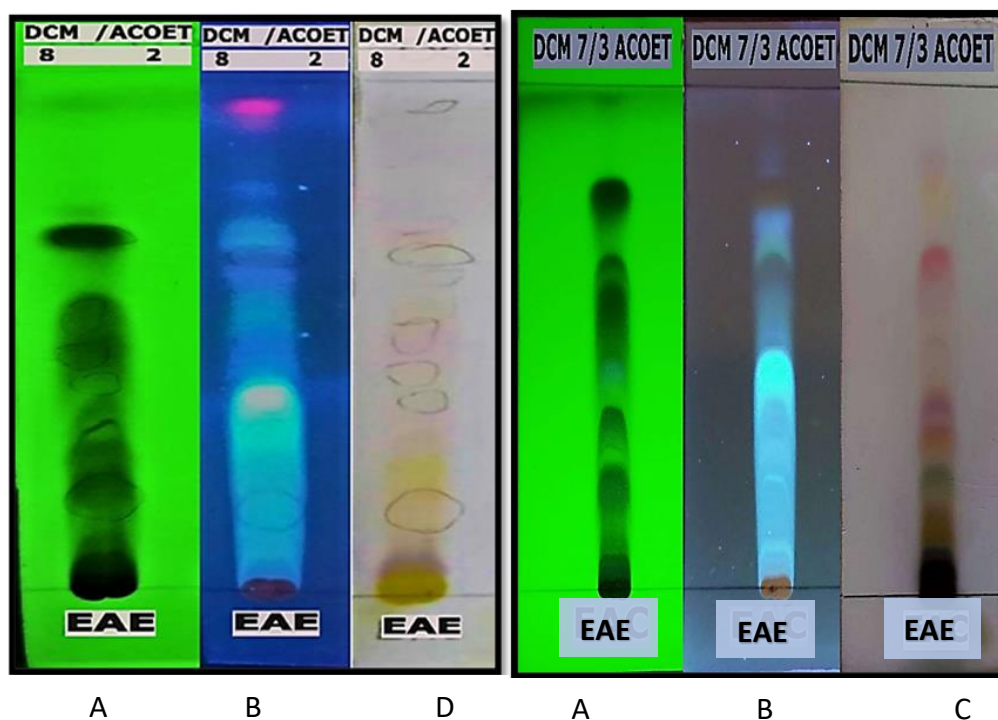


Figure.III. 5. Profils CCM de l'extrait EAE. Système d'éluant (DCM / AcOEt : 8/2 et 7/3 ; v/v).

Quant à l'extrait **EBT** (Extrait de n-Butanol), l'éluant optimal est un mélange de dichlorométhane (DCM), d'acétate d'éthyle (AcOEt) et d'acide formique dans un rapport de 3.5/4.5/1 (**Figure III.6**).

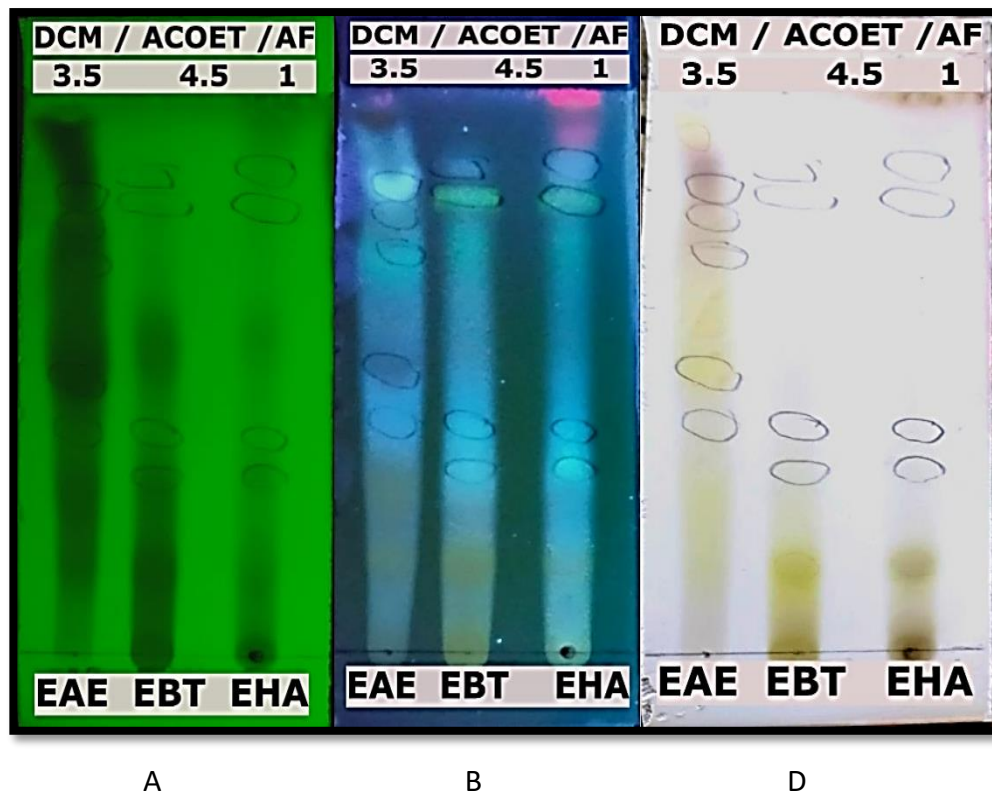


Figure.III. 6. Profils CCM des extraits EAE, EBT et EHA. Système d'éluion (dichlorométhane/ AcOEt /acide formique : 3.5/4.5/1 ; v/v/v).

A : CCM sous UV à 254 nm.

B : CCM sous UV à 365 nm.

C : CCM après révélation chimique à l'acide sulfurique.

D : CCM après révélation chimique à la vanilline sulfurique.

Ces résultats ont clairement révélé des profils métaboliques secondaires très riches. Ces résultats suggèrent fortement la présence des polyphénols, ainsi que des stérols et des terpénoïdes dans les extraits de la plante étudiée.

III.2.1.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse qualitative des composés phénoliques présents dans l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Cytisus villosus* a été réalisée par Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC) conformément aux méthodes décrites dans le **chapitre II**. Les chromatogrammes obtenus en utilisant un mode gradient d'éluion avec une gamme de longueurs d'ondes, notamment à 254 nm, ont été comparés à ceux des standards injectés dans les mêmes conditions chromatographiques en termes de temps de rétention. Cette comparaison des temps de rétention entre les composés présents dans l'extrait et les standards permet d'évaluer et d'identifier les composés phénoliques présents dans l'extrait acétate d'éthyle de *Cytisus villosus*.

Pour effectuer cette analyse, nous avons sélectionné 14 composés phénoliques comprenant des flavonoïdes et des acides phénoliques, en tant que standards. Leurs temps de rétention sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III. 2. Temps de rétention des composés phénoliques standards.

N ^o	Temps de rétention (min)	Standards
1	10,92	Chlorure de kuromaine
2	11,40	Catéchine
3	12,33	Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside
4	12,49	Rutine hydratée
5	12,60	Acide caféique
6	12,99	Hypéroside (Quercetin -3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside)
7	13,06	Myricitrine (myricetin -3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside)
8	13,20	Myricétine-3'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
9	13,91	Acide p-coumarique
10	14,41	Acide rosmarinique
11	14,81	Myricétine
12	17,51	kaempferol
13	17,81	Hespérétine (3',5,7-Trihydroxy-4-methoxyflavanone)
14	20,49	Chrysine

➤ **Chromatogrammes des étalons (Standards)**

Nous donnons ci-dessous les chromatogrammes des étalons utilisés (10 mg/ml), les analyses sont faites à une longueur d'onde 254 nm.

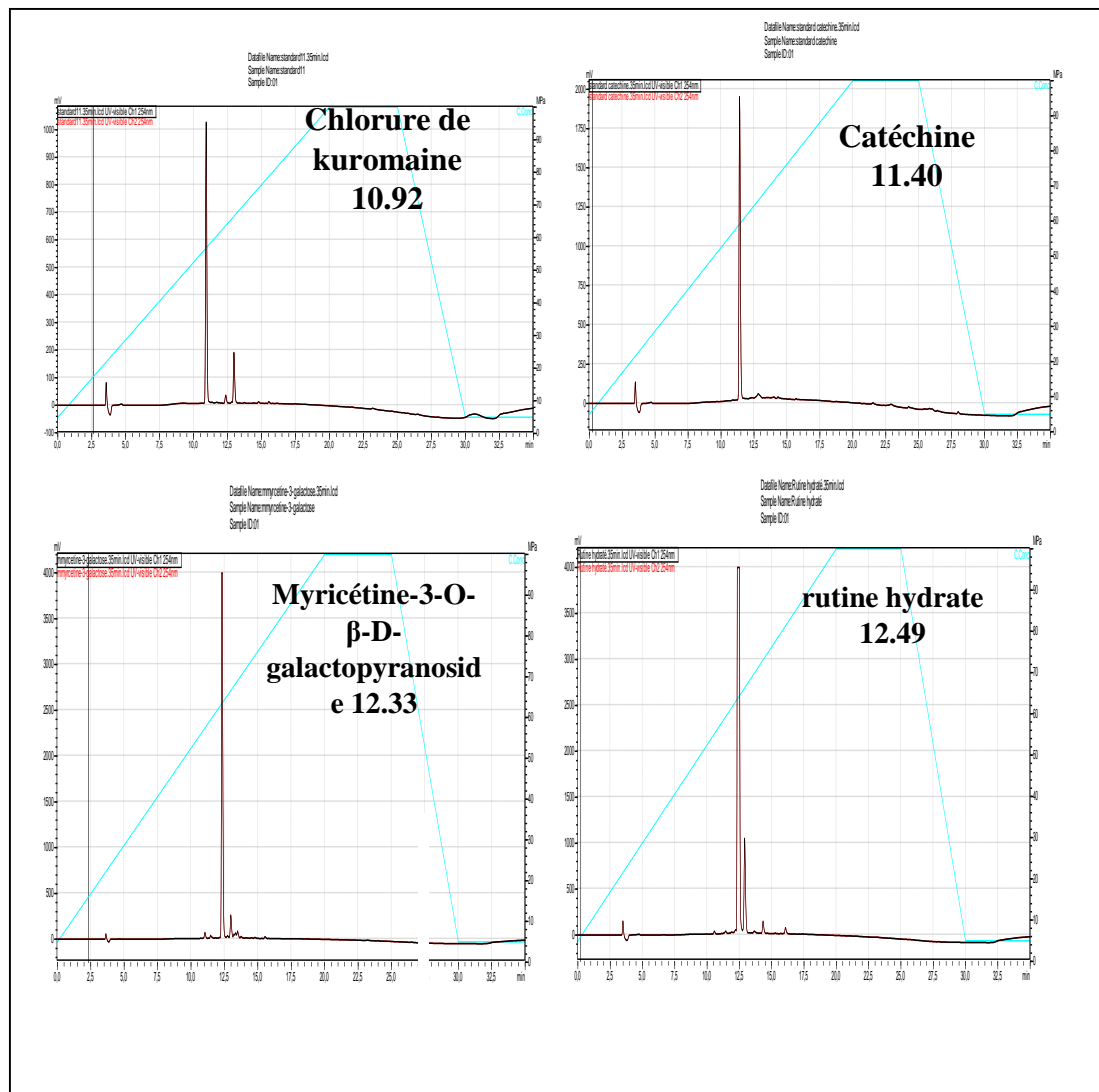


Figure.III. 7. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) des standards (Chlorure de kuromaine; Catéchine, Myricétine-3-O-β-D-galactopyranoside et rutine hydratée).

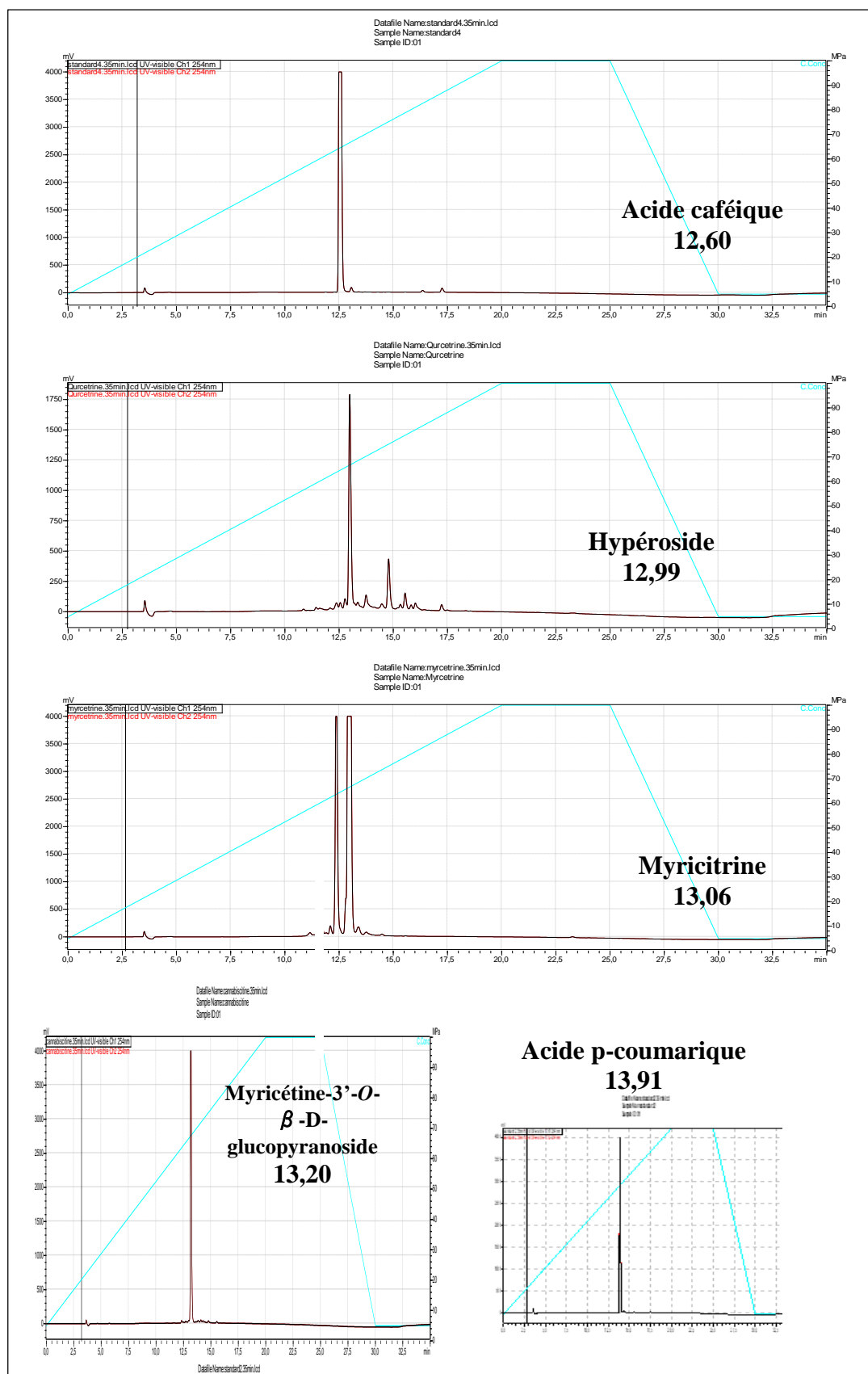


Figure.III. 8. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) des standards (Acide caféique ; Hypéroside (Quercetin -3-O- β -D-galactopyranoside) ; Myricitrine (myricetin -3-O- α -L-rhamnopyranoside); Myricétine-3'-O- β -D-glucopyranoside; Acide p-coumarique).

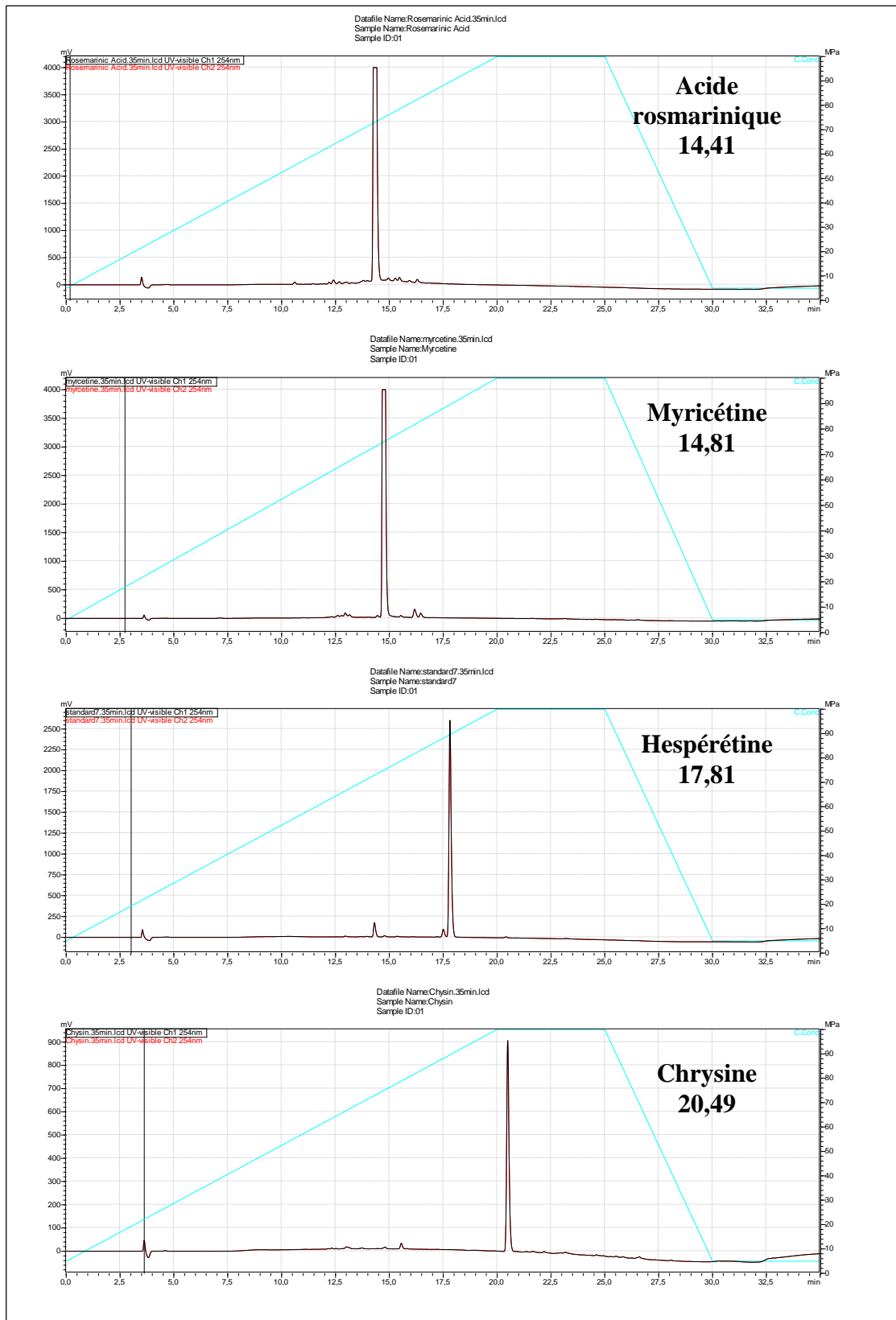


Figure.III. 9. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) de l'Acide rosmarinique ; Myricétine; Hespérétine et Chrysin.

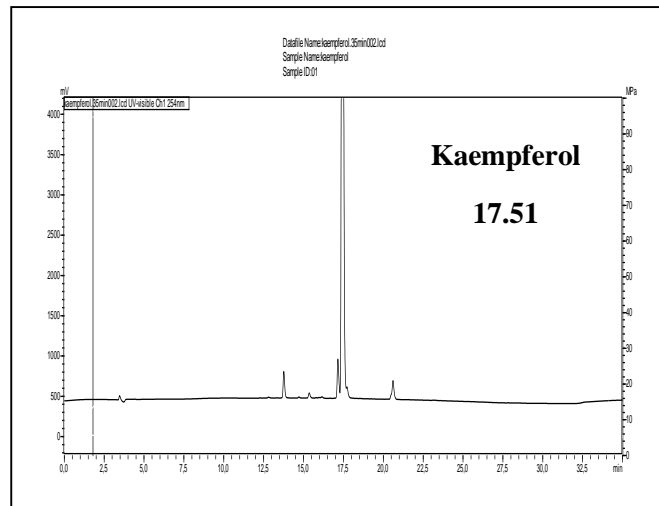


Figure III. 10. Profils HPLC ($\lambda=254$ nm) de kaempferol.

➤ Chromatogrammes de l'Extrait acétate d'éthyle

Le chromatogramme de l'HPLC d'extrait acétate d'éthyle est représenté ci-dessous.

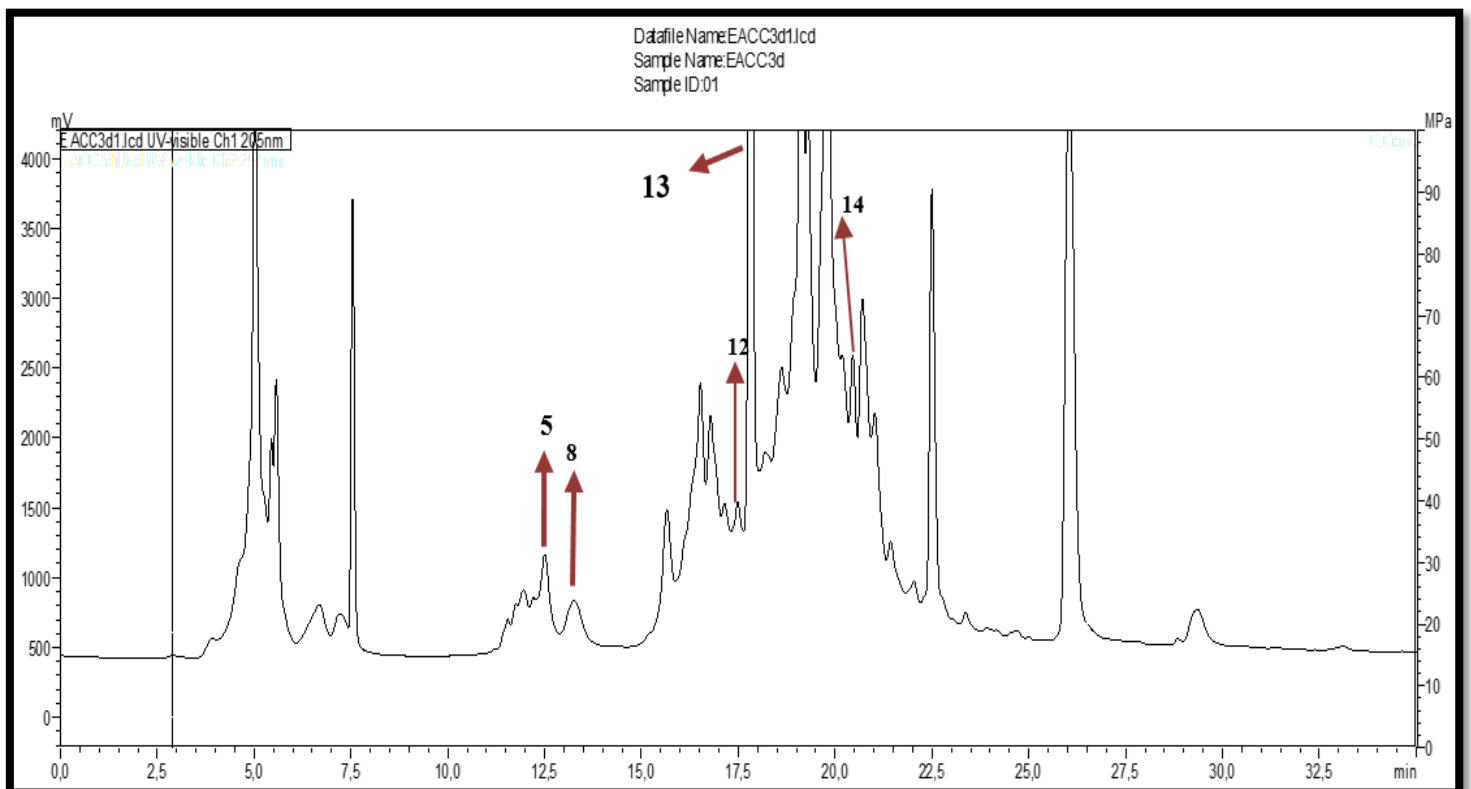


Figure.III. 11. Profil HPLC ($\lambda=254$ nm) de l'extrait Acétate d'éthyle.

➤ **Criblage phytochimique par HPLC des extraits**

Après avoir comparé les temps de rétention de notre extrait avec ceux des témoins, les résultats sont présentés dans le **Tableau III.3**.

Tableau III. 3. Les composés phénoliques identifiés dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

N ^o	Composés phénoliques	t _r (min)	EAE
1	Chlorure de kuromaine	10,92	-
2	Catechine	11,40	-
3	Myricétine-3-O-β-D-galactopyranoside	12,33	-
4	Rutine hydratée	12,49	-
5	Acide caféique	12,60	+(12,5)
6	Hypéroside	12,99	-
7	Myricitrine (myricetin -3-O-α-L-rhamnopyranoside)	13,06	-
8	Myricétine-3'-O-β-D-glucopyranoside	13,20	+(13.26)
9	Acide p-coumarique	13,91	-
10	Acide rosmarinique	14,41	-
11	Myricétine	14,81	-
12	kaempferol	17,51	+(17.48)
13	Hespérétine	17,81	+(17.87)
14	Chryisine	20,49	+(20.45)

III.2.1.3. Description des profils chromatographique de l'HPLC

L'observation du profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Cytisus villosus* (**Figure III. 11**) par HPLC met en évidence la richesse de cet extrait en métabolites secondaires, notamment les polyphénols qui présentent une forte absorption à 254 nm.

Après avoir comparé les temps de rétentions (tr) des composés phénoliques standards avec ceux de l'extrait acétate d'éthyle, nous pouvons affirmer que l'extrait d'acétate d'éthyle pourrait contenir les molécules suivantes :

- Un acide phénolique : l'acide caféique (**5**) (**Figure III.12**).
- Quatre flavonoïdes : la myricétine-3'-O-β-D-glucopyranoside, le kaempférol, l'hespérétine et la chryisine (**8, 12, 13, 14**) (**Figure III.12**).

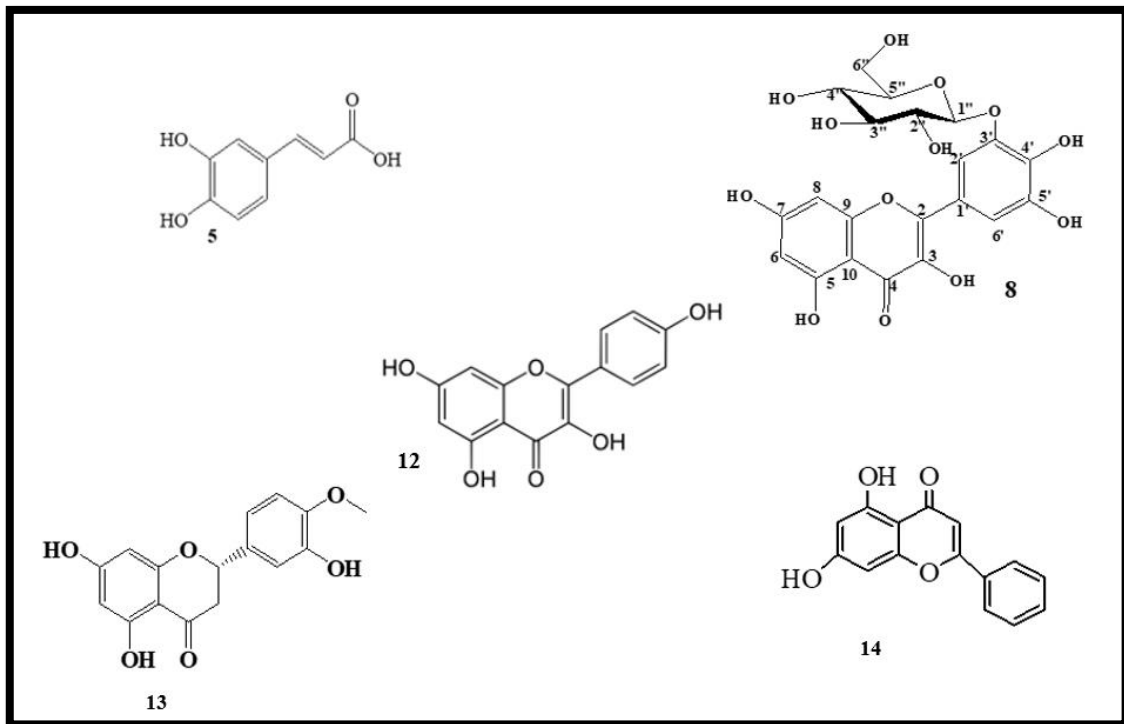


Figure.III. 12. Les structures des composés phénoliques (5-8-12-13-14) identifiés dans l'extrait Acétate d'éthyle de l'espèce *Cytisus villosus*.

III.3. Tests Biologiques

III.3.1. Activité antifongique

L'étude de l'activité antifongique de trois extraits, à savoir l'extrait hydroalcoolique, dichlorométhane et acétate d'éthyle, a été réalisée pour évaluer leur effet sur le champignon *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL).

L'activité antifongique est évaluée en observant la présence ou l'absence de croissance mycélienne de FOL sur un milieu PDA (Agar de pomme de terre) contenant trois concentrations différentes des trois extraits (**Tableau III.4**).

Tableau III. 4. Croissance mycélienne après trois jours (72h) en présence des extraits.

Extrait/témoin	Concentrations (mg/ml)	Code	Diamètres moyens des thalles (mm)
T ⁺	-	T +	10.3
T ⁻	-	T -	9.1
EHA	50	EHA50	12.1
EHA	100	EHA100	8.1
EHA	200	EHA200	14.5
EAE	50	EAE50	11.3
EAE	100	EAE100	10
EAE	200	EAE200	0
EDM	50	EDM50	12.8
EDM	100	EDM100	(Contaminé)
EDM	200	EDM200	0

III.3.1.1. Extrait hydroalcoolique

Pour l'extrait hydroalcoolique, aucun effet antifongique n'a été observé pour les concentrations faible et élevée (EHA50 et EHA200). Cependant, une activité antifongique modérée a été détectée pour la concentration moyenne (EHA100) (Figure.III.13 -III.14-III.15).

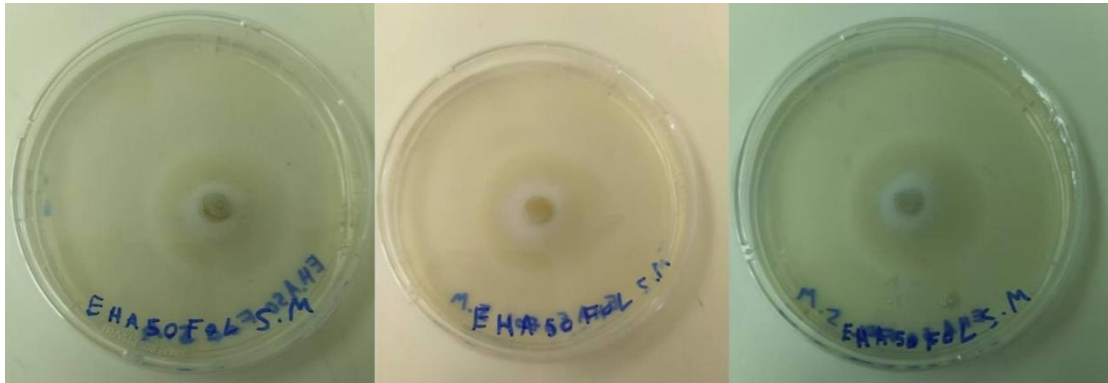


Figure.III. 13. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 50).



Figure.III. 14. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 100).



Figure III. 15. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait hydroalcoolique (EHA 200).

III.3.1.2. Extrait Dichlorométhane

Pour l'extrait de dichlorométhane, aucun effet antifongique n'a été observé pour la concentration faible (EDM50). En revanche, une forte activité antifongique a été constatée pour la concentration élevée (EDM200) (Figures III.16-III.17-III.18).

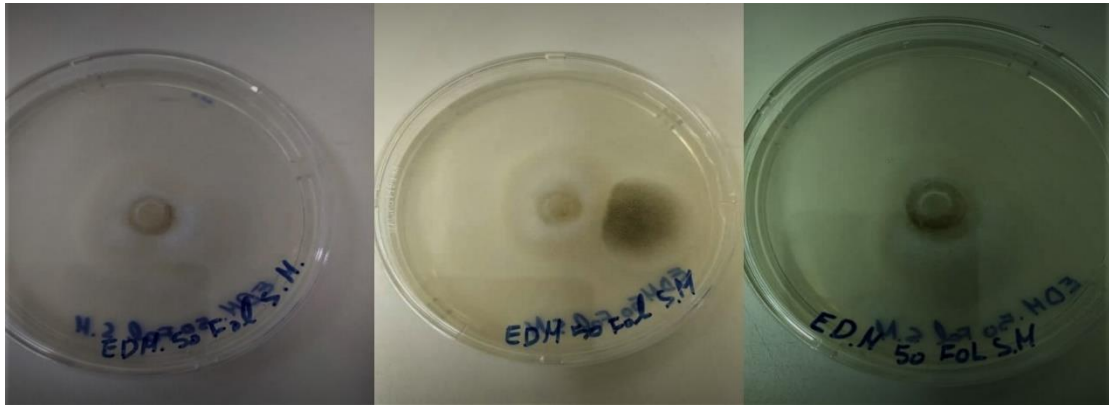


Figure III. 16. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 50).

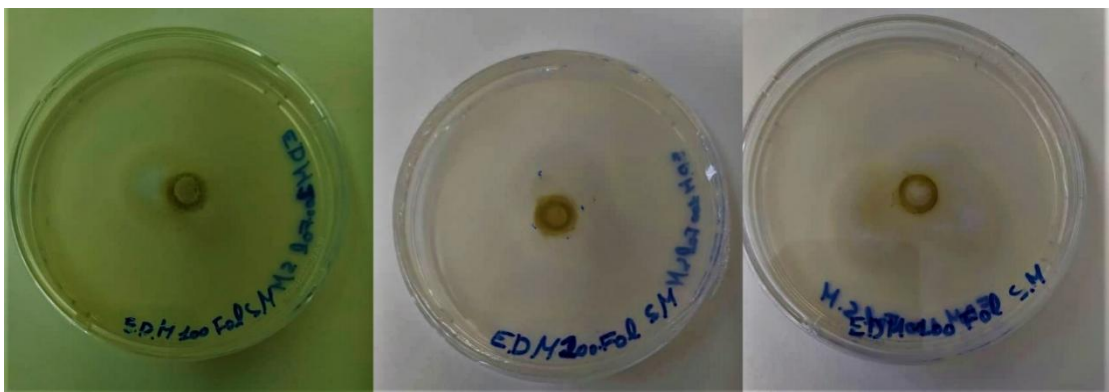


Figure.III. 17. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 100).



Figure.III. 18. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait dichlorométhane (EDM 200).

III.3.1.3. Extrait Acétate d'éthyle

Pour l'acétate d'éthyle, aucun effet antifongique n'a été observé pour la concentration faible (EAC50). Un effet antifongique très faible a été constaté pour la concentration moyenne (EAC100). En revanche, une forte activité antifongique a été observée pour la concentration élevée (EAC200) (Figures III.19 -III.20-III.21).

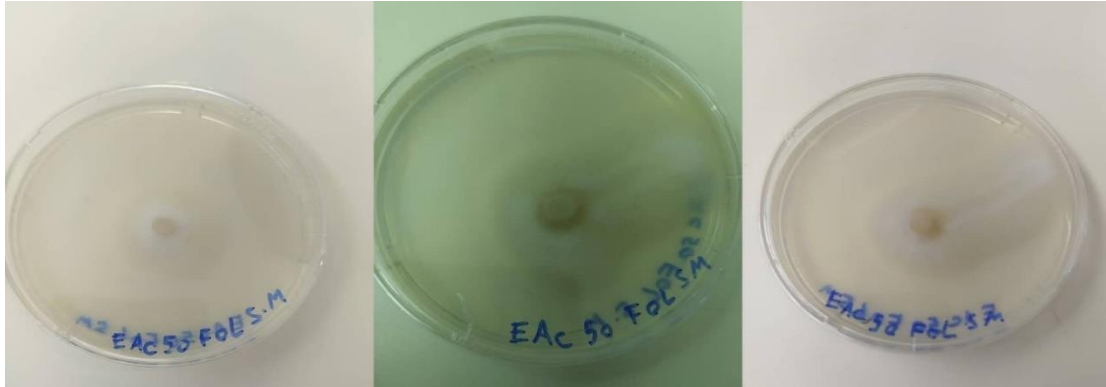


Figure.III. 19. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 50).

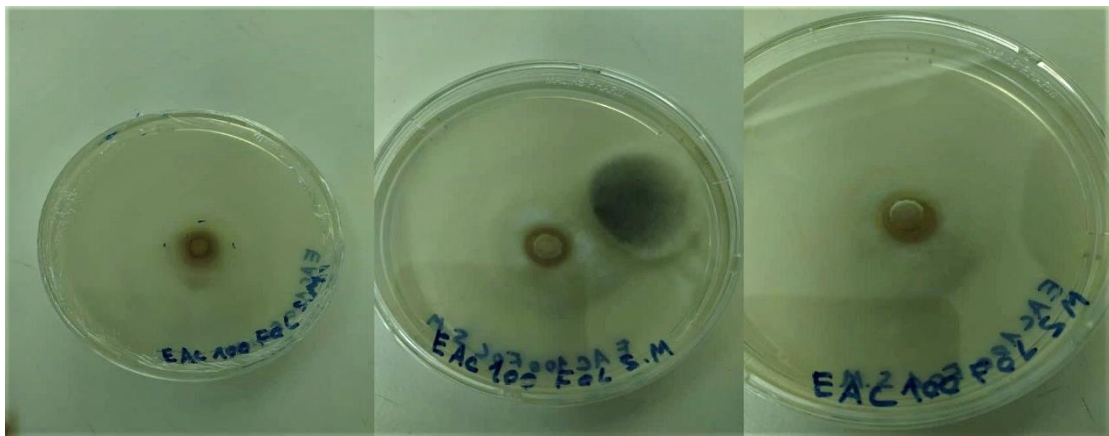


Figure.III. 20. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 100).

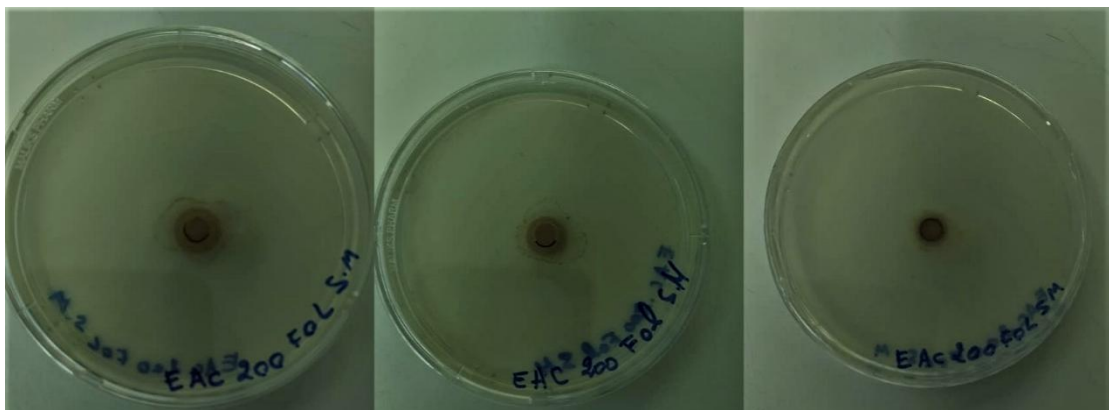


Figure.III. 21. Croissance des isolats de FOL en présence de l'extrait acétate d'éthyle (EAC 200).

Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage d'inhibition et sont illustrés dans le **Tableau III. 5** et **Figure III.22**.

Tableau III. 5. Les pourcentages d'inhibition de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* par les extraits.

Extrait	Concentration (mg/ml)	Taux d'inhibition %
EHA	50	0
EHA	100	21.35
EHA	200	0
EAC	50	0
EAC	100	2.91
EAC	200	100
EDM	50	0
EDM	100	(contaminé) 0
EDM	200	100

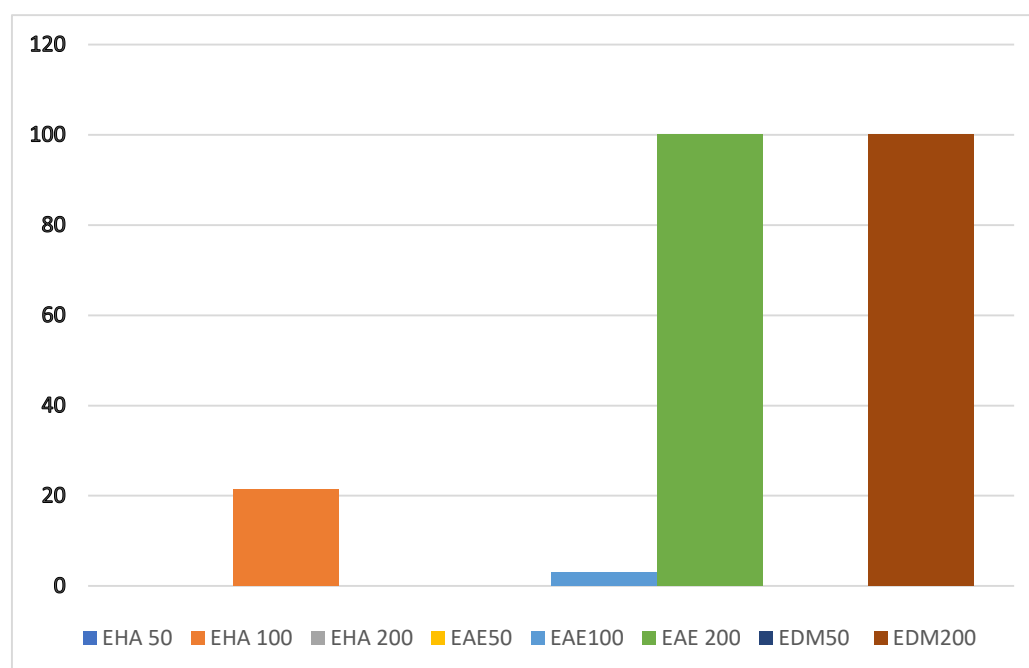


Figure.III. 22. Taux d'inhibition des extraits de *Cytisus villosus* sur le *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

III.3.2. Effet fongicide-fongistatique

L'effet fongicide fait référence à la capacité d'un agent (tel qu'un extrait de plante) à tuer ou détruire les champignons de manière directe. Cela se traduit par une inhibition totale de la croissance fongique et la mort des cellules fongiques.

D'autre part, l'effet fongistatique se réfère à la capacité d'un agent à inhiber la croissance des champignons, sans les tuer complètement. Cela signifie que les champignons peuvent rester en vie, mais leur croissance est ralentie ou arrêtée.

Dans notre expérience, afin de déterminer si l'extrait EDM à une concentration de 200 mg/ml a un effet fongicide ou fongistatique, nous avons déplacé le champignon loin du milieu dans les boîtes contenant l'EDM200. Les boîtes ont été laissées à incuber pendant une période déterminée (24 h) (**Figure III. 23**).

Après observation, il a été constaté que les champignons ont continué à pousser dans les boîtes contenant l'extrait EDM 200. Ce résultat suggère un effet fongistatique, où l'extrait inhibe la croissance des champignons sans les tuer complètement.

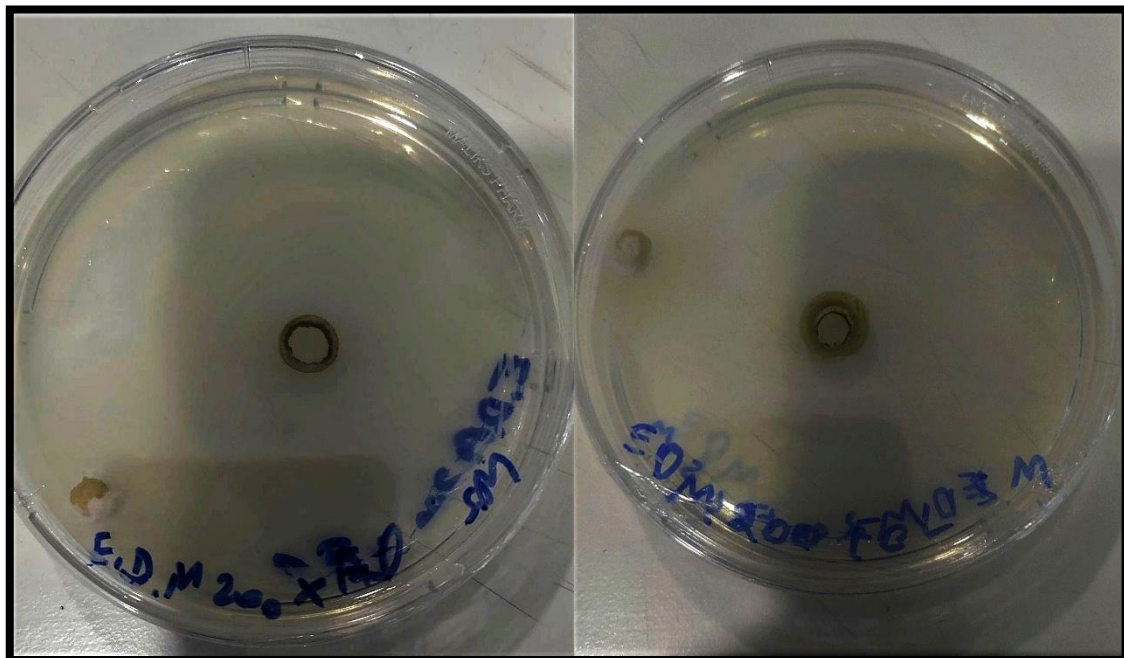


Figure III. 23. Effet du transfert des isolats de FOL inhibés par l'extrait dichlorométhane (200 mg/ml).

En résumé, cette étude met en évidence l'activité antifongique des extraits testés sur *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. L'extrait de dichlorométhane a démontré un effet antifongique fort à une concentration élevée. L'extrait hydroalcoolique brut et l'acétate d'éthyle ont présenté des effets antifongiques variables en fonction de la concentration. L'effet de l'extrait de dichlorométhane à une concentration de 200 mg/ml a été déterminé comme étant fongistatique, c'est-à-dire qu'il inhibe la croissance du champignon sans le tuer complètement.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'extrait acétate d'éthyle (EAE) de la plante étudiée a permis d'identifier 4 flavonoïdes (myricétine-3'-O- β -D-glucopyranoside, kaempférol, hespérétine et chrysin) et un acide phénolique, l'acide caféique.

Ces résultats sont en corrélation avec les activités antifongiques observées pour l'extrait testé. En effet, plusieurs études ont démontré les effets antifongiques potentiels de certains polyphénols, tels que l'hespérétine et la chrysin, contre différentes espèces fongiques (**Al Aboody et Mickymaray 2020**).

Des résultats récents montrent l'activité antifongique des extraits de plantes, riches en phénols et polyphénols, contre les agents pathogènes fongiques humains (**Simonetti, Brasili et al. 2020**). Les flavonoïdes et les polyphénols associés sont également connus pour inhiber la germination des spores des agents phytopathogènes fongiques (**Stevenson et Haware 1999, Rosas Jauregui, Hernández Castillo et al. 2021**).

La présence de ces polyphénols dans l'extrait acétate d'éthyle pourrait donc expliquer son activité antifongique.

Conclusion Générale

Conclusion

L'extraction des parties aériennes de la plante *Cytisus villosus* Pourr. a été réalisée en utilisant quatre solvants à savoir l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Ces solvants ont des polarités différentes, ce qui permet une séparation des composés en fonction de leur solubilité. Les rendements calculés pour chaque extrait ont été enregistrés. Par la suite, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée pour caractériser partiellement les différents extraits. Les CCM observées sous une lampe UV à 365 nm ont révélé des taches de différentes couleurs, indiquant la présence de diverses classes de métabolites secondaires.

Les résultats ont révélé que les extraits sont riches en métabolites secondaires. Les analyses ont fortement suggéré la présence des polyphénols tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques, ainsi que des stérols et des terpénoïdes dans ces extraits. Ces composés sont réputés pour leurs propriétés bénéfiques, notamment leur activité antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne. Ces résultats indiquent que les extraits de *Cytisus villosus* peuvent présenter un potentiel intéressant en tant que sources de composés bioactifs.

L'extrait acétate d'éthyle de la plante étudiée a été analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les structures des composés phénoliques ont été déterminées par comparaison des temps de rétention (*t_r*) des phénoliques standards avec ceux obtenus des chromatogrammes de l'extrait injecté dans les mêmes conditions chromatographiques. L'analyse qualitative par HPLC a permis d'identifier :

- 4 flavonoïdes : **la myricétine-3'-O-β-D-glucopyranoside, le kaempférol, l'hespérétine et la chrysine.**
- Un acide phénolique : **l'acide caféique.**

La partie évaluation biologique avait pour objectif d'évaluer l'activité antifongique de différents extraits hydroalcoolique (EHA), dichlorométhane (EDM) et acétate d'éthyle (EAE) sur l'espèce *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Les extraits ont été soumis à des tests à différentes concentrations afin de déterminer leur effet sur la croissance du champignon.

Une activité antifongique modérée a été observée à une concentration moyenne pour l'extrait brut hydroalcoolique de *Cytisus villosus* Pourr. En revanche, l'extrait dichlorométhane a montré un effet antifongique très fort à forte concentration, mais aucun effet à faible concentration. L'extrait acétate d'éthyle a montré un effet très fort à forte concentration.

De plus, pour déterminer l'effet de l'extrait EDM (concentration de 200 mg/ml) sur la croissance fongique, le champignon a été déplacé loin du milieu contenant l'extrait. Après incubation, il a été observé que le champignon a continué à pousser, suggérant un effet fongistatique (inhibition de la croissance fongique) plutôt qu'un effet fongicide (destruction complète du champignon).

Les résultats mettent en évidence la richesse de l'extrait d'acétate d'éthyle en polyphénols, notamment les flavonoïdes et l'acide phénolique identifiés, qui pourraient être responsables de son activité antifongique. Cette étude contribue ainsi à l'évaluation du potentiel de *Cytisus villosus* comme source d'agents antifongiques naturels.

Perspectives

Les résultats obtenus de ce travail ont permis de tirer les perspectives suivantes :

- Des travaux d'analyse, de séparation et de purification chromatographiques (utilisant des techniques telles que la colonne Sephadex, la colonne SPE, la CCM, la HPLC préparative) seront nécessaires pour isoler et identifier les métabolites secondaires responsables de l'activité antifongique, en particulier dans les deux extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle.
- Des tests sur l'activité antioxydante, antivirale, l'activité antimicrobienne, l'activité anti-inflammatoire et l'inhibition d'enzymes devront également être réalisés sur les extraits, en mettant l'accent sur les deux extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Al Aboody, M. S. and S. Mickymaray (2020). "Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids." Antibiotics **9**(2): 45.

Andriamparany, J. N., K. Brinkmann, V. Jeannoda and A. Buerkert (2014). "Effects of socio-economic household characteristics on traditional knowledge and usage of wild yams and medicinal plants in the Mahafaly region of south-western Madagascar." Journal of ethnobiology and ethnomedicine **10**(1): 1.

Barros, L., M. Dueñas, A. M. Carvalho, I. C. Ferreira and C. Santos-Buelga (2012). "Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal." Food and Chemical Toxicology **50**(5): 1576-1582.

Bennett, B. (2010). "Twenty-Five Economically Important Plant Families." Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO.

BRUM, B. M. and R. Paris (1974). "Flavonoids of common broom (*Sarothamnus scoparius*)."

BRUM, B. M., F. Tillequin and R. Paris (1977). "FROM THE TWIGS OF SAROTHAMNUS SCOPARIUS KOCH HAS BEEN ISOLATED A NEW C-GLYCOSYL FLAVONES: THE 6."

Dale, H. and P. Laidlaw (1912). "LABURNUM." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **3**: 205.

Di Giorgio, C., F. Delmas, M. Tueni, E. Cheble, T. Khalil and G. Balansard (2008). "Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species." The Journal of Alternative and Complementary Medicine **14**(2): 157-162.

Freer, A., D. Robins and G. Sheldrake (1987). "Structures of (-)-cytisine and (-)-N-methylcytisine: tricyclic quinolizidine alkaloids." Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications **43**(6): 1119-1122.

García Ciudad, A., B. F. Santos, B. V. de Aldana, I. Zabalgozcoa, M. Gutierrez and B. G. Criado (2004). "Use of near infrared reflectance spectroscopy to assess forage quality of a Mediterranean shrub." Communications in soil science and plant analysis **35**(5-6): 665-678.

Gião, M. S., M. L. González-Sanjosé, M. D. Rivero-Pérez, C. I. Pereira, M. E. Pintado and F. X. Malcata (2007). "Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final

antioxidant capacity and phenol content on extraction features." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**(14): 2638-2647.

González, N., D. Ribeiro, E. Fernandes, D. R. Nogueira, E. Conde, A. Moure, M. P. Vinardell, M. Mitjans and H. Domínguez (2013). "Potential use of *Cytisus scoparius* extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **125**: 83-89.

Gresser, G., L. Witte, V. P. Dedkov and F.-C. Czygan (1996). "A survey of quinolizidine alkaloids and phenylethylamine tyramine in *Cytisus scoparius* (Leguminosae) from different origins." Zeitschrift für Naturforschung C **51**(11-12): 791-801.

Hanganu, D., L. Vlase and O. Neli (2010). "Phytochemical analysis of isoflavons from some Fabaceae species extracts." Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **38**(1): 57-60.

Heywood, V. H. (1993). Flowering plants of the world, BT Batsford Ltd.

Index, M. (1989). "Merck & Co." Rahway, NJ, USA: 1427.

Jalili, J., U. Askeroglu, B. Alleyne and B. Guyuron (2013). "Herbal products that may contribute to hypertension." Plastic and reconstructive surgery **131**(1): 168-173.

Kar, A. (2003). Pharmacognosy and pharmacobiotechnology, New Age International.

Kurihara, T. and M. Kikuchi (1980). "Studies on the constituents of flowers. XIII. The flower components of *Cytisus scoparius*." Yakugaku Zasshi **100**(10): 1054-1057.

Larit, F. (2017). Phytochemical and biological studies of two Algerian medicinal plants. Doctorate University of Constantine 1.

Larit, F., F. León, S. Benyahia and S. J. Cutler (2019). "Total Phenolic and Flavonoid Content and Biological Activities of Extracts and Isolated Compounds of *Cytisus villosus* Pourr." Biomolecules **9**(11): 732.

Larit, F., K. M. Elokely, N. D. Chaurasiya, S. Benyahia, M. A. Nael, F. León, M. S. Abu-Darwish, T. Efferth, Y.-H. Wang and D. Belouahem-Abed (2018). "Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants." Phytomedicine **40**: 27-36.

Larit, F., M. A. Nael, S. Benyahia, M. M. Radwan, F. León, I. Jasicka-Misiak, A. Poliwooda, D. Wiczorek, F. Benayache and S. Benayache (2018). "Secondary metabolites from the aerial parts of *Cytisus villosus* Pourr." Phytochemistry letters **24**: 1-5.

Lores, M., M. Pájaro, M. Álvarez-Casas, J. Domínguez and C. García-Jares (2015). "Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of

pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems." *Talanta* **140**: 134-142.

Luis, A., F. Domingues, C. Gil and A. P. Duarte (2009). "Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp." *Journal of Medicinal Plants Research* **3**(11): 886-893.

Mineur, Y. S., O. Somenzi and M. R. Picciotto (2007). "Cytisine, a partial agonist of high-affinity nicotinic acetylcholine receptors, has antidepressant-like properties in male C57BL/6J mice." *Neuropharmacology* **52**(5): 1256-1262.

Nihei, K.-i., K. Shibata and I. Kubo (2002). "(+)-2, 3-Dehydro-10-oxo- α -isosparteine in *Uresiphita reversalis* larvae fed on *Cytisus monspessulanus* leaves." *Phytochemistry* **61**(8): 987-990.

Nirmal, J., C. S. Babu, T. Harisudhan and M. Ramanathan (2008). "Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress." *BMC Complementary and Alternative Medicine* **8**: 1-8.

Osório e Castro, V. R. (1998). "Chromium in a series of Portuguese plants used in the herbal treatment of diabetes." *Biological trace element research* **62**: 101-106.

Osório e Castro, V. (2001). "Chromium and zinc in a series of plants used in Portugal in the herbal treatment of non-insulinized diabetes." *Acta alimentaria* **30**(4): 333-342.

Papke, R. L., N. A. Horenstein and C. Stokes (2015). "Nicotinic activity of arecoline, the psychoactive element of "Betel Nuts", suggests a basis for habitual use and anti-inflammatory activity." *PLoS One* **10**(10): e0140907.

Pereira, O. R., M. J. Perez, R. I. Macias, M. R. Domingues, A. Silva, J. J. Marín and S. M. Cardoso (2012). "*Cytisus multiflorus*: source of antioxidant polyphenols." *11º Encontro Químico dos Alimentos*.

Pereira, O. R., R. I. Macias, M. J. Perez, J. J. Marin and S. M. Cardoso (2013). "Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells." *Journal of Functional Foods* **5**(3): 1170-1179.

Pinela, J., L. Barros, A. M. Carvalho and I. C. Ferreira (2011). "Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae)." *Food and Chemical Toxicology* **49**(11): 2983-2989.

Prochaska, J. J., S. Das and N. L. Benowitz (2013). Cytisine, the world's oldest smoking cessation aid, British Medical Journal Publishing Group. **347**.

- Quezel, P. and N. F. d. L. Santa S (1962).** "Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Éd." CNRS, Paris.
- Quézel, P. and N. F. d. A. Santa S (1963).** "des régions désertiques méridionales." Tome I 2.
- Rodríguez-Riaño, T., A. Ortega-Olivencia and J. A. Devesa (1999).** "Reproductive phenology in three Genisteae (Fabaceae) shrub species of the W Mediterranean Region." Nordic Journal of Botany 19(3): 345-354.
- Rodríguez-Riaño, T., A. Ortega-Olivencia and J. A. Devesa (2004).** Reproductive biology in Cytisus multiflorus (Fabaceae). Annales Botanici Fennici, JSTOR.
- Rodríguez-Riaño, T., F. J. VALTUEÑA and A. Ortega-Olivencia (2006).** "Megaspороgenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae)." Annals of botany 98(4): 777-791.
- Rosas Jauregui, I. A., F. D. Hernández Castillo, L. Palomo Ligas, S. R. Martínez Alemán, J. A. Ascacio Valdés and R. Rodríguez Herrera (2021).** "Polyphenols from different plant sources and their in vitro effect against chickpea pathogens." Revista mexicana de ciencias agrícolas 12(8): 1415-1427.
- Siegel, R. K. (1976).** "Herbal intoxication: Psychoactive effects from herbal cigarettes, tea, and capsules." Jama 236(5): 473-476.
- Simonetti, G., E. Brasili and G. Pasqua (2020).** "Antifungal activity of phenolic and polyphenolic compounds from different matrices of *Vitis vinifera* L. against human pathogens." Molecules 25(16): 3748.
- Spichiger, R.-E., M. Figeat-Hug and D. Jeanmonod (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, PPUR presses polytechniques.
- Stevenson, P. C. and M. P. Haware (1999).** "Maackiain in *Cicer bijugum* Rech. f. associated with resistance to *Botrytis* grey mould." Biochemical Systematics and Ecology 27(8): 761-767.
- Sundararajan, R., N. A. Haja, K. Venkatesan, K. Mukherjee, B. P. Saha, A. Bandyopadhyay and P. K. Mukherjee (2006).** "Cytisus scoparius link-A natural antioxidant." BMC Complementary and Alternative Medicine 6: 1-7.
- Sundararajan, R. and R. Koduru (2014).** "Cytisus scoparius: A review of ethnomedical, phytochemical and pharmacological information." Indo Am J Pharm Res 4: 2151-2169.
- Viscardi, P., J. Reynaud and J. Raynaud (1984).** "A new isoflavone from the flowers of *Cytisus scoparius* Link.(Leguminosae)." Pharmazie 39(11).

White, E. (1964). "879. Alkaloids of the leguminosae. Part XXVII. The structure of monspessulanine." Journal of the Chemical Society (Resumed): 4613-4614.

Wink, M. (1984). "N-Methylation of quinolizidine alkaloids: an S-adenosyl-L-methionine: cytosine N-methyltransferase from Laburnum anagyroides plants and cell cultures of L. alpinum and Cytisus canariensis." Planta **161**(4): 339-344.

Wojciechowski, M. F., M. Lavin and M. J. Sanderson (2004). "A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family." American journal of botany **91**(11): 1846-1862.

Цыпышева, И. П., Е. Г. Галкин, А. В. Ковальская, П. Р. Петрова, И. П. Байкова, Ф. З. Галин and Н. И. Федоров (2015). "Состав и сезонная динамика содержания алкалоидов в надземной части растений Chamaecytisus ruthenicus в горно-лесной зоне Южного Урала." Химия растительного сырья(3): 65-69.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Cytisus villosus* Pourr. (Fabaceae). Les parties aériennes de la plante ont été récoltées lors de la période de floraison. Elles ont ensuite été séchées puis broyées. Les extraits ont été obtenus par macération dans une solution hydro-éthanolique (80/20 : v/v), suivie d'extractions liquide-liquide en utilisant quatre solvants différents (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

L'analyse qualitative par HPLC de l'extrait acétate d'éthyle a révélé une concentration élevée de composés polyphénoliques. Quatre flavonoïdes, à savoir la myricétine-3'-*O*- β -D-glucopyranoside, le kaempférol, l'hespérétine et la chrysin, ainsi qu'un acide phénolique, l'acide caféique, ont été identifiés dans cet extrait.

Les extraits hydroalcooliques, dichlorométhane et acétate d'éthyle de la plante ont été testés contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. À une concentration élevée (200 mg/ml), les extraits de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle ont montré une activité antifongique puissante avec un pourcentage d'inhibition de 100%. L'extrait de dichlorométhane (EDM200) a particulièrement manifesté un effet fongistatique remarquable contre le *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Mots clés : Fabaceae, *Cytisus villosus*, extraction, HPLC, temps de rétention, polyphénols, flavonoïdes, activité antifongique, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Abstract

This study focuses on the phytochemical investigation and evaluation of the antimicrobial activity of *Cytisus villosus* Pourr. (Fabaceae). The aerial parts of the plant were collected at the flowering stage. The dried parts were then ground. The extracts were obtained by maceration in a hydro-ethanolic solution (80/20: v/v), followed by liquid-liquid extractions using four different solvents (petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol).

The qualitative analysis by HPLC of the ethyl acetate extract (EAE) revealed a high concentration of polyphenolic compounds. Four flavonoids, namely myricetin-3'-*O*- β -D-glucopyranoside, kaempferol, hesperetin, and chrysin, as well as one phenolic acid, caffeic acid, were identified in this extract.

The hydroalcoholic extract (EHA), dichloromethane extract (EDM), and ethyl acetate extract (EAE) of the plant were evaluated for their activity against the phytopathogenic strain *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. At a high concentration (200 mg/ml), both the dichloromethane and ethyl acetate extracts displayed potent antifungal activity, resulting in a percentage of inhibition of 100%. Particularly, the dichloromethane extract (EDM200) exhibited a remarkable fungistatic effect against the *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* strain.

Keywords: Fabaceae, *Cytisus villosus*, extraction, HPLC, retention time, polyphenols, flavonoids, antifungal activity, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

ملخص

تركز هذه الدراسة على الاستكشاف الفيتوكيميائي وتقييم النشاط المضاد للميكروبات لنبات *Cytisus villosus* (Fabaceae). تم جمع الأجزاء الهوائية للنبات في مرحلة الإزهار وتجفيفها. تم الحصول على المستخلصات عن طريق النقع في محلول هيدرو-إيثانولي (80/20: v/v)، تليها عملية استخلاص سوائل-سوائل باستخدام أربعة مذيبات مختلفة (الإيثر البترولي، ثنائي كلورو ميثان، أسيتات الإيثيل و ن-بيوتانول). أظهر التحليل الكيميائي النوعي بواسطة HPLC لمستخلص الأسيتات الإيثيلي تركيزًا عاليًا من المركبات البوليفينولية. تم تحديد أربعة فلافونويدات (myricetin-3'-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol, hesperetin and chrysin) وحمض فينولي واحد (caffeic acid) في هذا المستخلص.

تم اختبار المستخلصات المائية-الكحولية والديكلوروميثان وأسيتات الإيثيل للنبات ضد الفطر الممرض للنبات *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

بتركيز عالٍ، أظهرت مستخلصات الدايلكلوروميثان وأسيتات الإيثيل نشاطًا قويًا مضادًا للفطريات بنسبة تثبيط قدرها 100%. بصفة ملحوظة، أظهر مستخلص الدايلكلوروميثان تأثيرًا فطريًا ممتازًا ضد سلالة *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

الكلمات المفتاحية: *Cytisus villosus*، Fabaceae، استخلاص، HPLC، البوليفينولات، الفلافونويدات، النشاط المضاد للفطريات، *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.