

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليدجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DE SCIENCE
قسم علوم المادة
DEPARTEMENT SCIENSE DE LA MATIERE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie Organique Applique

THEME

***Etude Phytochimique et Evaluation de L'activité Antioxydante des
Extraits Ethanolique et Aqueux de Cytisus triflorus***

Présenté Par : Larabi Messaouda

Nadji Hanane

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Mr. KORIBA Bakhti (M.A.A)

Président

Mme. NOUR ELDINE Asmaa (M.C.B)

Examinatrice

Mme. BOUZIANE Amel (M.A.A)

Promotrice

2019/2020

Remerciements

En premier lieu, on remercie Le Bon Dieu de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire pédagogique des sciences de la matière à l'université Amar Thelidji Laghouat.

on 'adresse nos sincères remerciements à Mme.BOUZIANE Amel ; On lui remercie pour avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseils.

On remercié aussi les membres de jury qui nos ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examiné ce mémoire.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire pédagogique des sciences de la matière qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréables.

Un grand merci aussi pour mes enseignements, pendant les années du cursus universitaire.

Finalement, je tiens à remercier mes très chers parents, mes frères et mes sœurs pour leur soutien morale et physique, ainsi qu'à tous mes proches amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles et à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à La réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

*Pour être pas de mots qui sont morts de leur droit.
Pour les numéros ne peuvent pas être compté les vertus.
Pour mes parents ma mère, que je ne cesse de remercier pour
tout ce qu'elle m'a donné. Que Dieu la récompense pour
tous ces bienfaits.*

*Et mon papa, qui a toujours cru en moi et a mis à ma
disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse
dans mes études*

*A mes frères Madani, Fatima, Hiba, Yakout et Bouchra
À toutes ma famille, grande et petite*

A mon binôme hanane et toute sa famille!

*A mes amies et mes camarades, pour les moments
passés ensemble*

*Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs
encouragements.*

*Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, du
moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur*

Je vous aime tous et j'espère que la vie vous préservera

Plein de bonheur,

De réussite, de prospérité et une très bonne santé.

Messaouda

Dédicace

*Au Nom d'ALLAH le tout puissant, qui nous a éclairé
les chemins du savoir et de la sagesse, je dédie ce
modeste travail en signe de dévouement:*

*A mon père et ma mère, qui n'ont cessé d'être pour moi
des exemples de persévérance, de courage et de générosité
!*

A mes frères et mes chères sœurs

A tous les membres de la famille Nadji !

A mon binôme Messaouda et toute sa famille!

A mon encadreur Bouziane Amal

A tous mes amies!

A tous mes enseignants !

Hanane

Liste des abréviations

ABTS: 2,2-azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6-sulfonique acide)

C°: Degré Celsius

D : Densité

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP: Pouvoir antioxydant par réduction ferrique

h : Heure

I : Inhibition

I% : pourcentage d'inhibition

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

g : Gramme

g /mol : Gramme par mol

M : Molaire

mg : Milligramme

mg /g: Milligramme / Gramme

mg /ml : Milligramme /Millilitre

min: Minute

ml : Millilitre

mm : Millimolaire

mmol /L : Milli mol par Litre

nm : Nanomètre

S : Seconde

Liste des figures

Schéma 1 : Organigramme expliquant les différentes étapes expérimentales	04
Figure 1: feuilles sèches.....	05
Figure 2: feuilles broyées	05
Schéma 2 : Protocole expérimentale d'extraction des composées phénoliques.....	06
Figure 3: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH.....	10
Figure 4: Les rendements d'extraction.....	13
Figure 5: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux. ..	24
Figure 6: Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	24
Figure 7: Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonols totaux.....	25
Figure 8: Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical DPPH.....	25
Figure 9 : Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical ABTS	26
Figure 10 : Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical FRAP.....	26

Liste des tableaux

Tableau 01: Caractérisation de la plante étudiée	02
Tableau 02: Résultats des tests phytochimiques.....	13
Tableau 03: les teneurs en composés phénoliques des extraits étudiés.....	13
Tableau 04: Activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH.....	16
Tableau 05: Résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test ABTS.....	17
Tableau 06: Test FRAP pour les extraits analysés.....	18

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....	01
I. Matériel et méthodes.....	02
I.1. Matière végétal.....	02
I.2. Méthodes.....	04
I.2.1.Etude phytochimique de cytissus triflorus.....	05
I.2.1.1.Séchage et Broyage.....	05
I.2.1.2.Extraction des composés phénoliques.....	06
I.3.Analyse qualitatif	07
I.3.1.Tests phytochimiques.....	07
I.4.Analyse quantitatif	08
I.4.1.Dosage des polyphénols totaux.....	08
I.4.2.Dosage des flavonoïdes totaux.....	09
I.4.3.Dosage des flavonols.....	09
I.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	10
I.5.1.Test de piégeage du radical DPPH.....	10
I.5.2. Réduction du radical-cation ABTS ^{•+} ...	11
I.5.3.Test de réduction du fer FRAP	12
I.5.4. Analyse statistique.....	13
II. Résultats et discussions.....	13
II.1.Rendement d'extraction.....	13

II.2.Tests phytochimiques.....	13
II.3.Quantification des composés phénoliques	14
II.4.Estimation de l'activité antioxydant	15
II.4.1.Test de DPPH	15
II.4.2.Test d'ABTS	16
II.4.3.Test de FRAP.....	17
Conclusion générale.....	19
Références Bibliographiques	20
Annex	
Résumé	

Introduction générale

Depuis longtemps, L'homme et les plantes vivent côte à côte. Il est habitué à consommer différentes espèces de plantes, qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicales que nutritives. A cet effet un grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui répandue dans divers domaines en médecine, en pharmacie, en cosmétologie et en agriculture. ^[1]

De nombreuses recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation des substances naturelles douées d'activités biologiques afin d'établir des règles scientifiques pour leur usage.

L'Algérie a un riche patrimoine végétal, elle recèle plusieurs sortes de végétaux connus et inconnus du monde sa richesse fait que nous avons décidé de parler d'une plante plutôt connue qu'on trouve dans le sud algérienne « *Cytisus triflorus* ».

Cytisus triflorus est un genre important de la famille des Fabacées, particulièrement abondantes autour de la mer Méditerranée, mais également se trouve dans des régions géographiques distinctes comme le nord et le sud de l'Afrique, l'Europe occidentale et centrale, la mer noire et la Turquie. ^[2]

L'objectif de notre étude est d'estimer la teneur de cette espèce végétale en ces composés actifs essentiels, les poly phénols et les flavonoïdes obtenus dans les deux extraits organique et aqueux de la partie aérienne de *Cytisus triflorus* collecté dans la région de la wilaya de Laghouat.

Pour cela, nous avons structuré notre travail comme suit :

- L'extraction des extraits de *Cytisus triflorus* et évaluation de leurs teneur en poly phénols totaux, en flavonoïdes et en flavonols .
- L'évaluation de l'activité anti oxydante par plusieurs tests in vitro (Test de piégeage du radical DPPH, test de réduction du radical-cation ABTS⁺ et test de réduction du fer).
- L'ensemble des résultats qui seront suivis d'une discussion.

Enfin nous avons terminés notre travail par une conclusion générale et des perspectives.

I. Matériels et méthodes

I.1.Matière végétale

La matière végétale qui a fait l'objet de ce travail est constituée de la partie aérienne (feuilles) de la plante de *Cytisus triflorus*.

Les échantillons ont été récoltés dans la région d'Aflou wilaya de Laghouat (sud Algérien) au mois **septembre 2019**.

La plante étudiée est séchée à l'abri de la lumière pendant 1 mois. Le tableau suivant présente les différentes caractéristiques de la plante étudiée.

Tableau 01: Caractérisation de la plante étudiée

Description	Photos
<u>Noms vernaculaires :</u> ❖ En Italie: <i>Cytisus triflorus</i> ❖ En Français : Genre <i>Cytisus</i>. ❖ En Arabe : الرتم <u>Classification botanique :</u> Ce sont des arbustes ou arbrisseaux épineux ou non, à floraison abondante, en générale à feuilles trifoliolées de couleur jaune. <i>Cytisus villosus</i> est un arbrisseau de 1 à 1,5m dressé, robuste à rameaux allongés. <u>Familles:</u> légumineuses. <u>Feuilles:</u> feuilles pétiolées, à folioles obovales, couvertes sur les deux faces de poils appliqués. <u>Fleurs :</u> fleurs jaune gousse de 25-30mm ; sur 5-6, à valves convexes, noir, très velue soyeuse.	 L'arbre  Les Feuilles  Les Fleurs

Propriétés thérapeutiques :

La famille des légumineuses fournit de très nombreuses drogues, recherchées pour divers principes. Ces drogues existent surtout chez les espèces appartenant à la flore des zones arides ou semi-aride ^[3]. Selon une récente enquête ethnobotanique dans la région Nord- Est de la Lybie, *Retama* est utilisée pour le **traitement de l'hypertension** ^[4]. Et des troubles gastro-intestinaux. Elle était couramment utilisée pour le traitement traditionnel de certaines **maladies rénales** et comme plantes guérisseuses pour le contrôle du **diabète et de la phytothérapie** ^[5]. En Algérie *Retama* a été utilisée contre le **rhumatisme**, les **piqûres de scorpion** et **blessures**, sous forme d'infusion, tisanes, poudres ou compresses ^[6].



I.2 Méthodes

L'ensemble des méthodes expérimentales que nous avons mené dans ce travail se structure comme le montre l'organigramme ci-après

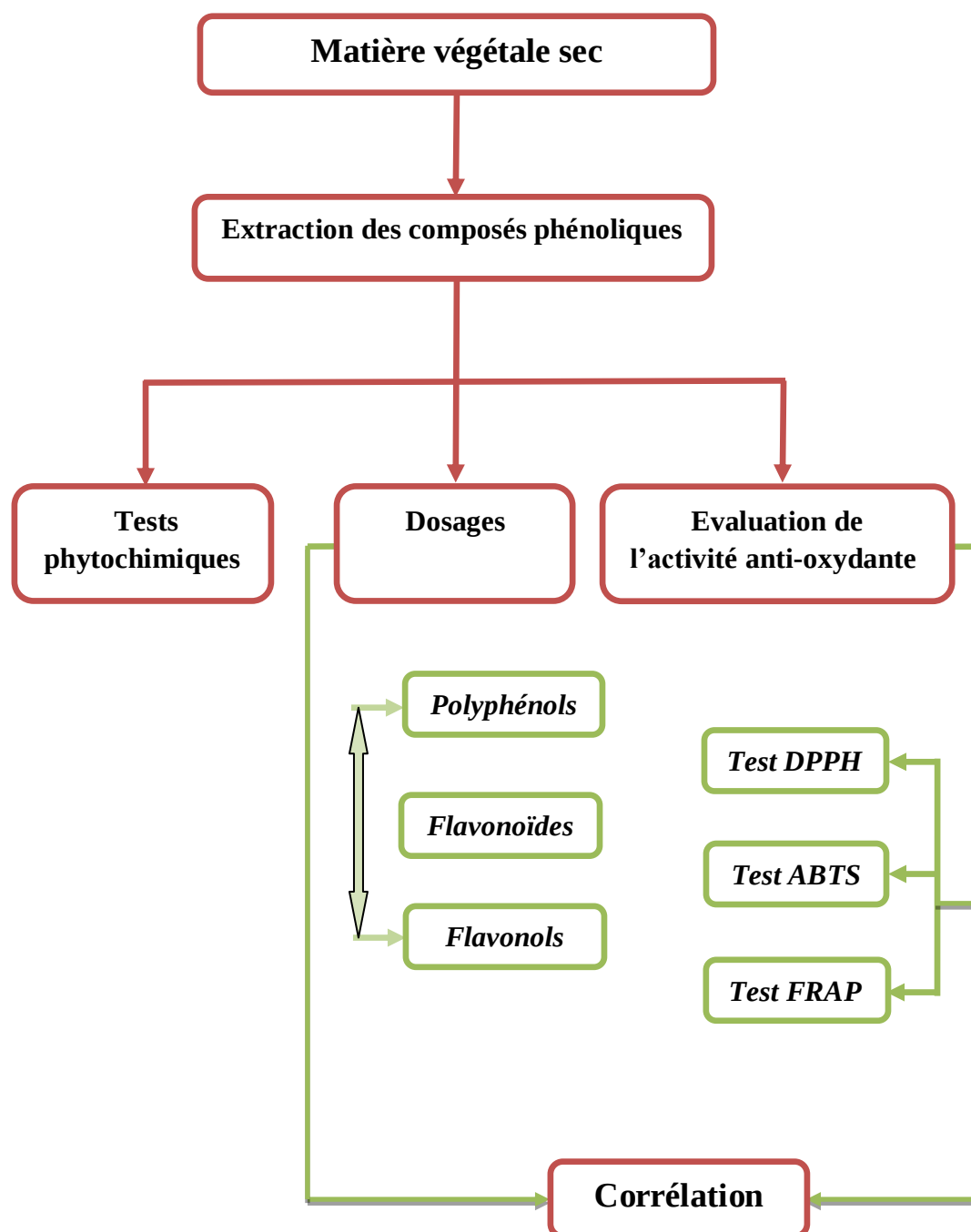


Schéma1 : Organigramme expliquant les différentes étapes dans ce travail.

I.2.1. Etude phytochimique de *Cytisus triflorus*

I.2.1.1.Séchage et Broyage

La matière végétale utilisée au cours de notre étude est la partie aérienne de *Cytisus triflorus*, récolté en mois de **Septembre 2019** dans la région d'Aflou wilaya de Laghouat. Après la récolte, les parties utilisées de la plante (feuilles) ont été lavés et séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré à une température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter toute modification ou dégradation des constituants présents. Une fois séchés, ils sont récupérés dans des sacs en papier (**Figure 1**).

Les feuilles séchées de *Cytisus triflorus* est broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à leur réduction en poudre (**Figure 2**).



Figure 1 : feuilles



Figure 2: feuilles broyées

1.2.1.2. Extraction des composés phénoliques

L'extrait brut des échantillons étudiés est obtenu par macération. Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant ; 5g de poudre ont été mélangé avec 50ml du solvant, le mélange a été mis sous agitateur magnétique à température ambiante pendant 24h.

Le Macérât a été filtré à travers un papier filtre pour obtenir un extrait clair, et on a évaporé le solvant sous vide à une température de 40°C. Le résidu est repris dans (10 ml d'éthanol) et conserver au réfrigérateur jusqu'à le temps d'analyse.

L'organigramme suivant explique les différentes étapes d'extraction des composés phénoliques (**Schéma 2**).

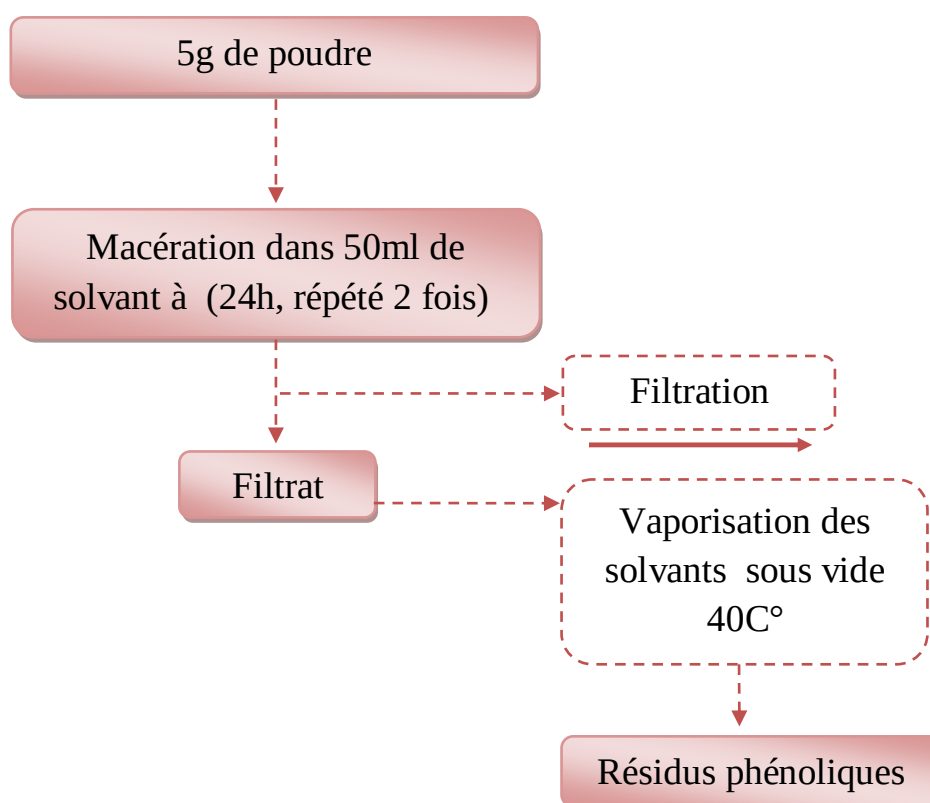


Schéma 2 : Protocole expérimentale d'extraction des composées phénoliques.

I.3. Analyse qualitatif

I.3.1. Tests phytochimiques

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les différents organes des plantes.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions décoloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

✓ **Mise en évidence des composés phénoliques :**

0,1g extrait, on ajoute 3ml éthanol et 5 gouttes de la solution de FeCl_3 à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-vert. ^[7]

✓ **Mise en évidence des flavonoïdes :**

On ajoute 1 ml de l'extrait pur à 1 ml de solution AlCl_3 (2%). et l'ensemble est porté à température ambiante pendant 15 minutes. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur jaune. ^[8]

✓ **Mise en évidence des anthocyanes :**

5ml de l'extrait, on ajoute 5ml de H_2SO_4 et 5ml NH_4OH . Un test positif est révélé par L'apparition d'une coloration bleu violacé. ^[9]

✓ **Mise en évidence des tannins :**

A 2 ml de la solution à tester, on ajoute 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tannins galliques) ou bleu (verdâtre) (tannins cathéchiques). ^[10]

✓ **Mise en évidence des alcaloïdes :**

Leur présence est déterminée quantitativement par : 2.5 ml de l'extrait, on ajoute 1 ml de HCl (10%) (Solution A), et on met les tubes dans un bain marie jusqu'à ébullition. On sépare ce mélange en 2 tubes, le 1^{er} tube constitue le témoin qui contient 1ml de la solution A, le 2^{ème} tube contient 1ml de la solution A et quelques gouttes du réactif de Wagner.

Si le test est positif, on a l'apparition d'une précipitation brune dans le 2^{ème}. ^[11]

Le réactif de Wagner est préparé comme suite :

Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

✓ **Mise en évidence des saponosides :**

Leur présence est déterminée quantitativement par : 10 ml d'extrait bien agité pendant 15s. Après un repos de 15 min en position verticale, on mesure la hauteur de la mousse persistante en cm.^[12]

S'il n'y a pas de mousse : test (–)

Si la hauteur de la mousse est de 1 cm d'épaisseur : test faiblement positif (+)

Si la hauteur de la mousse est de 1 cm à 2 cm d'épaisseur : test positif (++)

Si la hauteur de la mousse est de plus de 2 cm d'épaisseur : test fortement positif (+++).

✓ **Mise en évidence des coumarines :**

5 ml de l'extrait est évaporé au bain marie. Au résidu sec, on ajoute 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin.

- Alors que la deuxième est traitée avec 0.5 ml d'ammoniaque (NH₄OH) à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.^[13]

✓ **Mise en évidence des anthraquinones :**

A 10 ml de l'extrait, on ajoute 5ml de la solution de NH₄OH à 10% avec agitation. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violette.^[14]

I.4. Analyse quantitatif

1.4.1. Dosage des poly phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross en 1965 avec le réactif de Folin– Ciocalteu^[15]. Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique, H₃PW₁₂O₄₀, et l'acide phosphomolybdique, H₃PMo₁₂O₄₀, qui, après oxydation des phénols, est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène, W₈O₂₃, et le molybdène, Mo₈O₂₃. La coloration bleue produite possède une absorption maximale dans la région de 765 nm et est proportionnelle à la quantité totale des composés phénoliques initialement présents.^[16]

Un volume 200 µl d'extrait dilué été mélangés avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) dilué dans l'eau, après agitation pendant 5 min, 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%) est ajouté à l'ensemble. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 30

minutes. L'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (SP-3000 nano) contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0.1-1 mg/ml).

I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La concentration des flavonoïdes a été déterminée en utilisant une méthode chlorométrique ^[17]. La méthode repose sur le principe du dosage direct par le chlorure de l'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner (en présence de chlorure d'aluminium), un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait. ^[18]

Brièvement, un millilitre d'extrait dilué dans l'eau est ajouté à 1 ml d' $AlCl_3$ 2%. Après 30 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la rutine comme contrôle positif à différentes concentrations (0.1-1 mg/ml). Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent de rutine par 1 g du poids sec de la matière végétal. ^[19]

I.4.2. Dosage des flavonols totaux

Le taux des flavonols dans les produits de *Cytisus triflorus* est déterminé par la méthode décrite par ^[20]. Un volume de 500 µl d'extrait est ajouté à 500 µl d'acétate de sodium (5%) et 500 µl de chlorure d'aluminium (2%). La lecture de l'absorbance est faite à 440 nm après 2 heures et demie d'incubation, les résultats sont exprimés en mg équivalents rutine/g d'échantillons (mg EQ/g).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la rétiné comme contrôle positif à différentes concentrations (0.1- 1 mg/ml).

1.5. Evaluation de l'activité antioxydante

1.5.1. Test de piégeage du radical DPPH

✓ Principe

La réduction de radical libre DPPH[•] (2,2'-diphényle-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. ^[21]

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine (**Figure 3**). ^[22]

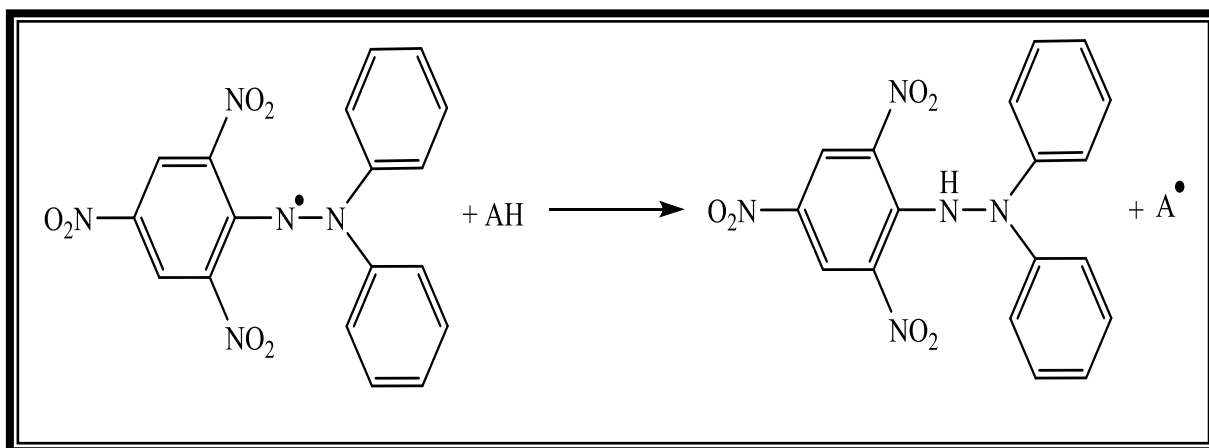


Figure 03: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH.

✓ Mode opératoire

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par LOPES-LUTZ et al (2008) ^[23]. 50µl de chaque solution éthanoïque de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1950 µl de solution éthanoïque du DPPH. Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50 µl d'éthanol avec 1950 µl de la solution de DPPH. La lecture d'absorbances est faite contre un blanc pour chaque concentration à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ;(acide ascorbique) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

La capacité à piéger le radical libre DPPH[•] a été calculé comme pourcentage d'inhibition (I%) en utilisant l'équation suivante :

$$\%I = [(A_0 - A_s) / A_0] * 100$$

Où :

A₀ : Est l'absorbance de la solution DPPH

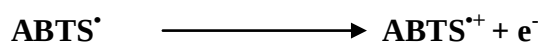
A_S : Est l'absorbance de l'extrait de l'échantillon lorsque la solution a été ajoutée. [24]

L'activité antioxydant est exprimé ensuite par la valeur de IC₅₀ en mg/ml, les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire l'inhibition en fonction de la concentration ; sachant que l'IC₅₀ est la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% d'une mole du radical DPPH. [25]

I.5.2.Réduction du radical-cation ABTS^{•+}

✓ **Principe**

La méthode de radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical-cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) (ABTS^{•+}) :



Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption. [26]

✓ **Mode opératoire**

Pour préparer la solution de l'ABTS on prépare une solution aqueuse de persulfate de potassium K₂S₂O₈ (2,45mM) à partir de cette solution on prépare la solution d'ABTS à (7mM), que présente une coloration bleu-vert correspondante à la formation du radical cationique ABTS^{•+}.

Tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec l'eau distillée pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. Un volume de 1980 µl d'ABTS est mélangé avec 20µl de différente concentration de notre extrait puis laisser à l'incubation pendant 30 min à l'abri de la lumière et à la température ambiante. On mesure directement la diminution de l'absorbance par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 734 nm contre un blanc contenant l'éthanol et persulfate. [27]

L'acide ascorbique (0.5mg/ml) est utilisé comme antioxydant standard. [28]

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\%I = [(Abs_{\text{témoin}} - Abs_{\text{blanc}}) / Abs_{\text{témoin}}] * 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition

Abs_{témoin} : L'absorbance du radical ABTS^{•+} + Ethanol.

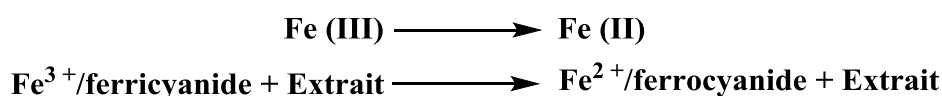
Abs_{extrait} : L'absorbance de l'échantillon ABTS^{•+} (Extrait ou standard). ^[29]

1.5.3. Test de réduction du fer FRAP

✓ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm ^[30]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés ^[31].

Le principe de ce test est basé sur la réaction chimique suivante :



✓ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Ghasemi et al (2009)**. En effet, 25 µl de différentes concentrations de chaque extrait dilué dans l'éthanol est mélangé avec 500 µl de la solution tampon (pH 6.28) et 500 µl de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. après, 500µl de l'acide trichloracétique (10%) est additionné avec 100µl FeCl₃ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

I.5.4. Analyse statistique

Les résultats d'analyse des extraits sont calculés à partir de trois essais. Les données ainsi que les présentations graphiques sont traitées à l'aide de Microsoft Office Excel.

II. Résultats et discussions

II.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction par la méthode de macération de notre plante est exprimé en pourcentage massique par rapport à la matière sèche (**Figure 4**).

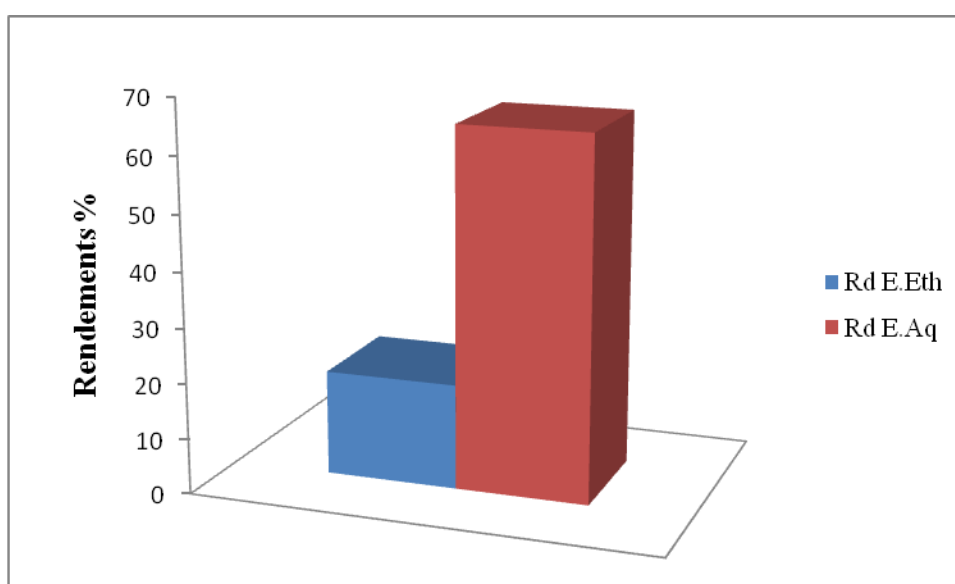


Figure 04 : Les rendements d'extraction.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que l'extrait de l'éthanol a donné un rendement (**19%**) par contre l'extrait aqueux donnait un rendement de (**65%**).

Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants.

II.2 .Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait préparé pour permettre de détecter les différentes familles chimiques présentes dans la partie aérienne de la plante. Les résultats sont repris dans le **tableau 02** une réaction positive est représentée par (+) et l'absence de la substance est représentée par (-).

Tableau 02 : Résultats des tests phytochimiques.

Familles chimiques	Extrait aqueux	Extrait éthanol
Alcaloïdes Test de Mayer		
Test de Wagner	++	++
Anthocyanes	-	-
Composés phénolique	++	++
Saponisides	+ +	+
Tanins tanins catéchiques	+	+
tanins galliques	+	+
Flavonoïde	+	+

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des tanins catéchiques, des Composés phénolique, des flavonoïdes, les alcaloïdes (d'après la réaction de Wagner) et saponisides dans les deux extraits. Par contre l'absence des anthocyanes dans les deux extraits.

II.3. Quantification des composés phénoliques

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 03** et présentés dans la (Figure 05).

Tableau 03 : les teneurs en composés phénoliques des extraits étudiés.

Composés phénoliques	Les teneurs mg/g Extrait éthanolique	Les teneurs mg/g Extrait aqueux
Polyphénols	345,23 ± 7,37	60,8 ± 0,37
Flavonoïdes	681,83 ± 15,83	133,7 ± 52
Flavonols	74,89 ± 16,50	40,45 ± 10,82

La teneur en **phénols totaux** de l'extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 5**) et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche.

Selon **.Tepe^[33]**, la variation des teneurs en polyphénols peut être due à la nature du solvant utilisé, la méthode d'extraction et la température d'extraction.

Pour l'extrait éthanol nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux. La teneur la plus élevée est de l'ordre de $(345,23 \pm 7,37 \text{ mg/g})$

La teneur des flavonoïdes

Les flavonoides ont été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la rutine (**Figure 6**) et exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent de la rutine.

D'après les résultats obtenus, nous avons observé un teneur plus élevée en Flavonoïdes de l'ordre $(681,83 \pm 15,83 \text{ mg/g})$ d'extraction.

La teneur des flavanols

Dans nos échantillons a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la rutine (**Figure 7**) et exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent de la rutine.

L'analyse des résultats révèle que l'extrait éthanol possède la teneur la plus élevée $(74,89 \pm 16,50) \text{ mg/g}$.

Par conséquent, on peut conclure que la quantité de différents composés phénoliques est influencée par la capacité de chaque solvant d'extraire le maximum de ces composés selon leur polarité.

II.4 .Estimation de l'activité antioxydant

II.4.1.Test de DPPH

Nous avons déterminé les valeurs des IC₅₀ de l'extrait et de l'antioxydant à partir des représentations graphiques $I\% = f(C)$ (**Figures 8, 9 et 10**). Ce graphe montre la croissance de l'inhibition en fonction de la concentration, lorsque la concentration de l'extrait augmente dans la solution la capacité à réduire le radicale DPPH augmente, ce qui montre l'activité antioxydant de cette extrait. Les résultats sont groupés dans **le Tableau 04**) et présentés dans la (**Figure 08**)

Tableau 04 : Activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH.

Pouvoir antioxydant par le test DPPH IC 50 (mg/ml)	
Extrait éthanol	0,0300±0,00600
Extrait aqueux	0,0590±0,00200
Acide ascorbique	0,0048±0,00014

D'après les résultantes de ce tableau on a remarque que la valeur de concentration d'inhibition de 50% de DPPH est de l'ordre 0.03 mg/ml pour l'éthanol tandis que l'extrait aqueux a montre une valeur plus élevée, avec une valeur $IC_{50\%}=0.059\text{mg/ml}$, en comparant ces valeur obtenue avec le standard l'acide ascorbique

Donc, l'activité antioxydant d'éthanol plus puissant car elle possédé $IC_{50\%}$ plus faible

II.4.2. Test d'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{•+}$ de coloration bleu-vert en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

La capacité de piégeage des radicaux libres a été exprimée par la concentration effective IC_{50} de l'antioxydant (mg/ml) qui représente la concentration nécessaire pour récupérer 50% de radicaux d'ABTS.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le (**Tableau 05**) et présentés dans la (**Figure 09**)

Tableau 05: Résultats de l'activité anti oxydante évaluée par le test ABTS.

Pouvoir antioxydant par le test ABTS mg/ml	
Extrait Ethanol	0,0028±0,00015
Extrait aqueux	0,00468±0 ,0034
Acide ascorbique	0,0038±0,00017

Les résultats ont été exprimés par détermination d' IC_{50} (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en $ABTS^{•+}$) Plus la valeur d' IC_{50} est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante, les IC_{50} ont été calculé pour chaque antioxydants standard.

Les résultats ont montré que la fraction éthanol présentait une activité antioxydante plus forte que l'extrait aqueux.

Pour les deux extraits, l'extrait éthanol présente IC₅₀ (0,0028±0,00015 mg/ml). Les valeurs sont plus proches à celles de l'acide ascorbique.

Ce travail est en accord avec des résultats déjà publiés ^[34]. Selon lesquels les polyphénols constitueraient une bonne source d'antioxydant naturel.

II.4.3. Test de FRAP

Beaucoup d'études ont indiqué la présence d'une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance réductrice. Dans ce test le pouvoir antioxydant se manifeste via le changement de la couleur du milieu réactionnel de jaune au bleu, un changement qui est due à la réduction de (Fe³⁺) à la forme fer ferreux (Fe²⁺).

Le pouvoir réducteur de ces échantillons est exprimé par la concentration effective à 50% (IC₅₀) qui est une concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5 ^[35]. En utilisant le Trolox comme standard.

Les résultats obtenus sont représentées dans le **Tableau 06**) et présentés dans la (**Figure10**)

Tableau 06 : Test FRAP pour les extraits analysés.

FRAP IC 50 (mg/ml)	
Extrait Ethanol	0,008 ±0,0006
Extrait aqueux	0,020±0,0007
Acide ascorbique	0 ,003±0,0002

Selon les résultats du test de FRAP mentionnés sur le **tableau 06**, Nous constatons que la Extrait éthanol a présenté une faible valeur d'IC₅₀ (0,00764 ±0,00064 mg/ml) ce qui signifie une meilleure capacité que l'extrait aqueux (0,002±0,007 mg/ml). Ces résultats étaient comparables à l'acide ascorbique (0 ,0028±0,0002mg/ml). Ont montré que cette forte activité peut être probablement due à la présence de groupement hydroxyle dans lescomposés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réductants et inactivateurs des oxydants. ^[36]

Conclusion et perspective

L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

L'objectif primordial assigné par cette étude et d'évaluer les propriétés antioxydantes de la plante de *cytissus triflorus*, il est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour traitement de plusieurs maladies.

L'extraction des extraits de la partie aérienne de notre plante a montré que l'extrait éthanolique a présenté le rendement le plus élevé par rapport à l'extrait aqueuse.

L'évaluation du contenu des phénols totaux révèle la présence des quantités intéressantes en polyphénols. De même procédure nous avons conclu que cette plante est riche en flavonoïdes.

L'évaluation de potentiel anti radicalaire des extraits par le test au DPPH; ABTS et FRAP montré que les composés phénoliques de la plante étudiée étaient doués de l'activité antioxydant. D'après ces résultats nous constatons que l'extrait éthanolique a présenté une faible valeur d'IC50 ce qui signifie une meilleure capacité antioxydant.

Comme perspective, nous suggérons des études complémentaires afin de déterminer les activités biologiques des extraits de *cytissus triflorus* **in vitro** et **in vivo**.

Référence Bibliographie :

- [1] **Bérubé-Gagnon J (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Piceamariana. Mémoire de l'université de Québec.
- [2] **Andriam parany J.N., Brinkmann K., Jeannoda V. and Buerkert A. (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, 61-69. Anusuya N. and Mania
- [3] **Chopra C .,Abrol B.K.et Handa K.L.(1960).** les plantes médicinales des régionsarides concidérée surtout de point de vue botanique.UNESCO ,paris.p75.
- [4] **Ishurda O.,Kermagie A.,Zgheel F., Flefla M., Elmabruk M.,Yalin W ., KennedyJ.F. et P.Yuanjiang. (2004).**structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the szzds of Retama raetam. Carbohydrate polymers.58.
- [5] **Magherani M., Zeegwagh N.A., Haloui M.et Eddouks M. (2005).**Acute diuretic effect of aqueous extract of Retama raetam in normal rasts.journal of Ethnopharmacology.99,31-35
- [6] **Ould el Hadj, M., Didi., Hadj-Mohammed M., Zabeirou H.(2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (septentrional East Sahara).Courrier du savoir,(03),47-51.
- [7] **Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyugbuaja V.O. (2004)** Identification of Active Principles of M. balsamina(Balsam Apple) Leaf Extract Journal of Medical SciencesVolume: 4 Issue: 3 Page No.: 179-182
- [8] **Paris R., Moyse H. (1969) .** Précis de matière médicinale. Paris : Masson.
- [9] **N'Guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, Aké-Assi L. (2009).** Screening phytochimiquede quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sci Nat, 6 (1) : 1 –15.
- [10] **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3e éd. France : Tech & Doc –Lavoisier.
- [11] **Oloyede O I. (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of Carica papaya. Pak J Nutr, 4: 379–381.

- [12] **V. L. Singleton and J. A. (1965)** . Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology and Viticulture, vol.16, no. 3, pp. 144–158, Jan. .
- [13] **N. Boizot and J.-PQ, (2006).** Charpentier, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d ' un arbre forestier, Le Cahier de Technique de l'Inra, pp. 79–82.
- [14] **M. Dahmouni, M. Lahbib, B. Jamâa, and G. Mabrouk .(2012).** Relation entre les chenilles d'*Orgyia trigotephra* (Lepidoptera ,Lymantriidae), insecte polyphage ravageur du chêne-liège , et ses plantes hôtes en Tunisie, IOBC/wprs Bulletin, vol. 76, pp. 271–278.
- [15] **A. Basli, M. Chibane, K. Madani, and N. Oukil.(2012)** .Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf., Phytothérapie, vol. 10, pp. 2–9.
- [16] **A. Manallah. (2012)** .Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L, Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas. Setif,.
- [17] **Adedapo A. A., Florence J. O., Srinivas K., Anthony A. J. and Patrick M. J. (2008).** Antibacterial and antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. BMC Complementary and Alternative Medicine 10.1186/1472-6882-8-53.
- [18] **P.Schofield, D.M. Mbugua, A.N.Pell.(2001).** "Analysis of condensed tannins" a review. Anim. Feed Sci. Technol. Vol. (91), page: 21.
- [19] **B.Sun., JM.Richardo-da-Silvia,1998.** I.Spranger, "Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins" J. of Agriculture and Food Chemistry, Vol. (46),page : 4267.
- [20] **R.Julkunen-Titto .(1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics" Journal of Agricultural and Food chemistry, Vol., page : 213.
- [21] **Molyneux P., Songklanakarin J. (2014).** The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sciences Technology ,6 (2), 211-219.

- [22] **Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S. (2006)** .Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits d'iguier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. , (1), 3-8.
- [23] **Athamena S., Chalghem I., Kassah A., Laroui S., Khebri S (2010)**. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. 11 (1), 72.
- [24] **Bougandoura N., Bendimerad N. (2013)**. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. (9), 15.
- [25] **Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira J. A., and P. Baptista. (2009)**. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) Leaves on free radicals, *Food Chem. Toxicol.* 47, 1507-1511.
- [26] **Jiri S., Marketa R., Olga K., Petr S., Vojtech J., Libuse T., Ladislav H., Miroslava B., Josef Z., Ivo P., Rne K. (2010)**. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molécules*. (15), 8618-8640.
- [27] **Abbes, A. (2014)** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Artemisia verticillata* «NOUKHA» de la région de Tlemcen .Mémoire de master, Université Aboubakr Belkaid. Juin .
- [28] **Ba K., Tine E., Destain J., Cisse C., Thonart P. (2010)** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc.* 14(1), 131-139.
- [29] **Adeolu A A., Florence O J., Anthony J A., Patrick J M. (2008)** Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. (8), 1-7.
- [30] **Oyaizu M. (1986)**. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- [31] **Hubert A J. (2006)**. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. école doctorale

des Sciences Ecologiques. Vétérinaires. Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments. p 174.

[32] **Ghasemi, K., Ghasemi, Y., and Mohammed, A.E. (2009).**Antioxydant Activity, Phénol and Flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues.Pak. J. Pharm, 22 (3): 277-281.

[33] **B.Tepe, M.Sokmen, HA.Akpulat, A.Sokmen,(2006)** "Screening of the antioxidantpotentials of six Salvia species from Turkey" Food Chem., Vol. (95), page : 200.

[34] **Hammoudi Roukia (2015).** Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien, Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat ès sciences en biologie.

[35] **Halliwell, B. (2007).** Dietary polyphénol: good, bad, or different for your health?,Cardiovasc Res, 73(2): 47-341

[36] **Gourine N, Bombarda I, Yousfi M et Gaydou EM. (2010).** Chemotypes of Pistacia atlantica leaf essential oils from Algeria .Natural product of communication, vol. 5, N°1, 115-120.

ANNEXES

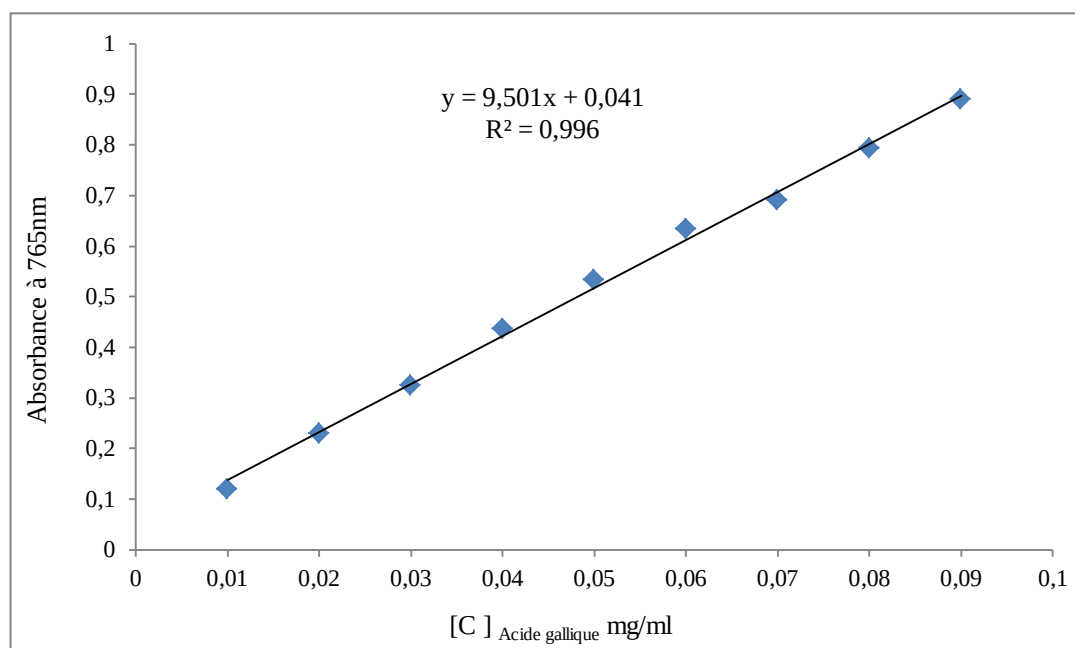


Figure 5: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des poly phénols totaux.

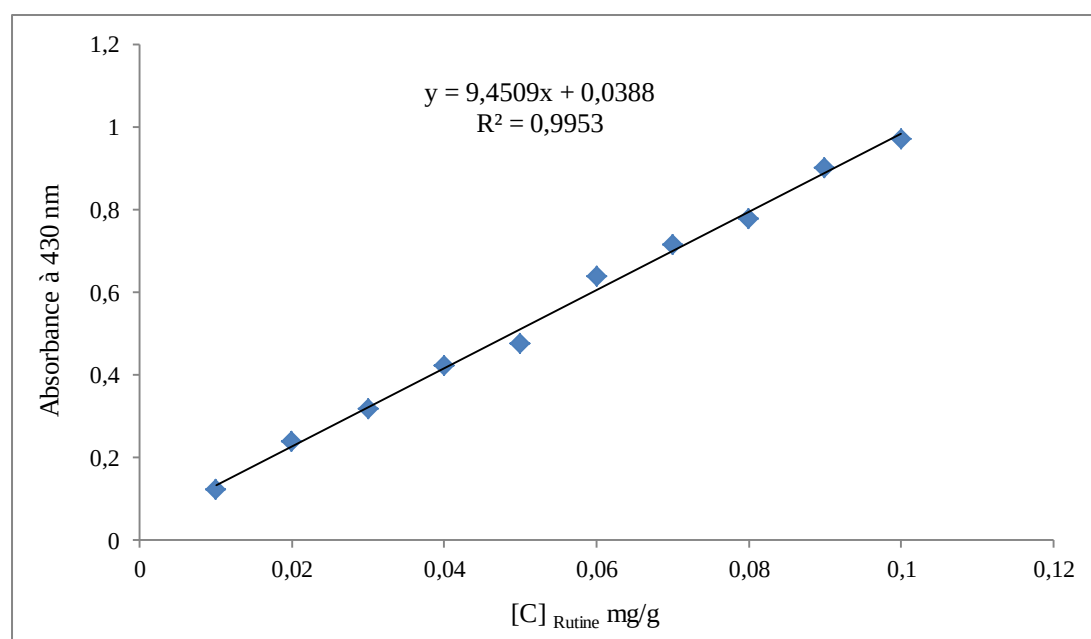


Figure 6: Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

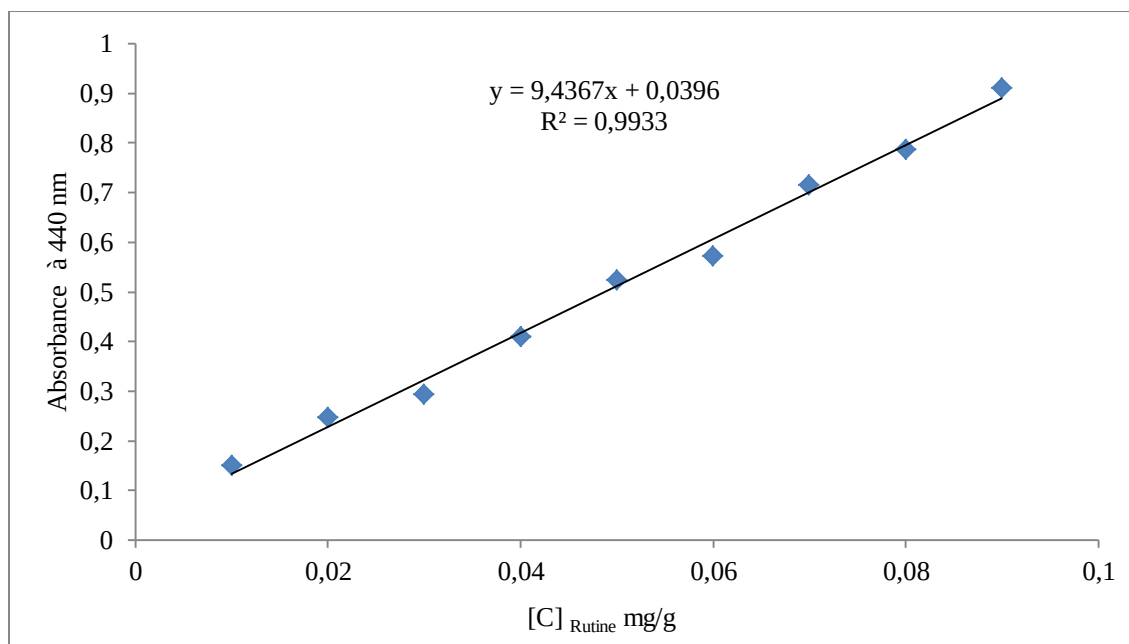


Figure7 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonols totaux.

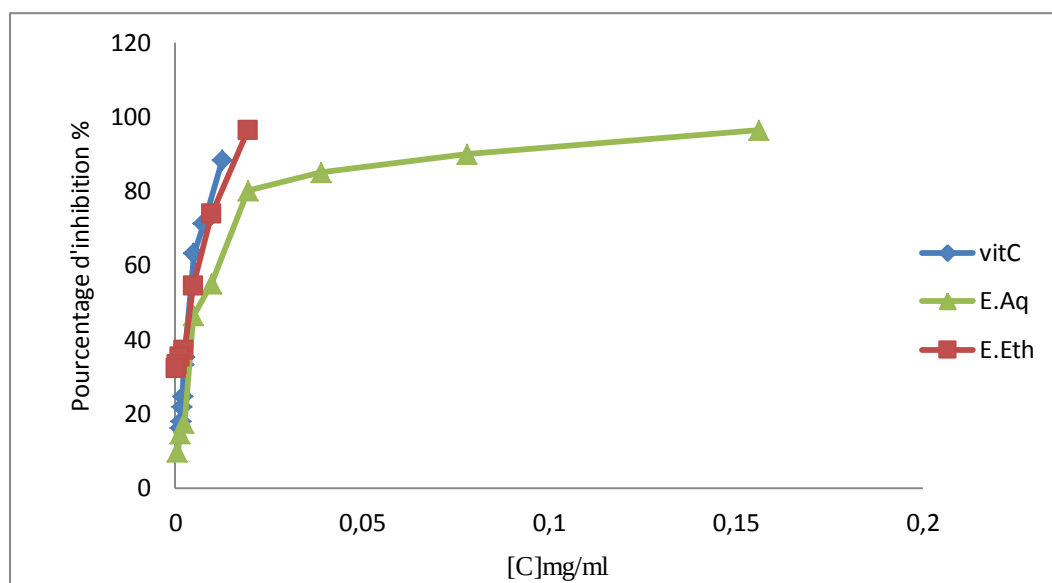


Figure 8 : Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical DPPH.

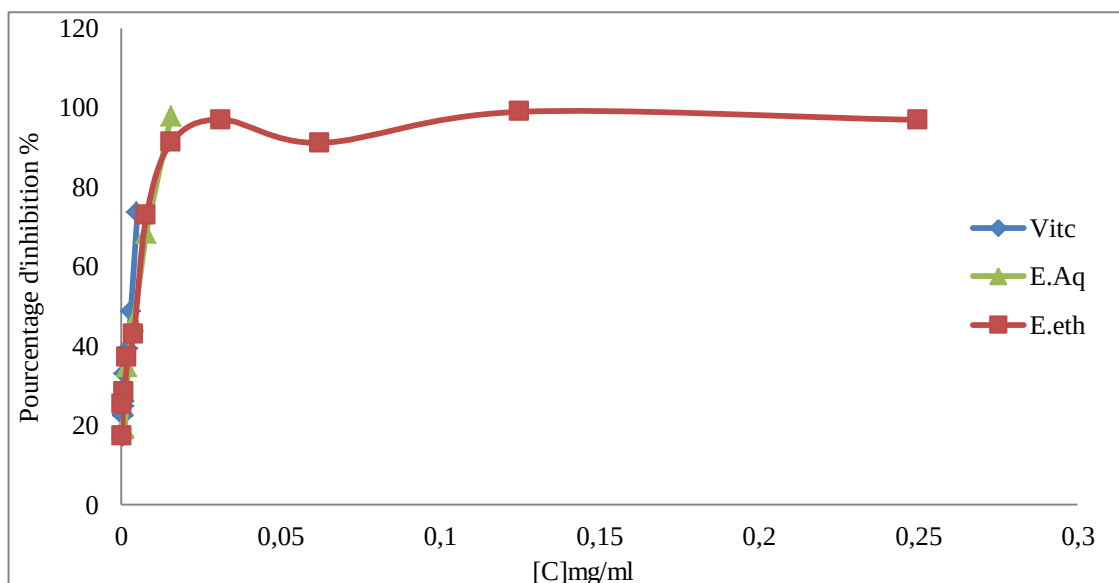


Figure 9 : Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical ABTS ^{•+}.

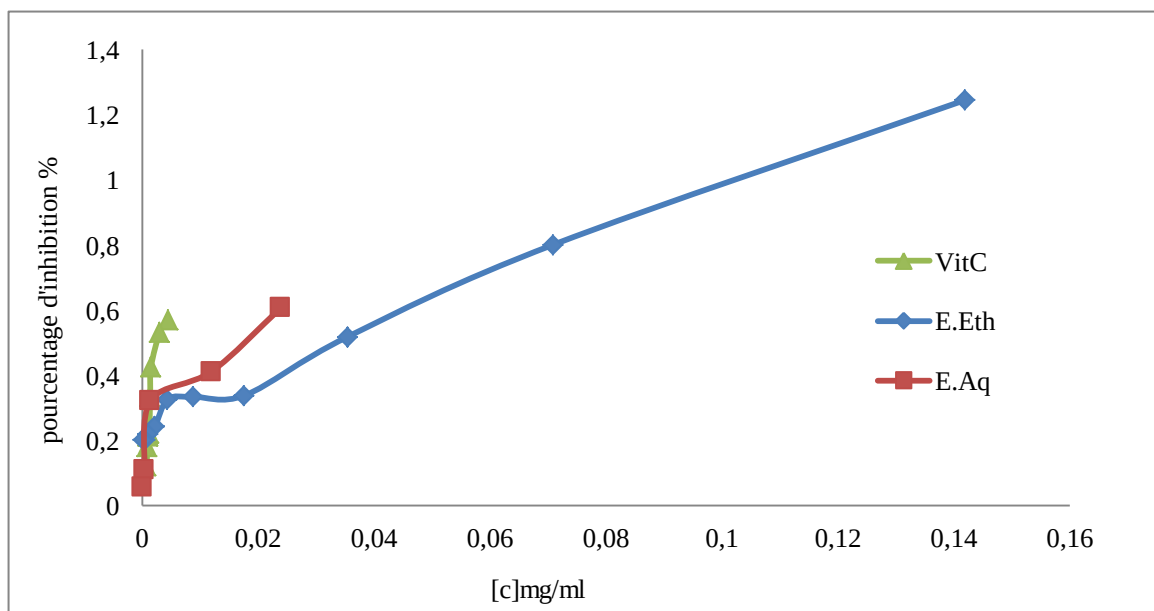


Figure 10 : Le pourcentage d'inhibition vis-à-vis du radical FRAP.

تهدف هذه الدراسة الى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة لمستخلصات *Cytisus triflorus* في المستخلص الايثانولي والمائي .

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج وتقدير إجمالي الفينولات والفلافونويدات

اما الجزء الثاني هو دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات النباتية باستخدام تقنيات: تثبيط الجذر الحر (DPPH)، تثبيط الجذر الحر (ABTS⁺) والقدرة الإرجاعية للحديد (FRAP) .

وفقا لنتائج التحليلات الفيتو كيميائية أثبتنا وجود مركبات الفينول، الفلافونويد، بكميات كبيرة في مستخلص الايثانوليك أكثر منه المستخلص المائي ، كما بين تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن مستخلص الايثانوليك لديه طاقة مضادة للأكسدة قوية أكثر من المستخلص المائي.

الكلمات المفتاحية : مضادات الاكسدة , بوليفينول

Résumé :

Le but de cette étude est d'évaluer les activités antioxydantes des extraits de *Cytisus triflorus*.

Tel que l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des poly phénols et flavonoïdes totaux et flavonols totaux.

La deuxième partie c'est l'étude de l'activité antioxydant d'extraits de plantes à l'aide de techniques: inhibition des radicales libres (DPPH), inhibition des radicales libres (ABTS⁺) et la capacité de réduction de fer (FRAP).

D'après les résultats des analyses quantitatives, nous avons constaté la présence des composés phénoliques, de flavonoïdes en grande quantité dans l'extrait éthanolique que l'extrait aqueux, et l'évaluation de l'activité antioxydant a montré que l'extrait éthanolique possède une activité antioxydant plus puissante que l'extrait aqueux.

Mots clés: *Cytisus triflorus*, composés phenoliques, Activité antioxydante

Abstract:

The purpose of this study is to evaluate the antioxidant activity for the extracts of *Cytisus triflorus* (ethanolic extract and hydro extract).

The first part of this study concerns the extraction and estimating the phenolic compounds and flavonoid compounds.

The second part concerns the study of the antioxidant activity for the extracts of plants using the techniques: DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP).

According to the photochemical analysis, we have proved the existence of phenolic and flavonoid compounds with great quantities in the etanolic extract more than it exists in the hydro extract as the evaluation of the antioxidant activity .The etanolic extract has an antioxidant activity which is stronger than the hydro extract

Keywords: *Cytisus triflorus*, phenolic compound, antioxidant activity