



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

Département de Biologie

**LABORATOIRE**

Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité

Biologique

**THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT**

En Biochimie

**Option**

Biochimie Appliquée

**Présentée par**

M<sup>r</sup> BAREK Saïd

**Thème**

**Etude phytochimique et biologique d'extraits de deux plantes médicinales**

***Genista sahara et Glycyrrhiza glabra.***

Soutenue le : 28/02/2021

Devant le jury composé de :

Présidente :	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	Pr. Rahmoun Mohmmmed Nadjib	Université de Tlemcen
Examineurs :	Pr. Choukchou-Braham Noureddine	Université de Tlemcen
	Dr. Gherib Mohamed	Centre Universitaire de Naama
	Pr. Amrouche Abdelillah	Centre Universitaire de Naama

Année universitaire : 2019-2020

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'études, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.*

*A mon père pour ses encouragements incessants et son soutient moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.*

*Que Dieu les protège et que ce travail soit la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour pour eux.*

*A mes sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A toutes les membres de ma famille, petits et grands,*

*A mes adorables amies pour les instants de joie partagés en leur compagnie, leur gentillesse et tous les sentiments qu'ils me témoignent.*

## **Remerciements**

*Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices; nos remerciements vont d'abord au Créateur de l'univers qui nous a doté d'intelligence, et nous a maintenu en santé pour mener à bien cette année d'étude. Je tiens aussi à adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse **M<sup>r</sup> Rahmoun Mohammed Nadjib**, professeur au département de Biologie, faculté des Science de la Nature et de la Vie, des Science de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de diriger ce modeste travail. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils et sa compréhension. Veuillez trouver ici, Monsieur ma reconnaissance et tout mon respect.*

*Mes remerciements vont également à **M<sup>m</sup> Boucherit-Otmani Zahia**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen. Je vous remercie pour le grand honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici Madame l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.*

*De même, je remercie très sincèrement **M<sup>r</sup> Choukchou-Braham Nouredine**, Professeur au département de Chimie, faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et directeur du Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.*

*Je tiens à remercier **Mr Gherib Mohamed**, Docteur au Département des sciences de la nature et de la vie, institut des sciences et technologies, Centre Universitaire Salhi-Ahmed-Naama, pour l'honneur qu'il m'a fait d'être examinateur de cette thèse. Qu'il trouve dans cette thèse le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

*J'exprime ma vive reconnaissance à **M<sup>r</sup> Amrouche Abdelillah**, Professeur Professeur au Département des sciences de la nature et de la vie, Centre Universitaire Salhi-Ahmed-Naama, pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je tien a vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.*

*Je ne saurais passer sous silence la contribution de **M<sup>r</sup> Bensouici Chawki**, Maitre de recherche au Centre de Recherche en Biotechnologie CRBt, Constantine avoir participé activement à l'avancement des travaux. Je lui adresse une mention spéciale pour son aide précieuse. Trouvez ici monsieur l'expression de mon entière reconnaissance et l'assurance de mon amitié sincère.*

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude à **M<sup>r</sup> El-haci Imad Abdelhamid** Maître de Recherche A au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) pour ses conseils, sa confiance, son soutien inestimable et ses qualités intellectuelle qui ont su nourrir mes réflexions.*

*J'exprime mes sincères remerciements à mes chères amis et frères d'armes **Mr Aissaoui Mohammed, Mr Terki Mohammed et Mr Beladgham Zakaria**, doctorants en Biochimie appliquée à l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuelle et les bons moments partagés tout au long de ma démarche.*

*Je désire remercier aussi **M<sup>r</sup> Tadjouri Fethi** pour son aide précieux dans l'élaboration de modeste thèse*

*Je tiens à remercier tout particulièrement les membres de ma famille, pour leur présence constante, leur soutien et leur aide inestimable.*

*Enfin, mes remerciements s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail.*

## ملخص :

يركز هذا العمل على دراسة المكونات الكيمونباتية و الأنشطة البيولوجية للمستخلصات المستخرجة من نبتتين طبييتين (*Glycyrrhiza glabra* L. *Genista saharae* (Cos. & Durr.) و اللتان تنتميان إلى عائلة البقوليات والمعروفتان بامتلاكهما لخصائص علاجية متعددة.

التركيبية الكيميائية لمستخلصات الجزء العلوي لنبته *G. saharae* و جذور نبتة *G. glabra* تمت معاينتهما باستعمال الفصل الكروماتوغرافي عالي الإستبانة مع وسم البنية الكيميائية بأسلوب التصوير بالرنين المغناطيسي. لدراسة النشاط المضاد للأكسدة استخدمت طرق الأكسدة الإرجاعية بانتقال ذرة الهيدروجين أو/و الإلكترون المفرد. كما تطرقنا لتقييم النشاط المضاد للميكروبات حسب النحو الموصى به من قبل معهد المعايير العيادية و المخبرية . وتم اختبار انحلال الكريات الدموية الحمراء بقياس نسبة تسرب الهيموغلوبين. في حين قَدّر النشاط المثبط لإنزيم كولين الإستيراز باستعمال إنزيمي الأستيل كولين إستيراز AChE و البيبتيريل كولين إستيراز BChE.

معاينة الكروماتوغرافيا السائلة العالية الكفاءة (HPLC) أثبتت عن وجود أحماض الفينول، حمض الهيدروسياناميك و الفلافونويدات من فئة الفلافونول، إيزوفلافان والفلافونون. كما أوضحت صور طيف الرنين المغناطيسي عن بنية الجنيستين المستخلصة من نبتة *G. saharae* و الجلابريدين من نبتة *G. glabra*. فيما يخص قدرة مستخلص الكلوروفورم و إثيل الأستات للنبتتين كمضادات الأكسدة تبين أنها ذات أهمية مع تراكيز مثبطة بنسبة 50% تساوي 4.03  $\pm$  0.15 = IC<sub>50</sub>ABTS و 3.4  $\pm$  0.99 مكغ/مل ومع 1.42  $\pm$  35.63 = A<sub>0,5</sub>CUPRAC و 21.78  $\pm$  2.91 مكغ/مل. وأوضحت الدراسة أن مستخلص الكلوروفورم للنبتتين أثبت نجاعته اتجاه البكتيريا بتركيز أدنى مثبط يساوي MIC = 19.5 مكغ/مل. علاوة على ذلك أظهر مستخلص الكلوروفورم لجذور *G. glabra* نشاطا مثبطا قويا لأنزيم البيبتيريل كولين إستيراز بتركيز مثبط يساوي IC<sub>50</sub>Bch = 4.72  $\pm$  0.72 مكغ/مل. أما بالنسبة لاختبار انحلال الدم عن طريق قياس نسبة تسرب الهيموغلوبين تبين أن المستخلصات المدروسة لا تملك أي تأثير سام ملحوظ على الكريات الدموية الحمراء.

**الكلمات المفتاحية:** البقوليات، الفصل الكروماتوغرافي عالي الإستبانة، التصوير بالرنين المغناطيسي، النشاط المضاد للأكسدة، التركيز الأدنى المثبط، البيبتيريل كولين إستيراز.

## Résumé

Ce travail porte sur l'étude des constituants phytochimiques et les activités biologiques *in-vitro* des extraits de ces deux plantes *Genista saharae* (Cos. & Durr.) et *Glycyrrhiza glabra* L. appartenant à la famille des *Fabacées*.

La composition chimique des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* et les racines de *G. glabra* a été analysée via une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA et une caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier. L'activité antimicrobienne des extraits a été testée vis-à-vis de différentes souches en utilisant la méthode de diffusion des disques et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). En outre, le test d'hémolyse a été réalisé par le suivi de la fuite d'hémoglobine. Tandis que, l'activité inhibitrice du cholinestérase a été estimée par deux enzymes l'acétylcholinestérase AChE et la butyrylcholinestérase BChE.

L'analyse chromatographique a mis en évidence la présence des acides phénoliques, des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes (les flavonols, les isoflavanes et les flavanones). Ce pendant, la caractérisation par RMN nous a permis d'élucider la structure de la génistéine à partir de la plante *G. saharae* et la glabridine de l'espèce *G. glabra*. Le potentiel antioxydant des extraits chloroformiques et acétates d'éthyles des deux plantes s'est révélé intéressant avec des  $\text{CI}_{50\text{ABTS}} = 4,03 \pm 0,15$  et  $3,45 \pm 0,99$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement et avec une  $\text{A}_{0,5\text{CUPRAC}} = 35,63 \pm 1,42$  et  $21,78 \pm 2,91$   $\mu\text{g/mL}$ . Les extraits chloroformiques des deux plantes ont montré un pouvoir antibactérien important avec une CMI de l'ordre de 19,5  $\mu\text{g/mL}$ . En plus, l'extrait chloroformique de *G. glabra* a manifesté une puissante activité inhibitrice de BChE avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $4,72 \pm 0,72$   $\mu\text{g/mL}$ , une valeur supérieure comparée à celle du standard galantamine. Enfin les tests d'hémolyse des extraits des deux plantes n'ont pas montré d'effet toxique vis-à-vis des globules rouges humains.

**Mots clés:** *Genista saharae* (Cos. & Durr.), *Glycyrrhiza glabra* L., RP-HPLC-PDA, RMN, ABTS, CUPRAC, CMI, BChE.

**Abstract:**

This work is based on the study of phytoconstituents and *in-vitro* biological activities of two plants *Genista saharae* (Cos. & Durr.) and *Glycyrrhiza glabra* L. which belonging to the *Fabaceae* family.

The chemical compositions of aerial part of *G. saharae* and *G. glabra* roots extracts were analyzed by the high performance liquid chromatography and characterized with  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. The antioxidant activities were evaluated using hydrogen atoms and single electron transfer. The antimicrobial activity of the extracts was realized against different strains using the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The hemolysis test was performed by following the hemoglobin leakage. When, the cholinesterase inhibitory activity was performed through the acetylcholinesterase and butyrylcholinestrerase enzymes.

The chemical analysis revealed the presence of phenolic acids, hydroxycinnamic acid and flavonoids illustrated by the presence of flavonol, isoflavane and flavanones. However, the NMR spectroscopy allowed the characterization of genistein from *G. saharae* plant and glabridin structure from *G. glabra* plant. The antioxidant assays revealed that chloroformic and ethyl acetate extracts are the best among the others extracts with a  $\text{IC}_{50\text{ABTS}} = 4.03 \pm 0.15$  and  $3.45 \pm 0.99 \mu\text{g/mL}$ , respectively and with an  $\text{A}_{0,5\text{CUPRAC}} = 35.63 \pm 1.42$  and  $21.78 \pm 2.91 \mu\text{g/mL}$ . The chloroformic extracts of both *Fabaceae* presented the effective antibacterial activity with MIC's =  $19.5 \mu\text{g/mL}$  against the most tested bacteria. Moreover, the same extract showed a potent butyrylcholinestrerase inhibitory activity with  $\text{IC}_{50\text{BChE}} = 4.72 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$ , which is too strong then the standard drug. When, the hemolysis tests of two plant extracts showed that the extracts didn't have a toxic effect against human blood cells.

**Keywords:** *Genista saharae* (Cos. & Durr.), *Glycyrrhiza glabra* L., RP-HPLC-PDA, NMR, ABTS, CUPRAC, MIC, BChE.

# Table des matières

## Introduction

Introduction.....	2
-------------------	---

## Première partie : Partie bibliographique

### Chapitre 1. Phytothérapie et métabolites secondaires

1. Généralités.....	5
2. La phytothérapie.....	5
3. Classification des métabolites secondaires.....	7
3.1. Composés phénoliques.....	7
3.1.1. Les polyphénols.....	7
3.1.1.1. Classification des polyphénols.....	8
3.1.1.1.1. Les acides phénoliques.....	8
3.1.1.1.2. Les flavonoïdes.....	9
3.1.1.1.3. Les anthocyanes.....	9
3.1.1.1.4. Les flavanes.....	10
3.1.1.1.5. Les tannins.....	10
3.1.1.2. Biosynthèses des polyphénols.....	12
3.1.1.2.1. La voie de l'acide shikimique.....	12
3.1.1.2.2. La voie de l'acide malonique.....	13
3.1.2. Les flavonoïdes.....	13
3.1.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes.....	13
3.1.2.2. Classification des flavonoïdes.....	16
3.1.2.2.1. Flavonols.....	16
3.1.2.2.2. Flavones.....	16
3.1.2.2.3. Flavan-3-ols.....	17
3.1.2.2.4. Isoflavonoïdes.....	18
3.1.2.2.5. Anthocyanidines.....	18
3.1.2.2.6. Flavanones.....	18
3.1.1.3. Activités biologiques des polyphénols.....	19
3.2. Les alcaloïdes.....	19
3.2.1. Classification des alcaloïdes.....	20
3.2.2. Biosynthèse des alcaloïdes.....	21

3.2.3. Activités biologiques des alcaloïdes.....	21
3.3. Les tèrepenoïdes.....	22

## **Chapitre 2. La famille des *Fabaceae***

1. Généralités.....	23
2. Caractères botaniques de la famille.....	23
2.1. Appareil végétatif.....	23
2.2. Appareil reproducteur.....	24
2.3. Phylogénie.....	24
2.3.1. La sous-famille des <i>Papilionoidae</i> .....	24
2.3.1.1. Caractères botaniques.....	24
2.3.1.2. Phylogénie.....	25

## **Chapitre 3. Plantes étudiées**

1. <i>Genista saharae</i> (Coss. & Dur.).....	26
1.1. Distribution géographique du genre <i>Genista</i> .....	26
1.2. Taxonomie de la plante <i>Genista saharae</i> .....	26
1.3. Description botanique de l'espèce <i>Genista saharae</i> (Coss. & Dur.).....	27
1.4. Les métabolites secondaires les plus courants.....	27
1.5. Utilisation thérapeutique du genre <i>Genista</i> .....	31
2. <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	32
2.1. Morphologie de la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	32
2.2. Taxonomie de la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	33
2.3. Répartition géographique de la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	33
2.4. Partie utilisée en médecine traditionnelle.....	34
2.5. Composition chimique des racines de l'espèce <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	34
2.5.1. Les saponosides tritèrepiniques.....	35
2.5.1.1. La glycyrrhizine.....	35
2.5.1.2. Les autres saponosides.....	36
2.5.2. Les flavonoïdes.....	37
2.6. Propriétés pharmacologiques de la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	38

## Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	40
1.1. Collecte du matériel végétal.....	40
1.2. Préparation des extraits.....	40
1.3. Fractionnement et séparation par chromatographie sur colonne.....	41
1.4. Chromatographie sur couche mince.....	41
2. Dosage des composés phénoliques.....	43
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	43
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	43
2.3. Dosage des tannins condensés.....	44
3. L'analyse des composés phénoliques par RP-HPLC-PDA.....	44
4. Analyse spectrale par RMN.....	45
5. Etude de l'activité antioxydante.....	45
5.1. Activité antiradicalaire du DPPH.....	45
5.2. Activité du piégeage de l'ABTS.....	46
5.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	48
5.4. Pouvoir réducteur du fer.....	48
5.5. Capacité Antioxydante Totale (CAT).....	49
5.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénantroline.....	49
6. Activité antibactérienne.....	50
6.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide.....	50
6.2. Méthode de dilution sur milieu liquide.....	51
7. Activité antifongique vis-à-vis des levures.....	51
8. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges.....	52
9. Evaluation de l'activité anticholinestérase.....	53
10. Analyses statistiques.....	53

## Troisième partie : Résultats et interprétation

1. Choix des plantes.....	56
2. La partie aérienne de la plante <i>Genista saharae</i> (Coss. & Dur.).....	56
2.1. Dosage des composés phénolique de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	56
2.2. Analyse par RP-HPLC-PDA.....	57
2.3. Spectroscopie RMN.....	59
2.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	61

2.4.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	61
2.4.2. Piégeage du radical ABTS.....	63
2.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	65
2.4.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	66
2.4.5. Capacité antioxydante totale (CAT).....	68
2.4.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline.....	69
2.5. Activité antibactérienne.....	71
2.5.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide.....	71
2.5.2. Méthode de microdilution sur milieu liquide (CMI).....	72
2.6. Evaluation de l'activité antifongique.....	74
2.7. Evaluation de l'activité hémolytique.....	75
2.8. Evaluation de l'activité anticholinestérase.....	78
2.8.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE).....	78
3. Les racines de la plantes <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	78
3.1. Dosage des composés phénoliques des racines de la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	78
3.2. Analyse de la RP-HPLC-PDA.....	79
3.3. Spectroscopie RMN <sup>1</sup> H.....	80
3.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	82
3.4.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	82
3.4.2. Piégeage du radical ABTS.....	84
3.4.3. Test de la capacité antioxydante par reduction du cuivre (CUPRAC).....	85
3.4.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	87
3.4.5. Capacité antioxydante totale (CAT).....	88
3.4.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline.....	89
3.5. Activité antibactérienne.....	91
3.5.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide.....	91
3.5.2. Méthode de la microdilution sur milieu liquide.....	92
3.6. Evaluation de l'activité antifongique.....	93
3.7. Evaluation de l'activité hémolytique.....	95
3.8. Evaluation de l'activité anticholinestérase.....	97

#### **Quatrième partie : Discussion générale**

Discussion générale.....	100
--------------------------	-----

#### **Cinquième partie : Conclusion**

Conclusion.....111

**Sixième partie : Références bibliographiques**

Références bibliographiques.....114

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Caractéristiques structurales et activités de divers composés phytochimiques issus de plantes.....	6
<b>Tableau 02:</b> Teneurs en composés phénoliques des extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	57
<b>Tableau 03:</b> Valeurs CI <sub>50</sub> des extraits de plante <i>G. saharae</i> .....	63
<b>Tableau 04:</b> Résultats des CI <sub>50</sub> des extraits de plante <i>G. saharae</i> par la méthode du piégeage du radical ABTS.....	65
<b>Tableau 05:</b> Résultats des A <sub>0,5</sub> des extraits de la plante <i>G. saharae</i> par la méthode CUPRAC.....	66
<b>Tableau 06:</b> Pouvoir réducteur du fer des extraits de plante <i>G. saharae</i> par la méthode FRAP.....	68
<b>Tableau 07:</b> Capacité antioxydante totale des différents extraits de <i>G. saharae</i> .....	69
<b>Tableau 08:</b> Résultats A <sub>0,5</sub> des différentes extraits de la plante <i>G. saharae</i> par la méthode de la phénanthroline.....	70
<b>Tableau 09:</b> Activité antibactérienne des extraits de la plante <i>G. saharae</i> par la méthode de diffusion des disques.....	72
<b>Tableau 10:</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	73
<b>Tableau 11:</b> Diamètres des zones d'inhibition des extraits de la plante <i>G. saharae</i> vis-à-vis des levures testées .....	74
<b>Tableau 12:</b> Concentration Minimale Inhibitrice des extraits de la plante <i>G. saharae</i> vis-à-vis des levures testées .....	75
<b>Tableau 13:</b> Teneurs en composés phénoliques de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	78
<b>Tableau 14:</b> Valeurs CI <sub>50</sub> des extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	83
<b>Tableau 15:</b> Résultats des CI <sub>50</sub> des extraits de plante <i>G. saharae</i> par la méthode du piégeage du radical ABTS.....	85
<b>Tableau 16:</b> Résultats A <sub>0,5</sub> des extraits de plante <i>G. saharae</i> par la méthode CUPRAC.....	86
<b>Tableau 17:</b> Pouvoir réducteur du fer des extraits de plante <i>G. saharae</i> par la méthode FRAP.....	88
<b>Tableau 18:</b> Capacité antioxydante totale des différents extraits de <i>G. glabra</i> .....	88

<b>Tableau 19:</b> Résultats $A_{0,5}$ des différents extraits de la plante <i>G. saharae</i> par la méthode de la phénanthroline.....	90
<b>Tableau 20:</b> Diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines de la plante <i>G. glabra</i> vis-à-vis des souches bactériennes.....	92
<b>Tableau 21:</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> vis-à-vis des bactéries testées.....	93
<b>Tableau 22:</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm des extraits de la plante <i>G. glabra</i> vis-à-vis des levures testées.....	94
<b>Tableau 23:</b> Concentration Minimale Inhibitrice des extraits de la plante <i>G. glabra</i> vis-à-vis des levures testées.....	94
<b>Tableau 23:</b> Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	98
<b>Tableau 24:</b> Pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	98



## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Quelques acides phénols issus de l'acide benzoïque.....	8
<b>Figure 02:</b> Quelques acides phénols issus de l'acide cinnamique.....	8
<b>Figure 03:</b> Structure générale d'un flavonoïde.....	9
<b>Figure 04:</b> Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium.....	10
<b>Figure 05:</b> Structure de la catéchine.....	10
<b>Figure 06:</b> Structure représentative de l'acide tannique.....	11
<b>Figure 07:</b> Structures de quelques proanthocyanidines.....	12
<b>Figure 08:</b> Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes.....	15
<b>Figure 09:</b> Structures des flavonols aglycones.....	16
<b>Figure 10:</b> Structures des flavones apéginine et lutéoline et la vitexine.....	17
<b>Figure 11:</b> Structures des flavan-3-ols monomériques.....	17
<b>Figure 12:</b> Structure chimique de la nicotine.....	20
<b>Figure 13:</b> Structure chimique de la caféine.....	21
<b>Figure 14:</b> Structure de quelques composés terpéniques.....	22
<b>Figure 15:</b> Photos représentant la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	27
<b>Figure 16:</b> Structure de quelques isoflavonoïdes isolées de genre <i>Genista</i> .....	29
<b>Figure 17:</b> Structures de quelques alcaloïdes isolés du genre <i>Genista</i> .....	30
<b>Figure 18:</b> Photos représentant la plante <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	33
<b>Figure 19:</b> Structure de la glycyrrhizine isolée de l'espèce <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. ....	36
<b>Figure 20:</b> Structure de l'acide glycyrrhétique.....	36
<b>Figure 21:</b> Structure de quelques composés de la sous classe des flavonoïdes de <i>G. glabra</i> L. .....	37
<b>Figure 22 :</b> Schéma récapitulatif des procédés d'extractions utilisé.....	42
<b>Figure 23:</b> Mécanisme réactionnel du radical libre DPPH.....	46
<b>Figure 24:</b> Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>•</sup> .....	47
<b>Figure 25:</b> La réaction CUPRAC et le chromophore, neocuproïne chélate les cations.....	48
<b>Figure 26:</b> Réaction de la 1,10 phénanthroline avec le Fe <sup>3+</sup> après son oxydation en Fe <sup>2+</sup> par un antioxydant.....	50
<b>Figure 27:</b> Mécanisme d'action de la méthode d'Ellman.....	53
<b>Figure 28:</b> Chromatogramme de la RP-HPLC-PDA de l'extrait chloroformique de la plante <i>G. saharae</i> .....	58

<b>Figure 29:</b> Chromatogramme de la RP-HPLC-PDA de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>G. saharae</i> .....	58
<b>Figure 30:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction G4 de l'extrait chloroformique.....	59
<b>Figure 31:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C de la fraction G4 de l'extrait chloroformique.....	60
<b>Figure 32:</b> Structure de la génistéine isolée de la fraction G4 de l'extrait chloroformique....	60
<b>Figure 33:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.....	62
<b>Figure 34:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	62
<b>Figure 35:</b> Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.....	64
<b>Figure 36:</b> Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	64
<b>Figure 37:</b> Capacité de réduction du cuivre des standards BHA et BHT.....	65
<b>Figure 38:</b> Capacité de réduction du cuivre des extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	66
<b>Figure 39:</b> Pouvoir réducteur du fer des standards.....	67
<b>Figure 40:</b> Pouvoir réducteur du fer des extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	67
<b>Figure 41:</b> Capacité antioxydante totale de l'acide ascorbique.....	68
<b>Figure 42:</b> Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les standards BHA et BHT.....	69
<b>Figure 43:</b> Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les extraits de la plante <i>G. saharae</i> .....	70
<b>Figure 44:</b> Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	76
<b>Figure 45:</b> Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	76
<b>Figure 46:</b> Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	77
<b>Figure 47:</b> Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait n-butanol de la partie aérienne de la plante <i>G. saharae</i> .....	77
<b>Figure 48:</b> RP-HPLC-PDA chromatogramme de l'extrait chloroformique des racines de la plante <i>G. glabra</i> .....	79

<b>Figure 49:</b> RP-HPLC-PDA chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante <i>G. glabra</i> .....	80
<b>Figure 50:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de la glabridine extraite de la fraction L4 de l'extrait chloroformique.....	81
<b>Figure 51:</b> Structure de la glabridine isolée de la fraction L4 de l'extrait chloroformique....	81
<b>Figure 52:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	83
<b>Figure 53:</b> Evolution des pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des extraits de la plante <i>G. glabra</i> .....	85
<b>Figure 54:</b> Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits de la plante <i>G. glabra</i> .....	86
<b>Figure 55:</b> Pouvoir réducteur du fer des extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	87
<b>Figure 56:</b> Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i> .....	89
<b>Figure 57:</b> Effet des différentes concentrations de l'extrait brut des racines de la plante <i>G. glabra</i> sur la fuite d'hémoglobine.....	95
<b>Figure 58:</b> Effet des différentes concentrations de l'extrait chloroformique des racines de la plante <i>G. glabra</i> sur la fuite d'hémoglobine.....	96
<b>Figure 59:</b> Effet des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante <i>G. glabra</i> sur la fuite d'hémoglobine.....	96
<b>Figure 60:</b> Effet des différentes concentrations de l'extrait n-butanol des racines de la plante <i>G. glabra</i> sur la fuite d'hémoglobine.....	97

## *Liste des abréviations*

**ABTS** : 2,2'-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique

**AChE** : Acetylcholinesterase

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**AmB** : Amphotéricine B

**APG III** : Groupe Phylogénique des Angiospermes III

**ATTC** : American Type Culture Collection

**BChE** : Butyrylcholinesterase

**BHA** : Hydroxyanisole Butylé

**BHT** : Hydroxytoluène Butylé

**CCM**: Chromatographie sur Couche Mince

**CI<sub>50</sub>**: Concentration à 50%

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice

**CUPRAC** : Cupric Reducing Antioxydant Capacity

**DPPH**: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxydant Power

**Gent**: Gentamicine

**IP**: Institut Pasteur

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**RMN <sup>13</sup>C**: Résonance Magnétique Nucléaire du carbon

**RMN <sup>1</sup>H**: Résonance Magnétique Nucléaire du proton

**RP-HPLC-PDA** : Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography- Photo Diode Array

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute

**UFC** : Unité Formant Colonie

---

# *Introduction*

---

Au cours des dernières années, la recherche de nouvelles substances présentant des activités curatives est devenue une nécessité. À travers le monde, la médecine traditionnelle forme le mode principal de prestation de soin de santé ou un complément à ce dernier. En effet, l'OMS estime qu'environ 80% de la population africaine dépend encore de la médecine traditionnelle en réponse à leurs besoins de santé. Alors que, dans les pays industrialisés, c'est sous forme de thérapies complémentaires que les plantes sont utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population ont eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base des plantes **(OMS, 2002)**.

Les substances issues des plantes ont constitué et constituent encore la base de nombreuses soins thérapeutiques dans plusieurs pays, et de nombreux principes actifs ont été isolés à partir des plantes médicinales. Les recherches scientifiques antérieures ont conduit à l'isolement de la morphine à partir du pavot (*Papaver somniferum*), la quinine et la quinidine à partir de *Cinchona* spp., **(Hartmann, 2007)**.

À cet effet, les savoirs et les pratiques traditionnels font l'objet d'un intérêt croissant de la part de la recherche, notamment pour l'industrie du médicament, qui grâce à l'étude des remèdes ancestraux continue à découvrir de nouvelles molécules actives dont la digoxine du *Digitalis* spp., la vincristine et la vinblastine du *Catharanthus roseus*, l'atropine issue d'*Atropa belladonna* et de l'artémisinine isolée à partir d'*Artemisia vulgaris*. Ces composés furent en grande partie responsables des progrès de la médecine au XX<sup>ème</sup> siècle **(Rates, 2001)**.

Il est évident qu'une plante contient plusieurs milliers de substances différentes et on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal. Ces substances tels les alcaloïdes, les composés phénoliques et les essences ne sont souvent que les produits secondaires de la plante qui sont généralement l'œuvre d'une réponse à des stimuli externes ce qui explique leurs utilisations par l'homme à des fins thérapeutiques et industrielles dont les techniques d'extraction, séparation et détermination de la structure ont été développées pour comprendre leur variation structurale afin d'identifier les composés biologiquement actifs pour l'usage médicinal et l'élaboration des médicaments **(Fabricant et Farnsworth, 2001)**.

Ainsi, le règne végétal avec ses 400 000 à 500 000 espèces représente une source inépuisable de molécules bioactives et le potentiel des plantes comme sources de nouveaux médicaments reste immense. On estime qu'environ 1/3 des médicaments mis sur le marché contiennent au moins une substance végétale **(Newman et Cragg, 2012)**.

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémique (**Quezel et Santa, 1963**) reste très peu explorée sur le plan phytochimique et pharmacologique. Le Sahara Algérien dispose d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constituée de plus de 1200 espèces (**Ozenda, 1991**), dont près de 162 espèces endémiques sont recensées dans le Sahara septentrional seul et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes.

Parmi les plantes sahariennes, se trouve la famille des fabacées (papilionacées) qui représente la troisième plus grande sous famille par rapport aux plantes à fleurs, elle est composée de 650 genres et d'environ 18000 espèces (**Hanganu et al., 2016**), et contribue activement dans le domaine alimentaire, agronomique, industriel, pharmaceutique vu le nombre important de ces genres et espèces.

Dans ce contexte, le présent travail est consacré à l'étude du profil phytochimique de 04 extraits des deux *fabacées* de la flore locale d'Algérie: *Genista saharae* (Coss. & Dur.) (El Merkh en arabe) et *Glycyrrhiza glabra* L. (Ark esousse en arabe). Ainsi que, l'évaluation leurs activités biologiques *in-vitro* à savoir :

- L'activité antioxydante;
- l'activité antibactérienne;
- L'activité antifongique;
- L'activité hémolytique;
- L'activité anticholinestérase.

---

*Partie bibliographique*

---

## Chapitre 1. Phytothérapie et métabolites secondaires

### 1. Généralités

Le Sahara est un endroit caractérisé par un climat très chaud et très sec où il ne pleut presque jamais. Les propriétés du sol sont sableuses, salines, peu profondes et déficientes en éléments nutritifs, ce qui constitue des facteurs limitant de la croissance des espèces végétales.

Cependant, malgré ces conditions défavorables, les régions sahariennes dévoilent une grande variété floristique particulièrement d'arbustes, ou des sous-arbustes fortement adaptées et résistantes aux facteurs environnementaux. Ces espèces sont réputées pour être un réservoir naturel de biomolécules actives et efficaces contre plusieurs maladies.

Parmi ces plantes se trouve la famille des fabacées qui ont une attribution dans la durabilité de cet écosystème (**Palici *et al.*, 2015 ; Chaïch *et al.*, 2016**). Cette famille constitue la troisième plus grande famille par rapport aux plantes à fleurs (**Wojciechowski *et al.*, 2004**), jouant ainsi un rôle important dans plusieurs domaines tels que le domaine alimentaire, agronomique, industriel et pharmaceutique.

Les espèces de cette famille sont très diversifiées, ce qui permet à certaines plantes d'être considérées comme de nouvelles sources de molécules bioactives pour certaines pathologies.

### 2. La phytothérapie

Les plantes médicinales deviennent de plus en plus populaires dans les pays développés en raison des effets secondaires suscités par les médicaments conventionnels. Il est largement admis que les préparations à base de plantes, étant «naturelles», sont intrinsèquement inoffensives. Basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement, la phytothérapie est le traitement par des plantes dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou sur un ou plusieurs symptômes. Les préparations utilisées ont des doses pondérales bien étudiées (**Goetz, 2013**).

La particularité de ces plantes réside dans leur capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. À côté des métabolites primaires, elles accumulent des métabolites dits secondaires.

Ces métabolites secondaires, dépassant actuellement 200000 substances identifiées, appartiennent à trois grandes classes : les composés phénoliques, les composés azotés dont les alcaloïdes et les composés terpéniques. Chacune de ces classes renferme une très grande

diversité de composés et possèdent une très large gamme d'activités en biologie (Bruneton, 1993 ; Vermerius et Nicholson, 2006). Le **tableau 01** résume la diversité structurelles et les activités pharmacologiques des métabolites secondaires des plantes

**Tableau 01** : Caractéristiques structurelles et activités de divers composés phytochimiques issus de plantes.

<b>Phytoconstituants</b>	<b>Exemple (s)</b>	<b>Fonction (s) thérapeutique (s)</b>	<b>Références</b>
<b>Acide phénoliques</b>	Acide vanillique, Acide gallique, Acide cinnamique, Acide <i>p</i> -coumarique	Antimicrobien, Anthelminthique, Antidiarrhéique	<b>Cowan, 1999</b> <b>Mute, 2009</b>
<b>Quinones</b>	Hypericine	Antimicrobien	<b>Cowan, 1999</b>
<b>Flavones</b>	Acacétine, Apigénine, Baicaléine	Anti-inflammatoire, Anticancéreux, Antiviral	<b>Kumar et al., 2010</b> <b>Patel et al., 2010</b>
<b>Flavonols</b>	Catéchine, Rutin, Rhamnétine	Antioxydant, Anti-inflammatoire	<b>Sharma et al., 2010</b>
<b>Flavanones</b>	Eriodictyol, Naringinine, Sakuranétine	Hypotenseurs, Antitumorales, Vasodilatatoires	<b>Sutar et al., 2010</b>
<b>Tannins</b>	Ellagitannin	Antioxydants, antiparasitaires	<b>Vidyadhar et al., 2010</b>
<b>Lignanes</b>	Laricirésinol, Calopoptine	Anti-inflammatoires, Analgésiques, Antiparasitaires	<b>Wang et al., 2010</b>
<b>Terpénoïdes</b>	Totarol, Capsaïcine	Antidiarrhéique	<b>Kumar et al., 2010</b>
<b>Alcaloïdes</b>	Berbérine, Pipérine	Antimicrobien, Anthelminthique, Antidiarrhéique	<b>Wang et al., 2010</b>
<b>Saponines</b>	Spirostanol, Solanine	Antidiarrhéique	<b>Patel et al., 2010</b>

### 3. Classification des métabolites secondaire

#### 3.1. Les composés phénoliques

##### 3.1.1. Les polyphénols

Ce sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal.

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, et ayant outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Dangles *et al.*, 1992 ; Hagerman *et al.*, 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les polyphénols rassemblent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique substitué avec un ou plusieurs groupements hydroxyles (Bamforth, 2000). Ils peuvent aller des molécules simples, comme les acides phénoliques aux composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 Dalton, comme les tannins (Hagerman *et al.*, 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Comme la majorité des métabolites secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant:

- ❖ Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries;
- ❖ Dissuasion alimentaire (d'où le phénomène d'allélopathie): certaines plantes produisent des substances pour inhiber la croissance d'autres plantes;
- ❖ Attraction des pollinisateurs: les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple: certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les insectes mâles.
- ❖ Protection contre les rayonnements UV;
- ❖ Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes, ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple: les polyphénols des palargoniums (Sasaki et Takahashi, 2002).

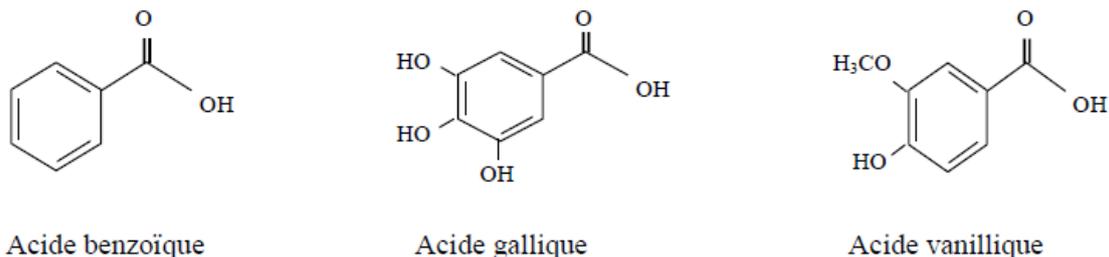
### 3.1.1.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols se caractérisent par la présence d'au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles attachés. Plus de 8000 structures phénoliques ont été répertoriées et elles sont largement répandues dans tout le règne végétal (**Strack, 1997**). Elles peuvent être classées en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone et se trouvent généralement conjuguées à des sucres et acides organiques.

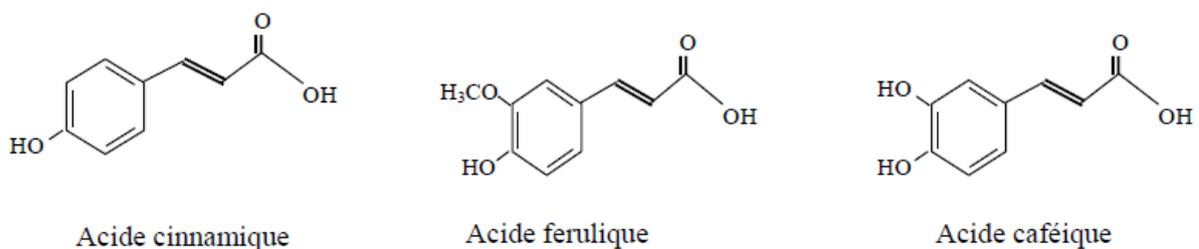
#### 3.1.1.1.1. Les acides phénols

Les acides phénols ou acides phénoliques, ont une fonction acide et une fonction phénol. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils sont divisés en deux catégories:

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (**Haslam et Cai, 1994**) (**Figure 01**) et les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique qui sont le plus souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide ferulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique (**Haslam et Cai, 1994 ; Bruneton, 2009**) (**Figure 02**).



**Figure 01:** Quelques acides phénols issus de l'acide benzoïque (**Bruneton, 2009 ; Pawlowska, 2006**).

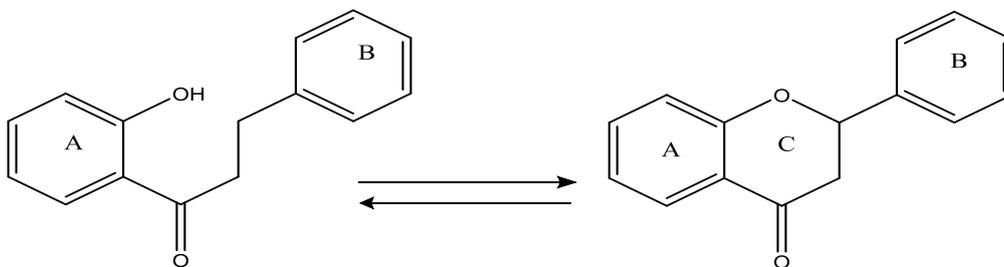


**Figure 02:** Quelques acides phénols issus de l'acide cinnamique (**Bruneton, 2009 ; Pawlowska, 2006**).

### 3.1.1.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 carbones, dont deux cycles aromatiques à C6 (A et B) reliés entre eux par un pont à trois atomes de carbone C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (**Figure 03**). Ils sont les plus nombreux des composés phénoliques et se trouvent dans tout le règne végétal (**Harborne, 1993**). Ils sont présents en forte concentration dans l'épiderme des feuilles et la peau des fruits et ils ont des rôles importants et variés en tant que métabolites secondaires. Selon leurs structures les flavonoïdes se divisent en 06 groupes: Flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, lié à des oses et autres substances (**Heller et Forkmann, 1993**).



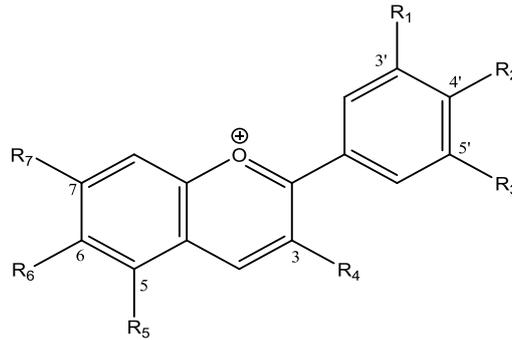
**Figure 03:** Structure générale d'un flavonoïde (**Heller et Forkmann, 1993**).

### 3.1.1.1.3. Les anthocyanes

Les anthocyanes donnent des couleurs très variées: bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. Ces molécules ont comme les flavonoïdes un squelette de base en 15 carbones formé de deux cycle A et B et d'un hétérocycle C. Leur caractéristique principale est que cet hétérocycle est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune: le cation flavylum ou 2 phenyl1-benzopyrylium (**Figure 04**) (**Heller et Forkmann, 1993**). Les anthocyanes principaux sont:

- ❖ La pélagonidine: qui a un OH en position 4' et donne une couleur rouge orangée;
- ❖ La cyanidine: qui a deux OH en position 3' et 4' ou en 4', 5. Elle donne une couleur rouge magenta;
- ❖ La delphinidine: qui est substituée par trois OH en position 3',4',5' et donne une couleur mauve.

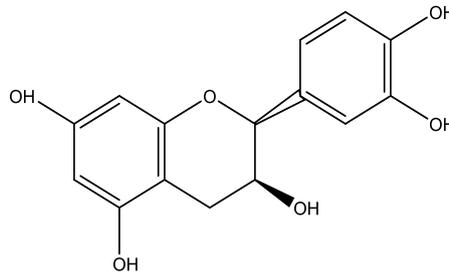
Les anthocyanes forment également des conjugués avec des hydroxycinnamates et des acides organiques tels que les acides malique et acétique.



**Figure 04:** Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrylium  
(Heller et Forkmann, 1993).

#### 3.1.1.1.4. Les flavanes

Les flavanes sont sous forme de monomères (ex: la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères..... de catéchine). Ils existent sous forme de plusieurs stéréoisomères provenant de deux carbones asymétriques: C2 et C3. Les flavanes sont très répandus dans les écorces végétales (**Figure 05**) (Jakupovic *et al.*, 1988).



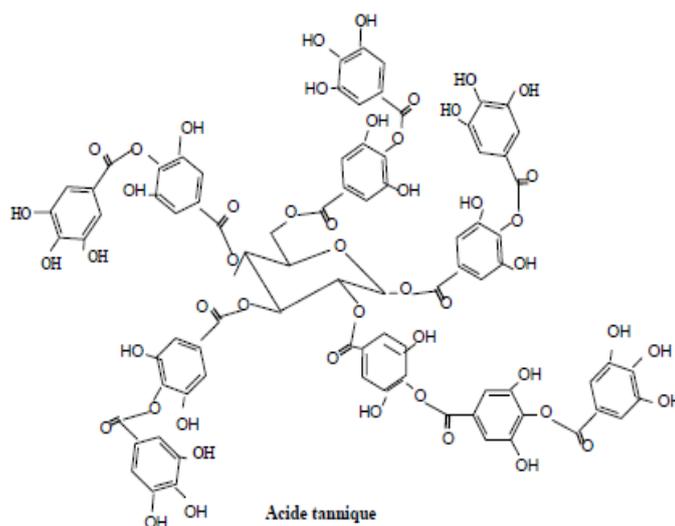
**Figure 05:** Structure de la catéchine (Jakupovic *et al.*, 1988).

#### 3.1.1.1.5. Les tannins

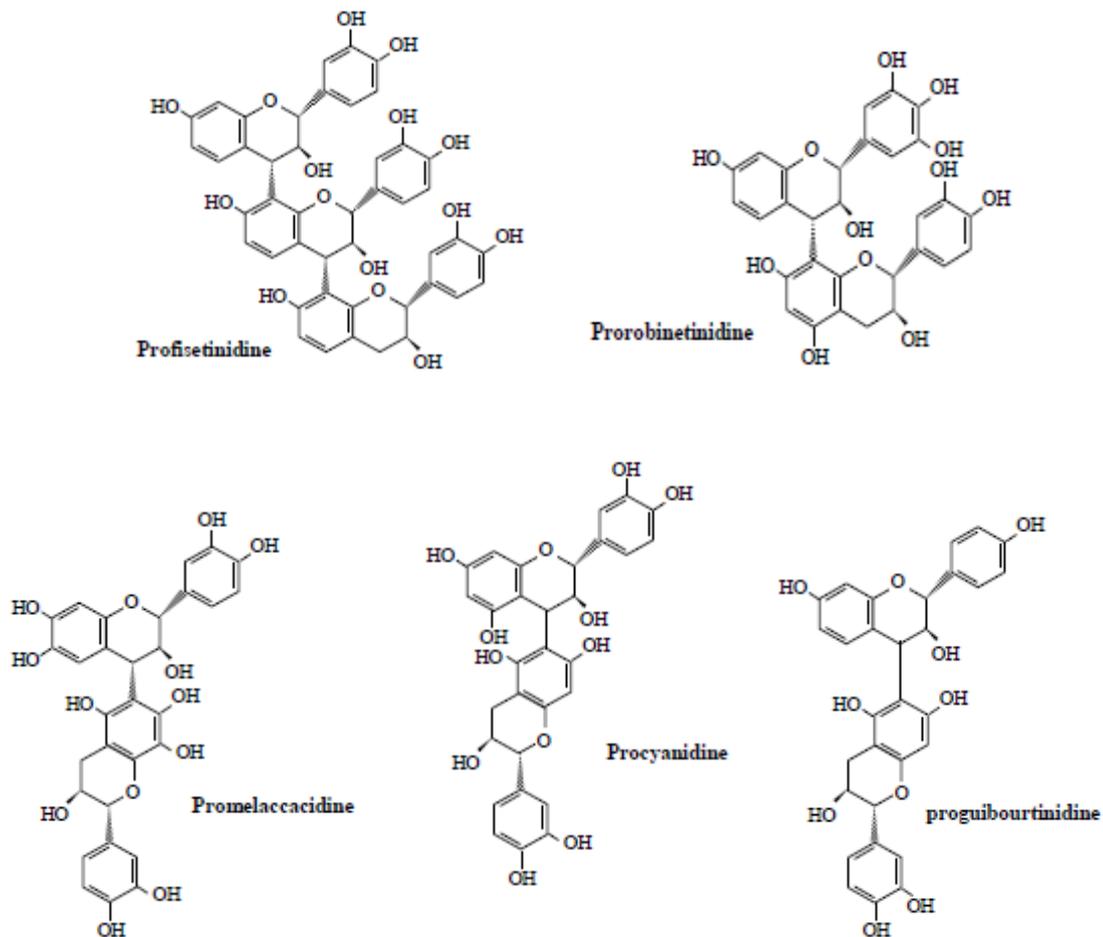
Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux:

- ❖ Les tannins hydrolysables: Ce sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (**Figure 06**) (Sarni-Manchado et Chynier, 2006).
- ❖ Les tannins condensés (proanthocyanidines): Ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 désoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols (**Figure 07**). Les polymères donnent une

structure hérissée d'OH phénoliques capables de former des liaisons stables avec les protéines (De Matta *et al.*, 1976 ; Sarni-Manchado et Chynier, 2006).



**Figure 06:** Structure représentative de l'acide tannique (Gorger *et al.*, 1994 ; Bruneton, 1999).



**Figure 07:** Structures de quelques proanthocyanidines (Seigler *et al.*, 1986 ; Köing *et al.*, 1994 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

### 3.1.1.2. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont:

#### 3.1.1.2.1. La voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'erythrose-4-phosphate et le phospho-énol pyruvate sont produits par les hydrates de carbone lors de leurs dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (Haslam et Cai, 1994 ; Dewick, 1995).

Il est à noter que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

#### 4.1.1.2.2. La voie de l'acide malonique

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA qui donnent à son tour le malonnate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques obtenues par condensation répétée d'unité "Acétate" qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Fleeger et Flipse, 1964 ; Richter, 1993**).

#### 3.1.2. Les flavonoïdes

L'appellation "flavonoïdes" rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette à base de 15 atomes de carbone. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié ou plus de 4000 flavonoïdes ont été déjà identifiés (**Harborne, 1989 ; Sarni-Manchando et Cheynier, 2006**).

Le terme flavonoïde dérive de la couleur jaune en latin (*flavus*). D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration; au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (**Wilson, 1987**). Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc. Aussi ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (**Fritch et Griesbach, 1975**). Certains sont plus spécifiques de certains tissus (ex: les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs).

##### 3.1.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Le squelette à 15 atomes de carbone est formé de deux cycles benzéniques C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3, on parle donc de chalcones. Ces derniers représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (**Heller et Forkmann, 1993 ; Griesbach, 1996 ; Hashimoto et al., 2004**).

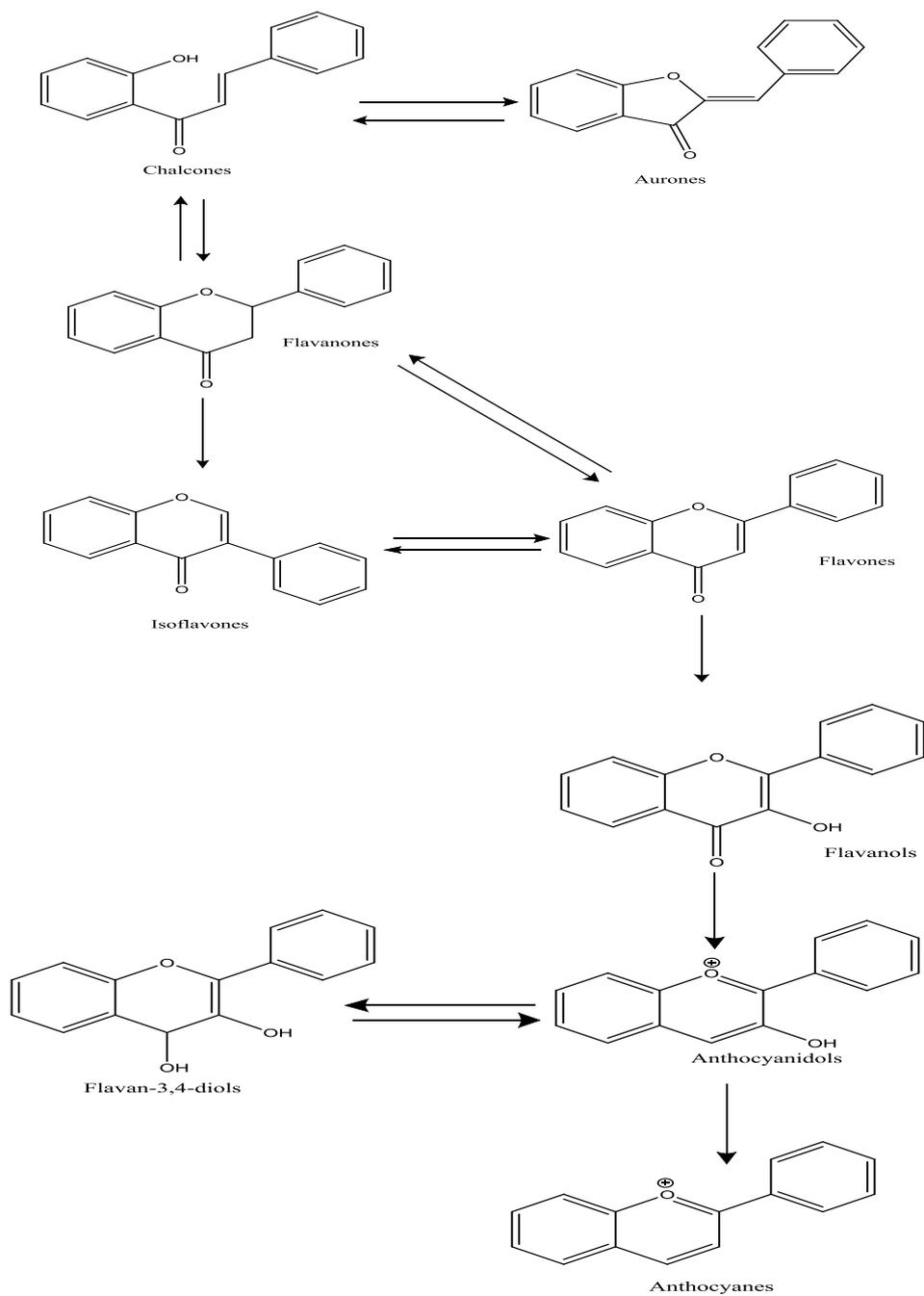
La chalcone est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone: naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones: apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)-dihydrokaempférol respectivement (**Figure 08**).

Les deux enzymes citées fonctionnent différemment: la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se

métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3,4'diol et leucoanthocyanidol respectivement (**Ono *et al.*, 2006 ; Seeram *et al.*, 2006**).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles.....) sur les deux cycles aromatiques et la chaîne en C3 intermédiaire ou l'hétérocycle.

À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées.



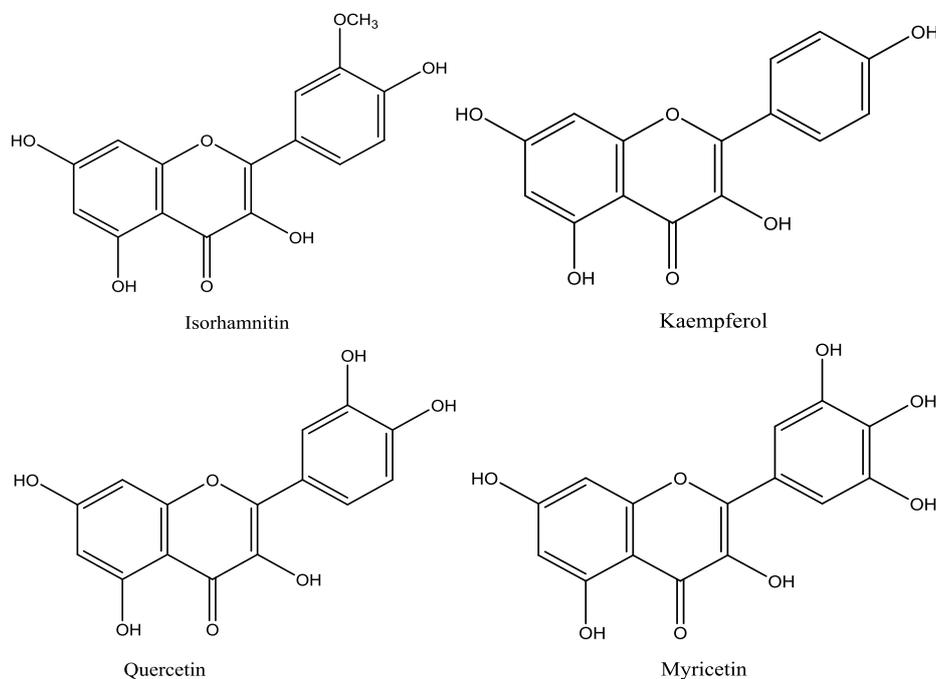
**Figure 08:** Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (Morreel *et al.*, 2006).

### 3.1.2.2. Classification des flavonoïdes

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit:

#### 3.1.2.2.1. Flavonols

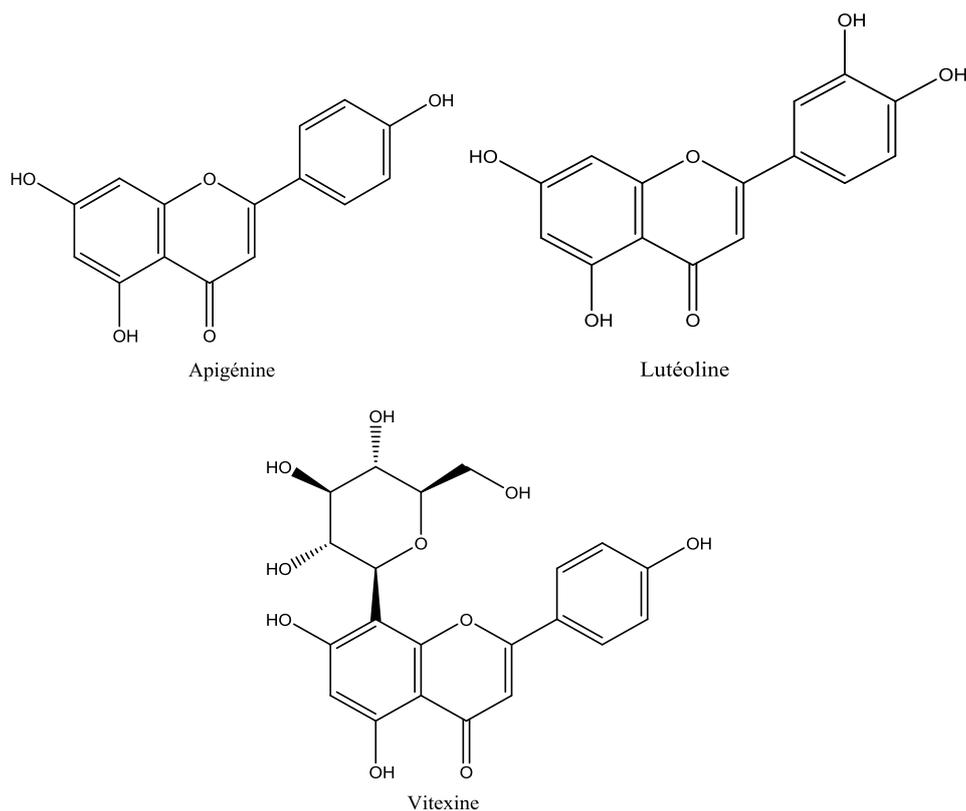
Les flavonols sont sans doute les flavonoïdes les plus répandus, étant donné qu'ils sont repartis dans tout le règne végétal à l'exception des champignons et des algues. Ces derniers se trouvent le plus souvent sous forme d'O-glycoside et la conjugaison se produit généralement à la position 3 du cycle C mais des substitutions peuvent également se produire aux positions 5, 7, 4', 3' et 5' du cycle carboné (**Figure 09**). Les flavonols se distinguent par un OH en position C3 (**Morreel et al., 2006**).



**Figure 09:** Structures des flavonols aglycones (**Strack et Wray, 1992**).

#### 3.1.2.2.2. Flavones

Les flavones ont une relation structurale très proche des flavonols. Bien que les flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine, ont des substitutions de cycle A et C, ils manquent d'oxygénation en C3. Une large gamme de substitutions est également possible avec les flavones, y compris l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C-alkylations et la glycosylation. La plupart des flavones se présentent sous forme de 7-O-glycosides. Contrairement aux flavonols (**Crozier et al., 2006**).

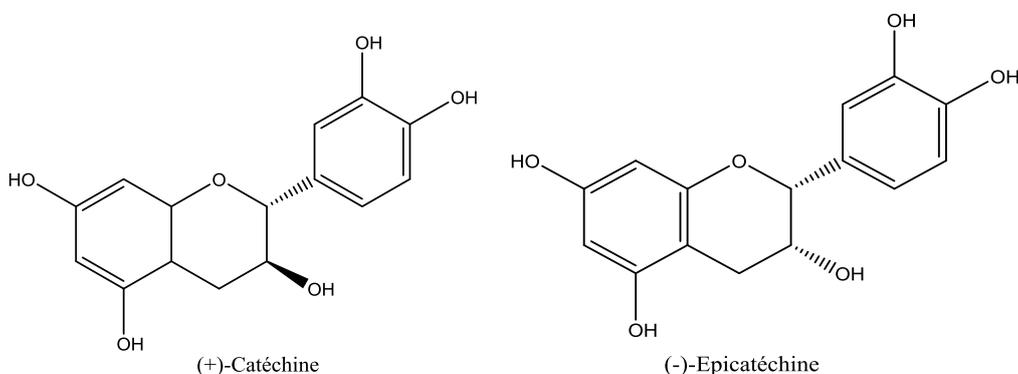


**Figure 10:** Structures des flavones apigénine et lutéoline et la vitexine.

### 3.1.2.2.3. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont la sous-classe la plus complexe des flavonoïdes, allant de simples monomères (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, jusqu'aux proanthocyanidines oligomériques et polymériques, appelées également tannins condensés.

Les flavan-3-ols, les proanthocyanidine et les flavanones ont un élément C3 saturé dans le cycle C hétérocyclique (Clifford, 1986).



**Figure 11:** Structures des flavan-3-ols monomériques.

#### 3.1.2.2.4. Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes sont caractérisées par la fixation du cycle B en position C3 plutôt qu'en C2. On les trouve presque exclusivement dans les légumineuses dont les concentrations les plus élevées (**US département of Agriculture, Agricultural Research Service, 2002**).

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, quelques fois dans les feuilles et les fleurs (**Iwashina, 2000**). C'est la famille des flavonoïdes la plus étudiée pour ses propriétés pseudo-œstrogénique. Les isoflavonoïdes sont impliquées dans la signalisation symbiotique, dans la réaction de défense et présentant ainsi un grand intérêt pharmaceutique (**Dixon, 1999**).

#### 3.1.2.2.5. Anthocyanidines

Les anthocyanidines ou anthocyanidols sont une sous-classe des flavonoïdes au sens large. Ils sont très répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments naturels retrouvés essentiellement dans les tissus des fruits et des fleurs où ils sont responsables des couleurs rouges, bleu et pourpre. En outre, ils se trouvent également dans les tissus des feuilles, tiges, graines et racines. Ils sont impliqués dans la protection des plantes contre la lumière excessive et ils jouent également un rôle important dans l'attraction des insectes pollinisateurs.

Les anthocyanidines les plus communs sont la pélargonidine, la cyanidine, la delphinine, péonidine, la petunidine et la malvidine. Dans les tissus végétaux, ces composés sont conjugués à des sucres appelés anthocyanine. Les anthocyanines sont conjugués à leurs tour avec les hydroxycinnamates et les acides organiques tels que l'acide malique et acétiques (**Crozier et al., 2006**).

#### 3.1.2.2.6. Flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en position 2,3 et la présence d'un centre chirale en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin (**Fowler et Koffas, 2009**).

Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont répandues dans plusieurs familles, en particulier les *Asteraceae*, les *Rubiaceae*, les *Rutaceae* et les *Luguminoseae*. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines et les écorces de racines en particulier chez les *Leguminoseae* (**Iwashina, 2000**).

### 3.1.1.3. Activités biologiques des polyphénols

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque de cancers, d'affection cardiovasculaire et d'autres maladies chroniques. D'après **Block et al., (1992)** une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de cancer jusqu'à 50%.

Leur intérêt comme antioxydant se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires (**Fushs, 1998**).

Parmi les flavonoïdes dont les activités sont reconnues, on a des flavonols comme la quercétine, le kaempférol, la merycétine et des flavones comme l'apigénine et la lutéoline. Ces composés existent dans plusieurs légumes et fruits dont les pommes, les oignons...etc. (**Hertog et al., 1993**).

Un nombre considérable d'études ont mis en évidence diverses activités biologiques des polyphénols: antioxydante, antiradicalaire (**Cotelle et al., 1992 ; Gutteridg et Halliwell, 1994 ; Néve, 2002**), anti-inflammatoire (**Emin et al., 1994 ; Nakajima et al., 2001**), antihypertenseur (**Elbl et Wagner, 1991**), anticancéreux (**Gordon, 1991**), antiallergique (**Matsuda et al., 1991**), antivirale (**Shahat et al., 2002**) et possèdent une activité phyto-ostrogénique (**Dixon, 2004**).

Les isoflavones, sont des molécules qu'on trouve en abondance dans les espèces des légumineuses et en particulier dans les graines de soja (**Kaufman et al., 1997 ; Franke et al., 1999**). En effet, il a été montré que 1g de poudre de soja renferment environ 800 µg de daidzéine et plus de 500 µg de génistéine (**Dixon et Ferreira, 2002**). Ces molécules, appelées aussi phyto-œstrogènes, ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche et ont prouvé leur action sur les risques de certains cancers et maladies cardiovasculaires (**Lee et al., 1991 ; Clackson et al., 1995**).

### 3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe diversifié de composés d'origine naturelle, retrouvés chez 20% des espèces végétales. Ils dérivent principalement des acides aminés et sont caractérisés par le poids moléculaire faible et la présence de l'azote. Ils constituent une classe de composés organiques hétérocycliques azotés plus ou moins basiques présentant une grande diversité structurale (**Muniz, 2006 ; Ameyaw et Duker-Eshun, 2009**).

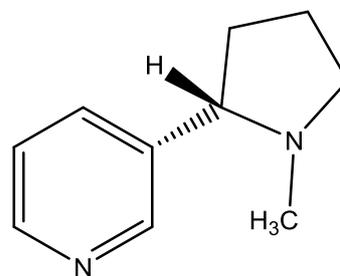
Ils sont produit normalement dans la plante sous forme de sels ou de bases libres ou en combinaison (avec les tanins en particulier) (**Bruneton, 1999 ; Kashani, 2012**). En tant que métabolites secondaires, les alcaloïdes jouent un rôle défensif dans la plante contre les herbivores et les agents pathogènes.

En raison de leur puissante activité biologique, bon nombre des 12 000 alcaloïdes connus ont été exploités comme produits pharmaceutiques, stimulants, stupéfiants et poisons (**Wink, 1993**). Ils sont dotés à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées (**El Tahchy, 2010**). Ils sont utilisés dans la prévention contre plusieurs maladies : cancer, maladies cardiovasculaires, les infections virales...etc. (**Namdeo, 2007**).

### 3.2.1. Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est basée sur plusieurs critères, à savoir l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques (**Hesse, 2002**). Une autre classification a été rapportée par **Bennett et Wallsgrove, (1994)** où les alcaloïdes ont été divisés en trois grandes classes en fonction des précurseurs et la structure finale:

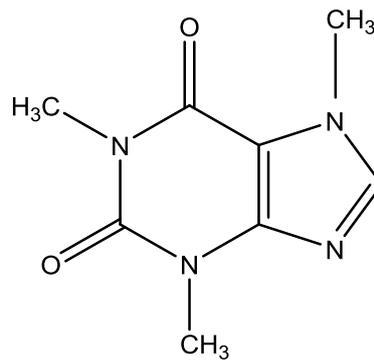
- **Alcaloïdes vrais** : Ils dérivent des acides aminés, basiques et contiennent l'azote dans l'hétérocycle, par exemple la nicotine et l'atropine (**Figure 12**) ;



Nicotine

**Figure 12:** Structure chimique de la nicotine (**Rodney et al., 2000**).

- **Pseudo-alcaloïdes** : Ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, ils sont basiques mais ils ne dérivent pas des acides aminés, par exemple la caféine et la solanidine (**Figure 13**) ;



Caféine

**Figure 13:** Structure chimique de la caféine (Rodney *et al.*, 2000).

- **Proto-alcaloïdes :** Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés.

### 3.2.2. Biosynthèse des alcaloïdes

La biosynthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. La basicité de la plupart de ces alcaloïdes impose leur compartimentation dans les vacuoles cellulaires. Leur synthèse s'effectue le plus souvent au niveau des sites précis. Ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage (Bruneton, 1999 ; Ríos et Recio, 2005).

L'ornithine et la lysine, les acides diamminés, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, acides aminés aromatiques sont le point de départ de la synthèse de nombreux alcaloïdes. La première étape consiste dans tous les cas à la décarboxylation des acides aminés par des décarboxylases spécifiques. La tyrosine et la phénylalanine, composés à l'origine du noyau aromatique sont les précurseurs d'importants groupes des alcaloïdes isoquinoléiques (Bruneton, 1999).

### 3.2.3. Activités biologiques des alcaloïdes

Les propriétés biologiques des alcaloïdes sont aussi variées que leurs structures. Elles sont bénéfiques dans le traitement de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain (Muniz, 2006). Les alcaloïdes agissent au niveau du système nerveux central comme antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulant (strychnine, caféine). Ils peuvent être utilisés comme des antitumoraux et antipaludiques (Bruneton, 1999).

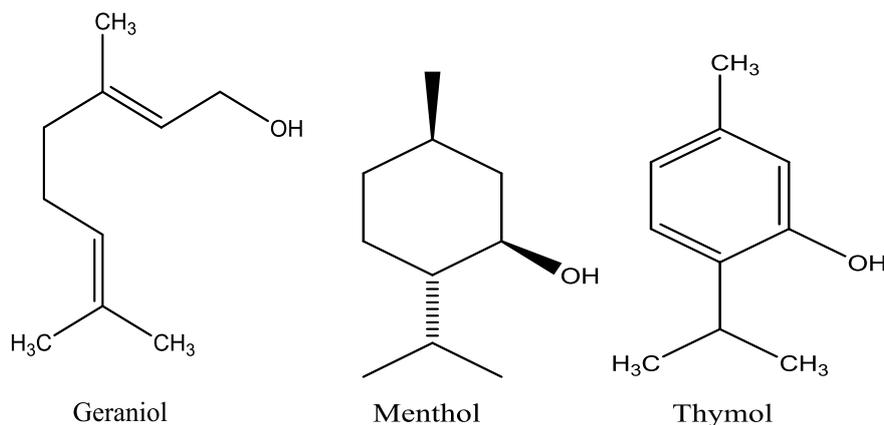
Les alcaloïdes possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes (Karou, 2006).

### 3.3. Les terpénoïdes

Les terpènes, ou isoprénoïdes, sont l'une des classes de métabolites les plus diverses. Le dictionnaire des produits naturels a répertorié plus de 30 000 terpénoïdes, principalement d'origine végétale, englobant les arômes et les parfums, les antibiotiques, les hormones végétales (**Buckingham, 2004**). Bien que les structures chimiques finales des terpènes soient aussi diverses que leurs fonctions, tous les terpènes sont dérivés d'un assemblage séquentiel de blocs de construction moléculaires dont chacun consiste en une chaîne ramifiée de cinq atomes de carbone (**Dewick, 2001**).

La classification des terpènes est issue de la condensation d'unité isoprénique d'un nombre variable pour donner les monoterpènes ( $C_{10}$ ), sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), diterpènes ( $C_{20}$ ), triterpènes ( $C_{30}$ ), tetraterpènes ( $C_{40}$ ) (**Mebarki, 2010**).

Cette classe a des intérêts biologiques importants et elle est utilisée dans les produits pharmaceutiques, ainsi comme colorants alimentaires, antibactériens, antiviraux, arômes et parfums (**Ayad et al., 2008**).



**Figure 14:** Structure de quelques composés terpéniques.

## Chapitre 2. Famille des *Fabaceae*

### 1. Généralités

Les *Fabaceae* constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (**Wojciechowski et al., 2004**). La famille des *Fabaceae* (*faba*, fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuse sous laquelle cette famille est plus connue. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (**Dupont et al., 2007**).

Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides et semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considéré comme une adaptation aux variations climatiques imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuse-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines (**Wojciechowski et al., 2004**).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leur fibres, comme combustible, pour leur bois, et leur utilisation en médecine comme source de composés thérapeutiques (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) (**Wojciechowski et al., 2004**).

### 2. Caractères botaniques de la famille

Les plantes de cette famille possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, cette famille est caractérisée par de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles de cette famille présentent également une évolution morphologique.

#### 2.1. Appareil végétatif

Les **racines** sont également pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote (**Dupont et al., 2007**).

Les **feuilles** sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant quelques évolutions sont notées: la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des

épinés (robinier faux-acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), le nombre de folioles peut être de type palmée (lupin).

## 2.2. Appareil reproducteur

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Toutes les *Fabaceae* possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité. Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, exalbuminée, qui est souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme: l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graine de soja), des protéines (graine de soja).

## 2.3. Phylogénie

L'étude phylogénétique de cette famille a été initiée avec le gène chloroplastique *rbcL*, (RuBisCo L) confirmant l'origine monophylétique de cette famille (**Wojciechowski et al., 2004**). Les *Fabaceae* peuvent être réparties en 4 sous-familles selon l'Angiosperm Phylogeny Group **APG III, (2009)**

- La sous-famille de Bauhinoïdes, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- La sous-famille des *Mimosoideae*
- La sous-famille des *Caesalpinoideae*
- La sous-famille des *Papilionoideae* ou *Faboideae* comprenant le genre *Genista*.

### 2.3.1. La sous-famille des *Papilionoideae*

La sous-famille des *Papilionoideae* est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille, 467 genres et 13860 espèces (**Wojciechowski et al., 2004**). On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotique, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

#### 2.3.1.1. Caractères botaniques

Il s'agit d'une famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composés pennées, à celui de ses fleurs, à corolle dite « en papillon » et par ses fruits appelés gousse (**Dupont et al., 2007**). Traditionnellement, les *Papilionoideae* ont été caractérisées par des traits qui sont considérés comme des

synapomorphies de la sous-famille (**Wojciechowski et al., 2004**). Les éléments les plus caractéristiques concernant la fleur des *Papilionoideae* sont:

Les **fleurs** sont cyclisées, hermaphrodites et fortement zygomorphes par la corolle.

La **corolle**, à symétrie bilatérale, présente une forme dite « papilionacée » c'est-à-dire qu'elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon.

L'**androcée** compte six étamines qui peuvent être libres ou soudées. Elles s'unissent le plus souvent par leurs filets, formant un tube autour du carpelle.

### 2.3.1.2. Phylogénie

Du point de vue phylogénétique, la sous-famille des *Papilionoideae* a été étudiée à partir du locus *rbcL* et la région *trnL-F*, puis plus récemment à partir du gène *matK*<sup>8</sup> (**Wojciechowski et al., 2004**), ce qui a confirmé l'origine monophylétique de *Papilionoideae*.

Les *Papilionoideae* peuvent être divisées en 07 clades selon les relations phylogénétiques établies à partir du gène plastidique *matK* :

- Les Dalbergioïdes *lato sensu*, les Millettioïdes, les Mirbelioïdes, les Robinoïdes, les IRLC (pour Inverted Repeat-Lacking Clade), *Cladrastis* et les Génistoïdes.

## Chapitre 3. Plantes étudiées

### 1. *Genista saharae* (Coss. & Dur.).

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par Linne en 1753. Il appartient à la famille des légumineuses (*Fabales*), sous-famille des papilionacées (*fabacées*) et à la tribu des Génistées (Maire, 1987).

En Algérie, le genre *Genista* compte environ 150 espèces (Lograda, 2010), regroupant environ 200 taxons arbustifs, dont 25 espèces indiquées dans la flore Algérienne et 11 espèces sont endémiques (Kacem *et al.*, 2016 ; Chouikh *et al.*, 2018).

Ce genre se distingue également par ses effectifs élevés d'espèces, sous espèces et ces variétés endémiques et rares. D'après la bibliographie, ce genre montre une richesse en composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses. Toutes ces qualités font de ce genre une cible intéressante qui mérite d'être mieux connue afin de mettre en lumière ses vertus thérapeutique.

#### 1.1. Distribution géographique du genre *Genista*

Le genre *Genista* est largement distribué dans le bassin méditerranéen. En Algérie, il est localisé dans la région Est et Sud-Est et au grand Sahara (Lograda, 1996). C'est une plante endémique du Sahara et qui se retrouve rarement au Sahara Septentrional.

#### 1.2. Taxonomie de la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.)

La classification de la plante *G. saharae* est répertoriée comme suit:

- ❖ Règne: Plantae
- ❖ Embranchement: Spermaphytes
- ❖ Classe: Magnoliopsida (dicotylédones)
- ❖ Ordre: Fabales
- ❖ Famille: *Fabaceae* (Légumineuse)
- ❖ Genre: *Genista*
- ❖ Espèce: *Genista saharae* Coss. & Dur. (Synonyme : *Spartidium saharae*), (*Calobota saharae*), nom vernaculaire: Merkh (المرخ).

#### 1.3. Description botanique de l'espèce *Genista saharae* (Coss. & Dur.)

L'espèce *G. saharae* possède un calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, rarement calice campanulé à 5 dents subégales. Carène oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. Étendard étroit, 10

étamines monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Stigmate oblique. Gousse déhiscente, variable. Arbrisseaux épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Feuilles 1-3 folioles, stipulées ou non, graines non arillées (**Figure 15**) (**Quezel et Santana, 1963**).



**Figure 15:** Photos représentant la partie aérienne de la plante *G. saharae*.

#### 1.4. Les métabolites secondaires les plus courants

La recherche bibliographique réalisée sur cette famille montre que la majorité des études phytochimiques effectuées certifie la richesse ainsi que la diversité structurale de ce genre en métabolites secondaires tels que : les composés phénoliques de type flavonique et isoflavonique (**Zapesochnaya et Laman, 1977 ; Watanabe et al., 1993 ; Leda Mathias et al., 1998 ; Lopez Larazo et al., 1998 ; Farag et al., 2001 ; Han et al., 2001 ; Ito et al., 2003**), les coumarines (**Estévez-Braun et Gonzálles, 1997**), les alcaloïdes (**Jouglard et al., 1973 ; Keeler, 1989 ; Huxtable, 1990**), et en petite quantité les stéroïdes (**Ali et al., 2001**) et les saponosides (**Khalifa, 2000**).

Le genre *Genista* est connu par sa grande richesse et diversité en flavonoïdes, parmi ces composés appartenant à la sous-classe des flavones on trouve la vitexine qui n'est autre que de l'apigénine-8-glucoside (**Mikkiou, 2005**).

L'investigation sur *G. saharae* poussant en Libye a permis la description de deux isoflavones: la 4'-O-méthyl-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosylgénistéine et 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosylgénistéine, (**Osama et al., 2000**) ainsi qu'un isoflavone a été identifié sur les espèces poussant en Algérie (**Mekkiou et al., 2005**).

Les travaux effectués sur le genre *Genista* ont confirmé l'abondance des flavonoïdes plus particulièrement les isoflavones. Nous allons nous limiter à citer quelques exemples de d'isoflavonoïdes isolés d'espèces de cette famille notamment (**Figure 16**):

3',4',5,7 tétrahydroxyisoflavone;

Hydroxyalpinumisoflavone;

4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside;

4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone;

4', 5, 7-trihydroxyisoflavone connue sous le nom de la Génistéine;

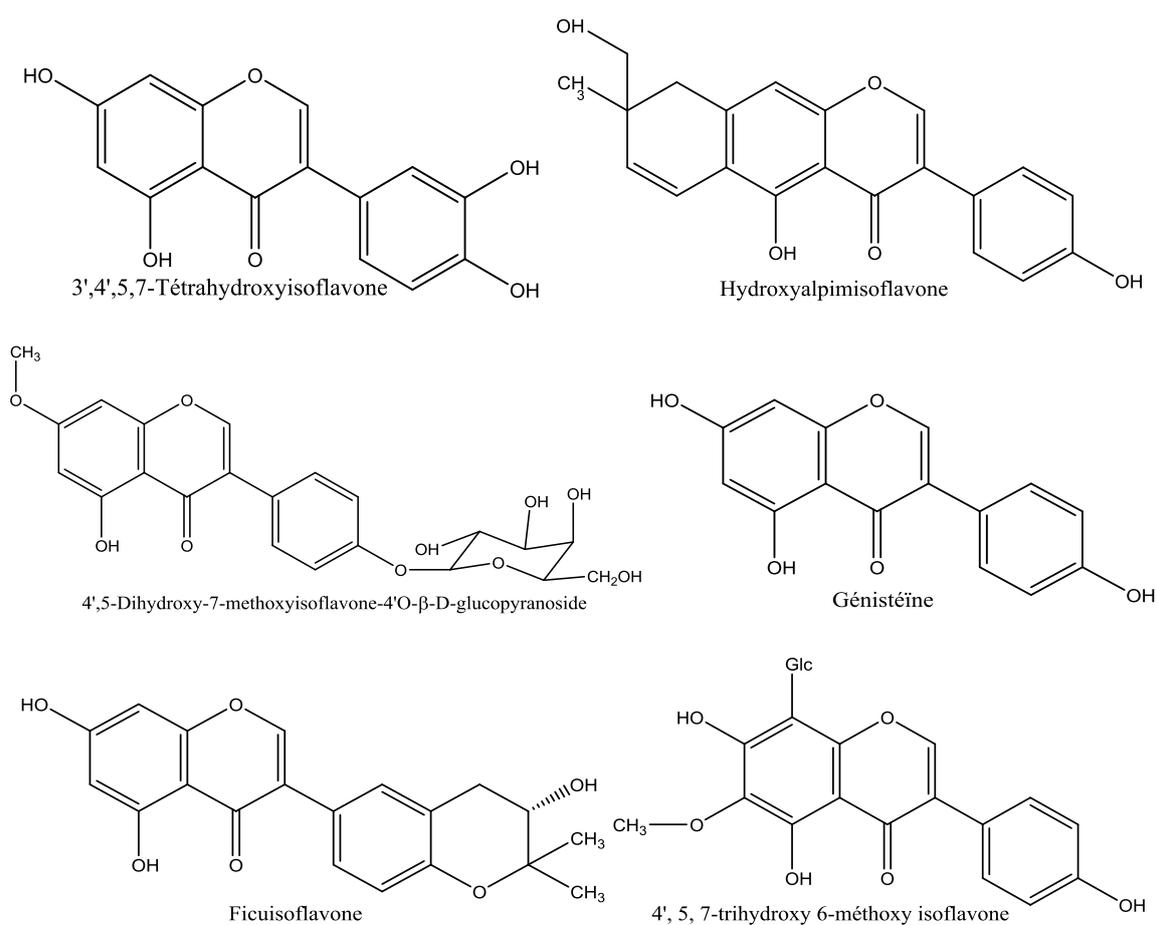
Ficuisoflavone;

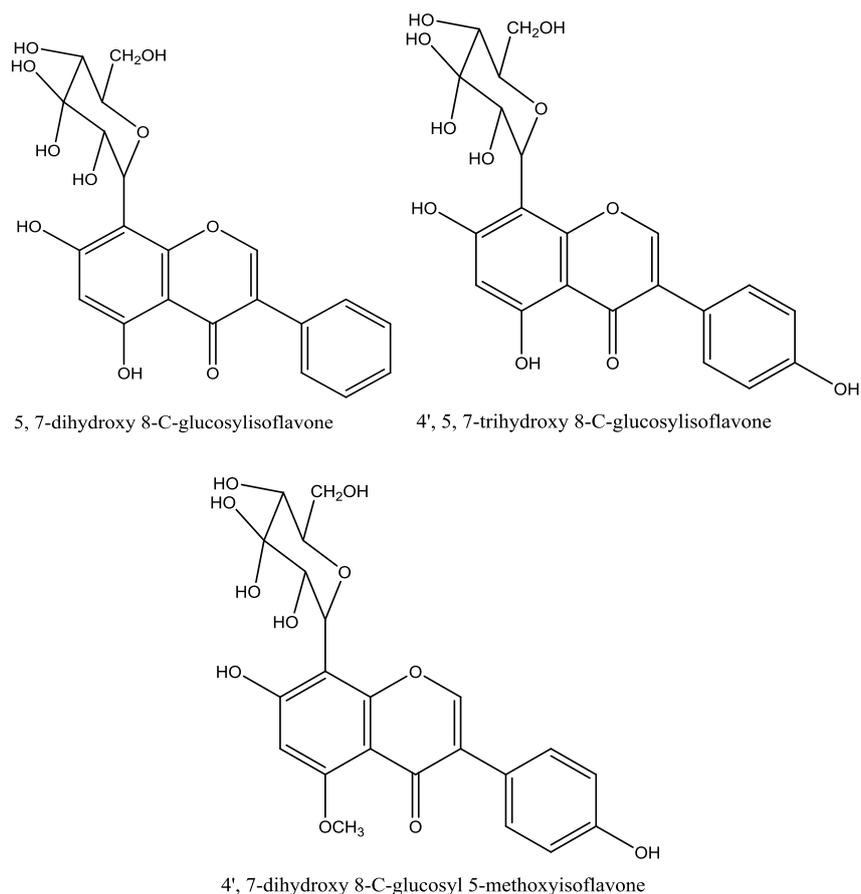
4', 5, 7-trihydroxy 6-méthoxy isoflavone;

5, 7-dihydroxy 8-C-glucosylisoflavone;

4', 5, 7-trihydroxy 8-C-glucosylisoflavone (8-C-glucopyranosylgénistéine);

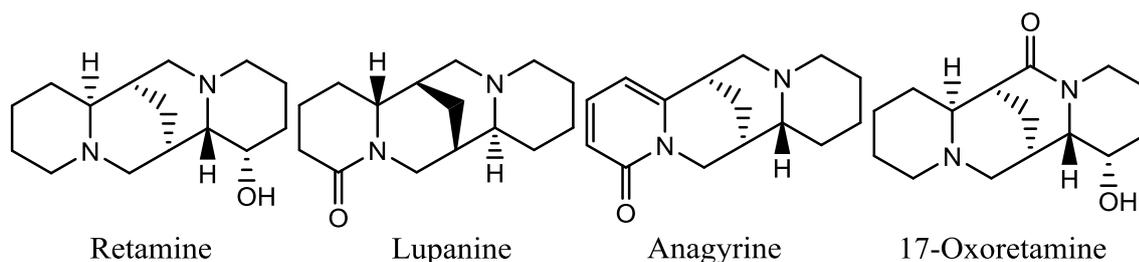
4', 7-dihydroxy 8-C-glucosyl 5-methoxyisoflavone.

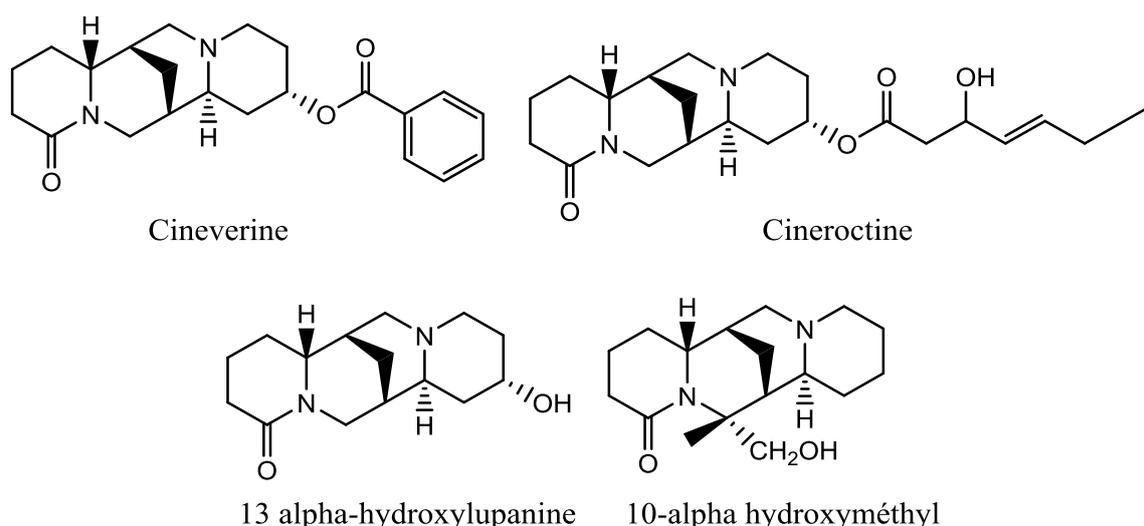




**Figure 16:** Structure de quelques isoflavonoïdes isolées de genre *Genista* (Mekkiou, 2005).

Les études effectuées sur le genre *Genista* sont menées aussi sur les alcaloïdes. Selon **Christov et al., (1991)** douze alcaloïdes quinolizidiniques ont été isolés de quelques espèces de la tribu des *Genisteae* (**Figure 17**). La même étude a montré qu'il existe une corrélation entre la morphologie de certaines espèces et leurs contenus alcaloïdique. Dans la tribu *Genisteae* les genres *Lupinus*, *Chamaecytisus*, *Corothisamnus*, *Genista* et *Chamaespartium* sont les plus riches en alcaloïdes. **Rensen et al., (1994)** constatent que la distribution des alcaloïdes tel que la cineverine, la cineroctine et le 13- $\alpha$ -hydroxylupanine n'est pas uniforme dans les différentes espèces de la section *Spartioïdes*. **Greinwald et al., (1992)** montrent que la distribution des alcaloïdes diffère d'un organe à l'autre chez *Genista cinerea*.





**Figure 17:** Structures de quelques alcaloïdes isolés du genre *Genista* (Boutaghane, 2013).

La comparaison des profils chromatographique par GC et GC/MS des huiles essentielles de six espèces du genre *Genista*, montrent une richesse des essences en acide gras et une abondance faible du point de vue quantitative et qualitative des mono et sesquiterpènes. L'acide palmitique est le plus abondant entre 65 et 45,3%, les monoterpènes représentent un taux de 5,49% par rapport aux autres espèces. Pour ce qui est sesquiterpènes leur présence se révèle significative pour les espèces *G. tricuspidata* et *G. microcephala*. Les divers composés terpéniques présents dans la plante *G. saharae* sont comme suit:

1. Monoterpènes : Terpinène-4-ol,  $\alpha$ -terpinéol, Géraniol, (E)- $\beta$ -ionone et Géranyllinalol.
2. Sesquiterpènes : Elémol.
3. Nerisoprenoïdes : B-damacénone E, Mégastigmatriènone 4, Mégastigmastrènone 2 et Safranal (Lograda, 2010).

### 1.5. Utilisation thérapeutique du genre *Genista*

Le genre *Genista* regroupe de nombreuses plantes utiles ayant des applications industrielles, alimentaires, thérapeutiques ou encore ornementales (Debelmas et Delaveau, 1983).

L'intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (*Rhizobiacées*), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* », pour former des organes symbiotiques racinaires « nodules » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, ils peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont dites plantes améliorantes (Echevin, 1964 ; Maylona *et al.*, 1995).

Certaines espèces du genre *Genista* possèdent des vertus médicinales. Au Maroc dans la région de Tafilalet, *Genista saharae* est préconisée dans les désordres digestifs alors que *Genista microcephala* est utilisée pour les intoxications alimentaires et pour les infections microbiennes (El-Rhaffari *et al.*, 1999).

Dans la région Pallars, *Genista balansae* est utilisée comme antalgique et anti-inflammatoire (Agelet et Valles, 2003). Dans l'Île de Madère *Genista tenera* est utilisée en médecine populaire pour le contrôle du diabète (Rauter *et al.*, 2009).

Les extraits flavonoïques de *Genista ephedroides*, testés contre l'antigénotoxicité des médicaments anticancéreux mutagènes, montrent une réduction de la génotoxicité (Scarpato *et al.*, 2008).

Une autre étude ethnobotanique de quelques plantes utilisées dans la médecine traditionnelle dans la région d'Oued-Righ du désert Algérien a montré que la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.) peut être employée pour remédier au froid, à la grippe et aux problèmes du système respiratoire (Lakhdari *et al.*, 2016).

## 2. *Glycyrrhiza glabra* L.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité: méditerranéenne, saharienne et paléotropicale, l'identification de cette flore a été décrite par plusieurs botanistes, en particulier la famille des *Fabaceae* (Légumineuses) qui est la plus importante parmi les dicotylédones du règne végétale (**Ozenda, 1991**). C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme qu'elles soient d'ordre alimentaire, industriel ou médicinal (**Saoudi, 2008**).

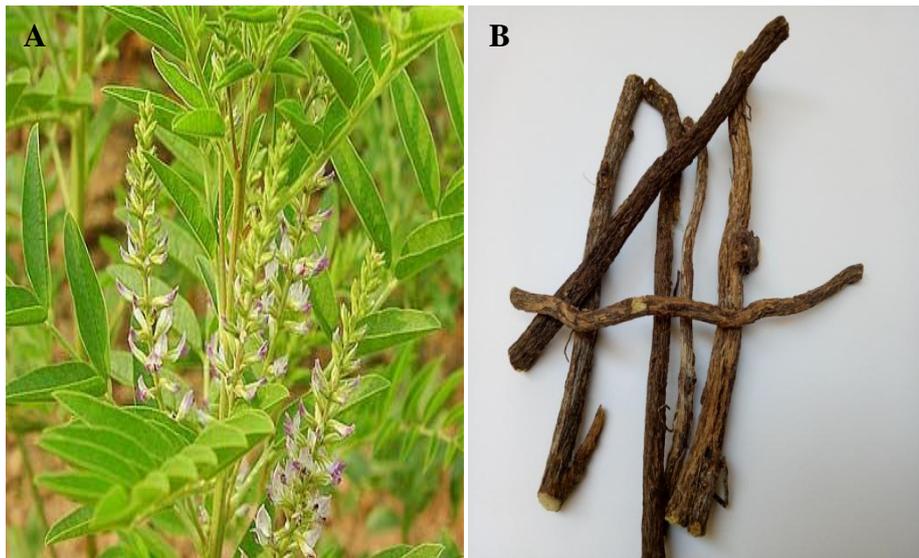
La réglisse communément appelée *Glycyrrhiza glabra* L. ou Arq esousse (عرق السوس) en arabe fait partie de la famille des *Fabaceae*. C'est une plante utilisée à des fins à la fois culinaires et médicinales (**Gaby, 1988**).

L'étymologie de son nom botanique nous renseigne sur ses propriétés. En grec, le mot *glycyrrhiza* se décompose en deux (*glycys* et *rhidza*) qui signifie respectivement doux, sucré et racine. Le nom du genre, *glabra*, dérive du latin *glaber* qui signifie glabre et se rapporte à la gousse imberbe (**Garnier et al., 1961 ; Ferrari, 1984 ; Couplan, 2000**).

### 2.1. Morphologie de la plante *Glycyrrhiza glabra* L.

L'espèce *Glycyrrhiza glabra* L. est une plante herbacée vivace, atteignant 1m de haut, à feuilles pennées d'environ 7 à 15 cm de long avec 9 à 17 folioles. Les fleurs mesurent 0,8-1,2 cm de long de couleur pourpre à bleue blanchâtre pâle. Le fruit est une gousse oblongue de 2 à 3 cm, contenant plusieurs graines (**Huxley, 1992**).

L'arbuste *Glycyrrhiza* est un membre de la famille des pois et pousse dans les climats subtropicaux dans un sol riche. Sous terre, la plante possède un système racinaire étendu avec une racine pivotante (**Figure 18**). Cette dernière est récoltée à des fins médicinales, elle est douce, fibreuse et présente un intérieur jaune vif (**Olukoga et Donaldson, 1998**).



**Figure 18:** Photos représentant la plante *Glycyrrhiza glabra* L.  
(**A:** partie aérienne de la plante ; **B:** les racines).

## 2.2. Taxonomie de la plante *Glycyrrhiza glabra* L.

La classification botanique de la réglisse est présentée comme suit:

- ❖ Règne: Plantae
- ❖ Sous-règne: Tracheobionta
- ❖ Embranchement: Magnoliophyta
- ❖ Sous-embranchement: Magnoliophytina
- ❖ Classe: Magnoliopsida (dicotylédones)
- ❖ Sous-classe: Rosidae
- ❖ Ordre: Fabales
- ❖ Famille: *Fabaceae* (Légumineuse)
- ❖ Genre: *Glycyrrhiza*
- ❖ Espèce: *glabra* Linn.
- ❖ Nom binomial: *Glycyrrhiza glabra* Linn. (**Ghedira et al., 2010**).

## 2.3. Répartition géographique de la plante *Glycyrrhiza glabra* L.

Originnaire des régions fertiles de la Mésopotamie et de l'Iran, la réglisse se répandit largement en Chine et sa culture fut réalisée avec succès, en Espagne et en France au XIX<sup>ème</sup> siècle (**Delaveau, 2003**). Plusieurs variétés de réglisse de type *Glycyrrhiza glabra* L. ont été décrites. Celles-ci sont originaires essentiellement de la région méditerranéenne, du centre et du Sud de la Russie, de l'Anatolie, de l'Iran, du Turkestan, de la Syrie et du sud-ouest de l'Asie.

#### 2.4. Partie utilisée en médecine traditionnelle

La partie utilisée pour l'espèce *Glycyrrhiza glabra* L. est le rhizome. Ce dernier est très employé pour le nettoyage des dents. La décoction de rhizome est indiquée contre les gingivitis (**Benkhnigue et al., 2011**). La réglisse est utilisée comme anti-inflammatoire, antispasmodique, adoucissant, détersif, diurétique et laxatif. La poudre de racine de la réglisse est envisagée pour traiter l'asthme (**Ghourri et al., 2011**). L'infusion préparée par les racines est indiquée par voie orale contre l'ulcère de l'estomac, l'asthme et le rhumatisme (**Bouayyadi et al., 2015**).

L'abus de consommation de réglisse peut entraîner une hypokaliémie sévère avec une hypertension artérielle et parfois une fibrillation ventriculaire. Ces troubles sont dus à l'acide glycyrrhétique qui perturbe le métabolisme de la cortisone (**Benkhnigue et al., 2011 ; Baba Aissa, 2011**).

#### 2.5. Composition chimique des racines de l'espèce *Glycyrrhiza glabra* L.

Les racines et les rhizomes de la réglisse ont des propriétés physiologiques complexes provenant des différents principes actifs qui ont été isolés et dont la structure chimique et les actions thérapeutiques sont bien connues (**Hornok, 1992**).

Au total, environ 400 constituants ont été décrits pour l'espèce *G. glabra* L. mais les activités biologiques concernant environ un quart d'entre eux.

D'une part, les racines renferment des substances courantes dans la nature:

- **Des coumarines:** licocoumarone et autres coumarines: ombelliférone, herniarine, licobenzofurane et kaempferol 3-O-méthyl éther (**Hatano, 1989**).
- **Des composés volatils aromatiques** (environ 0,04 à 0,06%) dont plus de 40 ont été identifiés: anéthol, estragole, eugénol, carvacol, fenchone, guaiacol, géraniol, linalol, *p*-cymène, thujone, thymol,  $\alpha$ -terpinéol ; les 03 premiers étant à l'origine des arômes de la racine, avec l'indole et la  $\gamma$ -nonalactone. Sont présents également des acides aliphatiques (acide benzoïque, caproïque, linoléique, palmitique, propionique, salicylique), des aldéhydes (benzaldéhyde, furfural), des cétones, des esters, des éthers, des alcools et des hydrocarbures (**Tang et Eisenbrand, 1992**).
- **Des sucres:** glucose (jusqu'à 4%), fructose, maltose, saccharose (2,4 – 6,5%).
- **Des polysaccharides** (environ 10%): le glycyrrhizane GA est polysaccharide essentiellement composé d'arabinose (54%) et de galactose (30%). Sont présents

également 02 autres polysaccharides acides glycosyl phosphatidyl (GPI et GPII). Ces 02 polysaccharides, nous trouvons 25 à 30% d'amidon et 2,5% de saccharose (**Shimizu, 1991 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Fintelmann, 2004 ; Meyer, 2004**).

- **Des stérols:**  $\beta$ -sitostérol, stigmastérol.
- **Autres:** acides aminés (2 à 4% asparagine), gomme, résines, graisses (0,8%), substances amères (**Pierre, 1982 ; Wichtl et Anton, 2003**).

A côté des ces composés, l'espèce *G. glabra* L. renferme des principes actifs plus spécifiques à savoir:

### 2.5.1. Les saponosides tritèrpiniques (2-15%)

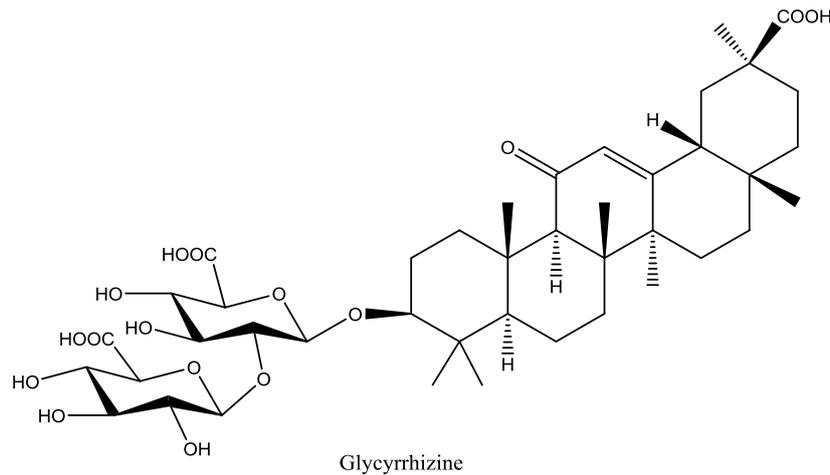
#### 2.5.1.1. La glycyrrhizine

La glycyrrhizine est considérée comme la substance déterminante dans les actions antitussives et expectorantes de la réglisse. Cette molécule a été isolée de la racine pour la première fois en 1809 par Robiquet. En 1907, Tschirch et ses collaborateurs ont aboutie de l'isoler à son état pur et trouvent qu'elle s'hydrolyse en acide glycyrrhétic et acide uronique, sans réussir à identifier la nature de ce dernier.

En 1936, Voss et ses collaborateurs trouvent la formule de glycyrrhizine ( $C_{42}H_{62}O_{16}$ ) (**Figure 19**) et de l'acide glycyrrhétic ( $C_{30}H_{46}O_4$ ).

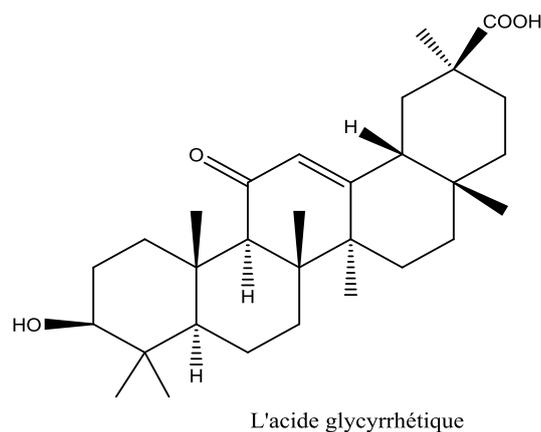
La glycyrrhizine est un saponoside présent sous forme d'un mélange de sels: sels de calcium, de magnésium et de potassium, à une teneur de 3 à 5% de la drogue sèche, cette teneur varie selon l'origine de l'échantillon, la variété et selon la période de la récolte le taux de la glycyrrhizine augmente avec l'âge de la plante, de plus son taux serait maximal en période de floraison (**Duke, 2003**).

La glycyrrhizine a une saveur 50 à 60 fois plus sucrée cristallisée, ce qui fait de la réglisse un édulcorant. Elle agit par l'intermédiaire de son aglycone l'acide glycyrrhétic qui donne à la réglisse ses propriétés anti-inflammatoires, antiulcéreuses (mucoprotectrice), antitussives et expectorantes. Cet aglycone résulte de l'hydrolyse de la glycyrrhizine en acide 18  $\beta$ -glycyrrhétic (enoxolone), plus molécules d'acide D-glucuronique (**Girre, 2001 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Schauenberg et Paris, 2005 ; Zahalka, 2005**).



**Figure 19:** Structure de la glycyrrhizine isolée de l'espèce *Glycyrrhiza glabra* L.

L'acide glycyrrhétique (**Figure 20**) est un acide carboxylique à squelette oléanane caractérisé par la présence d'une cétone. Il s'agit d'un triterpène pentacyclique (**Girre, 2001 ; Ross, 2001 ; Meyer et al., 2004**).



**Figure 20:** Structure de l'acide glycyrrhétique.

### 2.5.1.2. Les autres saponosides

De nombreux saponosides triterpiniques apparentés sont également présents mais en faibles concentrations:

- Le 24-hydroxyglycyrrhizine (environ 100 fois plus sucré que le sucre de canne)
- Le sojasaponines I et II
- Des heterosides correspondants à une vingtaine d'autres aglycones: acide 18  $\alpha$ -glycyrrhétique, acide 18  $\alpha$ -hydroxyglycyrrhétique (acide glabrinique), 28-hydroxyglycyrrhétique, glabrolide et de nombreux dérivés (**Girre, 1992 ; Ross, 2001 ; Wichtl et Anton, 2003**).

- $\beta$ -amyrine, glycyrrhizine, glycyrrhetol, glabrolide, acide licoric, acide liquiritique (Hayashi *et al.*, 1992 ; Newall *et al.*, 1996).

### 2.5.2. Les flavonoïdes (0,65-2%)

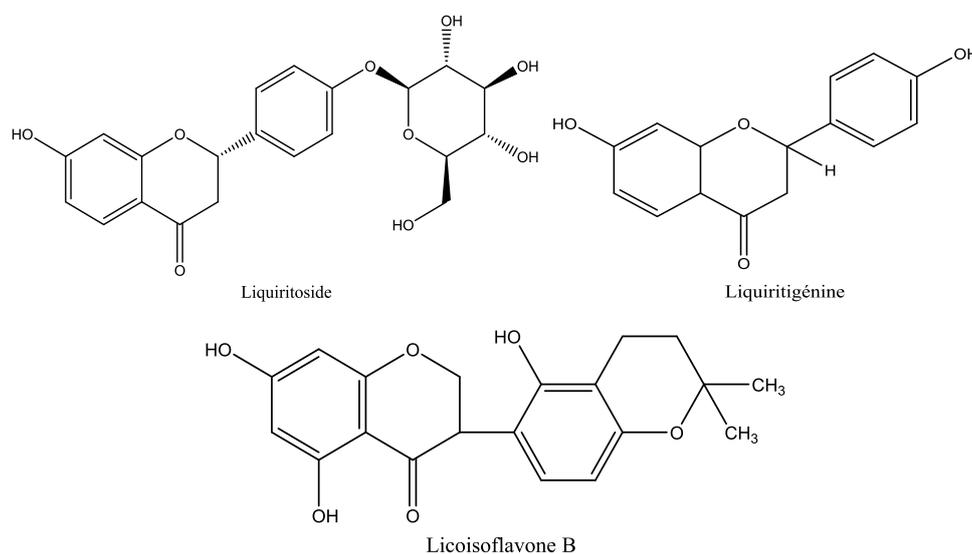
Ce sont des flavonoïdes de la sous classe des flavones et des isoflavones, représentés par le liquiritoside et l'isoliquiritoside qui ont des propriétés essentiellement antispasmodiques et qui jouent un rôle préventif et curatif vis-à-vis des ulcères gastriques (Girre, 1992, 2001 ; Schauenberg et Paris, 2005).

Les isoflavones sont presque spécifiques des Fabacées et sont responsables avec les flavones de la couleur jaune des rhizomes (Hornok, 1992).

Shinoda et Ueeda, (1934) ont découvert le liquiritoside. Ils découvrent également que cette molécule se dédouble en glucose et en liquiritigénine (Figure 21) (Garnier, 1961).

De nombreuses autres flavones sont également présentes:

- Les licoflavones A et B;
- Les licoisoflavones A, B et C;
- Des isoflavones (formonoétine, glabrol). La génistéine qui possède des propriétés pseudo-œstrogénique;
- L'apigénine, ainsi que de nombreux dérivés.



**Figure 21:** Structure de quelques composés de la sous classe des flavonoïdes de *G. glabra* L. (Saxena, 2005).

D'autres flavonoïdes sont retrouvés dans les racines:

- Une chalcone: l'isoliquiritigénine et son 4-O-glucoside (isoliquiritine), 4'-O-apiosyl-(1,2)-glucoside (licuroside), 4-O-apiosyl-(1,2)-glucoside (néolicuroside) ainsi que de nombreux dérivés (néoliquiritine, néo-isoliquiritine, 4-hydroxychalcone), les licochalcones A et B, licoagrochalcone A, la bravachalcone;
- Des flavanones prénylées (glabrone), licoisoflavanone, licoflavanone;
- Des flavonols: licoflavonol;
- Des isoflavanes prénylées (glabridine, licoricidine, hispaglabridine A et B, phaseollinisoflavane) et dérivés;
- L'isoflav-3-ène (glabrène);
- Des ptérocarpanes;
- Des coumestanes, flavonols (liquiritoside, glabrol), isoflavonol, isoflavène (Zahalka, 2005).

## 2.6. Propriétés pharmacologiques de la plante *Glycyrrhiza glabra* L.

Traditionnellement, la plante a été recommandée comme prophylaxie contre l'ulcère gastrique et duodéal, contre la dyspepsie comme un agent anti-inflammatoire lors d'une réaction allergique (Ammosov et Litvinenko, 2003).

En médecine traditionnelle, les racines de la plante *Glycyrrhiza glabra* L. sont utilisées comme laxatifs, emménagogues, comme médicament antiasthmatique et comme agent antiviral.

Plusieurs études ont été réalisées par des ethnobotanistes et des phytochimistes sur ces composés bioactifs. Ces derniers, suggèrent que la plante peut être une source de nouvelles molécules et formulation thérapeutique pour le traitement des maladies.

La poudre et l'extrait de la réglisse a été utile pour le traitement des maux de gorge, la toux et le catarrhe bronchique. La réglisse est utilisée également comme un relâchant antitussif et expectorant qui aide à éliminer la congestion dans les voies respiratoires supérieures car elle accélère la sécrétion du mucus trachéal (Hikino, 1985). Son action adoucissante est attribuée à la glycyrrhizine. Il a été trouvé que la liquiritine apioside, un composé actif présent dans l'extrait de la licorice inhibe la Capsaïcine induisant la toux (Kamei *et al.*, 2003).

---

## *Matériel et méthodes*

---

Notre travail a été réalisé au sein des laboratoires

- Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques (LapSab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.
- Centre Nationale de Recherche en Biotechnologie (CRBt) Ali Mendjli- Constantine.
- Laboratoire des Produits Naturels (Laprona), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.
- Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique (CRAPC) Bou Ismaïl- Tipaza
- Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Collecte du matériel végétal

Les deux plantes ont été collectées dans leurs habitats naturels au cours du mois de Décembre 2015.

La partie aérienne de la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.) a été récoltée dans la région d'Aïn Sefra Daïra de la wilaya de Naâma située dans le Nord-Ouest du pays quant aux racines de la plante *Glycyrrhiza glabra* L. elles ont été cueillies dans les terroirs d'Ain Zaatout situés entre les départements de Biskra et Batna au Sud des massifs montagneux des Aurès. Les deux plantes ont été conservées dans un endroit sec à l'abri de l'humidité et la lumière. La partie aérienne de la plante *G. saharae* a été réduite en poudre, alors que les racines de la plante *G. glabra* ont été concassées en petits morceaux.

### 1.2. Préparation des extraits

Il existe différentes méthodes d'extraction qui sont particulièrement adaptées à l'extraction des composés naturels. Parmi celles-ci, nous avons utilisé deux modes: l'infusion et la décoction. L'extraction à partir de la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.) a été réalisée en mélangeant 10 g de la plante avec une solution hydrométhanolique à (70/30) (V/V) pendant une heure. L'extraction à partir des racines de la plante *Glycyrrhiza glabra* L. a été réalisée par décoction sous reflux où 10 g de racine concassée ont été mis en contact avec 100 mL de solution hydrométhanolique (70/30) (V/V) pendant 3 heures.

Les extraits récupérés ont été ensuite filtrés à l'aide d'un papier Wattman puis concentrés dans un évaporateur rotatif de type Heidolph.

Les extraits bruts obtenus ont subi une deuxième extraction par décantation. Ils ont été lavés 03 fois successivement par des solvants de polarités croissantes le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), l'acétate d'éthyle (AE) et le n-butanol (But). Les extraits organiques récupérés ont été évaporés sous pression réduite pour l'élimination des solvants afin d'avoir les extraits en poudre.

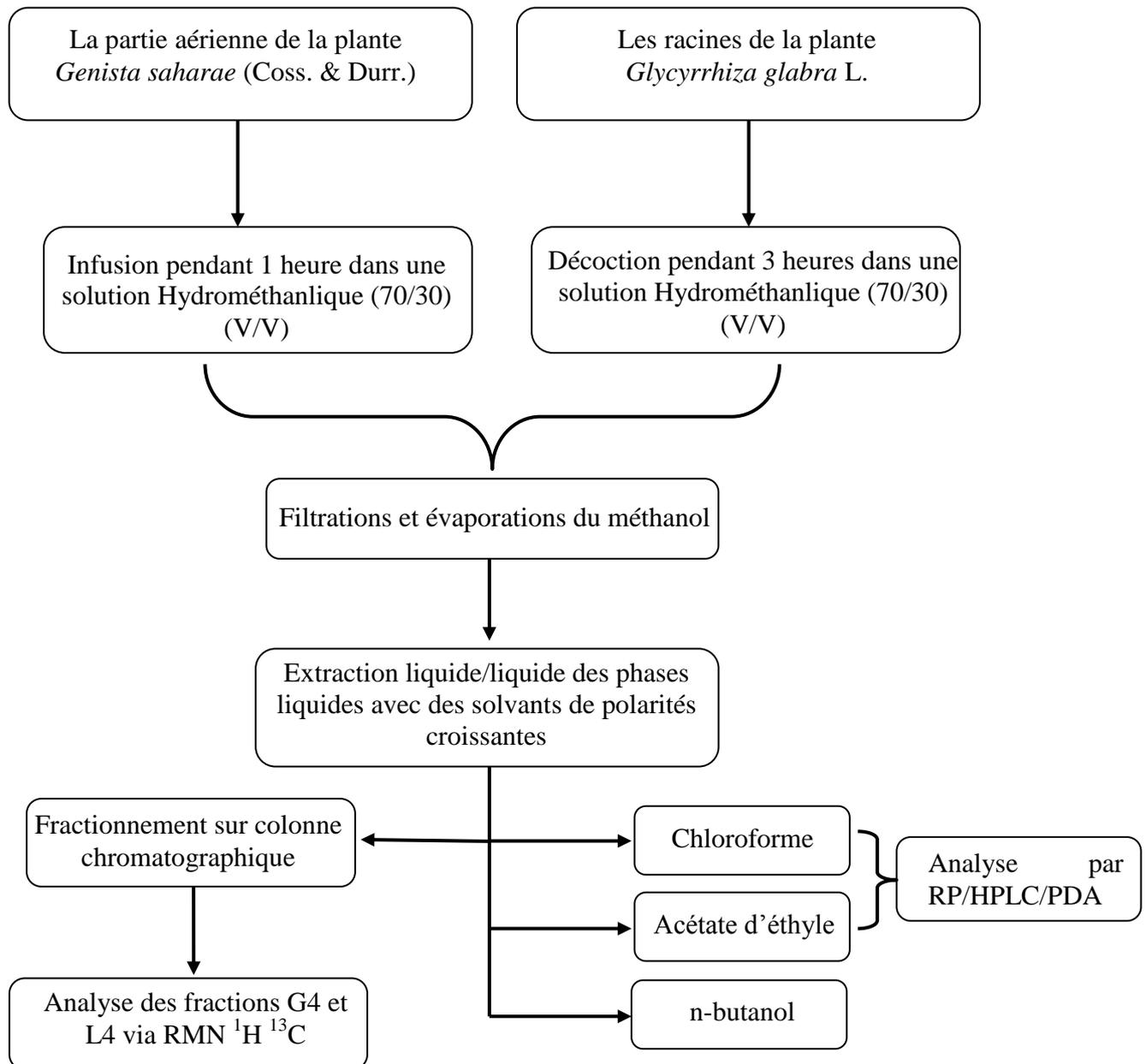
### **1.3. Fractionnement et séparation par chromatographie sur colonne**

Les extraits chloroformiques des deux plantes *G. saharae* et *G. glabra* ont été fractionnés sur colonne chromatographique en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire. Pour la phase mobile, l'éluant a été préparé en mélangeant les solvants à polarité croissante : dichlorométhane et le méthanol. 10 fractions ont été obtenues (G1-G10 ; L1-L10) après confirmation par chromatographie sur couche mince (CCM) et les fractions G4 et L4 ont été analysés par RMN (2D).

### **1.4. Chromatographie sur couche mince**

Les fractions qui ont été récoltées de la colonne ont été contrôlées sur des plaques de Chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 en utilisant le système d'éluion Méthanol/Dichlorométhane (80/20).

L'examen des plaques a été effectué par révélation sous lumière UV à 254 et 365 nm, permettant les regroupements des fractions qui ont présenté une mono tache.



**Figure 22** : Schéma récapitulatif des procédés d'extractions utilisé.

## 2. Dosage des composés phénoliques

### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés dont l'absorbance est mesurée entre 725 et 760 nm.

#### *Mode opératoire:*

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode de **Vermerius et Nicholson, (2006)**. Un volume de 0,1 mL de chaque extrait a été mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée. Après 5 min, 0,1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu 0,2 N a été ajouté au mélange, le tout a été incubé pendant 30 min à une température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture a été effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Le taux des polyphénols a été exprimé en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG}/\text{mg E}$ ).

### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'évaluation des flavonoïdes totaux a été faite selon une méthode colorimétrique en utilisant des solutions de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, ce qui entraîne la formation d'un complexe rose.

#### *Mode opératoire:*

Le dosage des flavonoïdes des extraits a été réalisé selon la méthode colorimétrique décrite par **Topçu et al., (2007)**. 50  $\mu\text{L}$  de chaque extrait ont été mélangés avec 130  $\mu\text{L}$  du méthanol et 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acétate de potassium ( $CH_3COOK$ ) 1M. Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3$ ) à 10% ont été ajoutés au mélange, le tout a été laissé pendant 40 min à la température ambiante. Après incubation, la lecture a été faite à 415 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme contrôle positif.

Le taux des flavonoïdes totaux a été exprimé en microgramme équivalent quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg E}$ ).

### 2.3. Dosage des tannins condensés

En présence d'acide chlorhydrique concentré, les tanins condensés se dépolymérisent, et par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 550 nm.

#### *Mode opératoire:*

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode décrite par **Julkunen-Titto, (1985)**. Une prise de 50  $\mu\text{L}$  de chaque extrait a été ajoutée à 3 mL de vanilline à 4% et 750  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique concentré (HCl). L'absorbance de cette préparation a été mesurée après 20 min d'incubation à 550 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif aux concentrations comprises entre 100 à 700  $\mu\text{g/ mL}$ .

Le taux des tanins condensés a été exprimé en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EC/ mg E}$ ).

### 3. L'analyse des composés phénolique par RP-HPLC-PDA

L'identification des composés phénoliques des extraits chloroformiques et acétates d'éthyles des deux plantes *Genista saharae* (Coss. & Dur.) et *Glycyrrhiza glabra* L. a été réalisé par une chromatographie en phase liquide à haute performance, système Perkin Elmar Flexar couplée à un détecteur UV-vis à longueurs d'onde multiples.

Les données analytiques ont été évaluées à l'aide d'un système de traitement de données Chromer. La séparation a été réalisée sur une colonne Eclipse ODS Hypersil C18 (150 mm, 4,6  $\mu\text{m}$ ) à température ambiante. La phase mobile utilisée a été composée d'eau/ acide acétique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B).

Le gradient d'élution a été comme suit: 5 min avec 10% de solvant B ; 25 min avec 90% de solvant B et 15 min de gradient linéaire de 90% à 100% de solvant B. Après 15 minutes permettant le calibrage de l'appareil. Le débit a été de 1 mL/ min et le volume d'injection a été de 20  $\mu\text{L}$ . La longueur d'onde utilisée pour l'identification des composés a été de 280 nm basée sur la combinaison entre le temps de rétention et l'appariement spectral.

#### 4. Analyse spectrale par RMN

La RMN-2D proton  $^1\text{H}$  et carbone  $^{13}\text{C}$  a été utilisée pour l'analyse et l'élucidation spectroscopiques des molécules organiques pures de nos fractions.

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ces fractions a été utilisée pour révéler la description exacte relative à la structure chimique. Elle a été enregistrée à 400 MHz sur Brüker AC 400. Les fractions G4 et L4 ont été analysées dans le solvant  $\text{CDCl}_3$  en utilisant le TMS (tétraméthylsilane) comme étalon interne. Les déplacements chimiques ont été exprimés en unité ppm (partie par million) et rapportés au TMS. Les multiplicités ont été décrites comme suit: singulier (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m). L'interprétation des résultats a été effectuée via le logiciel du traitement des données RMN TopSpin.

#### 5. Eude de l'activité antioxydante

Il est connu que les extraits de plante riches en polyphénols ont une activité antioxydante variable et il existe plusieurs méthodes pour évaluer leur capacité antioxydante. Ces méthodes diffèrent par leurs principes d'analyse et leurs conditions expérimentales (**Indu et Seenivasan, 2013**).

Par conséquent, l'activité antioxydante des extraits des deux plantes *G. saharae* et *G. glabra* a été évaluée *in vitro* par plusieurs méthodes incluant : la méthode du piégeage du radical 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le piégeage du radical acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), le pouvoir réducteur du fer (FRAP), la capacité antioxydante totale (CAT) et la méthode de la phenanthroline.

##### 5.1. Activité antiradicalaire du DPPH

Le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**).

En solution alcoolique, le radical DPPH présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**Lekhal et al., 2011**).

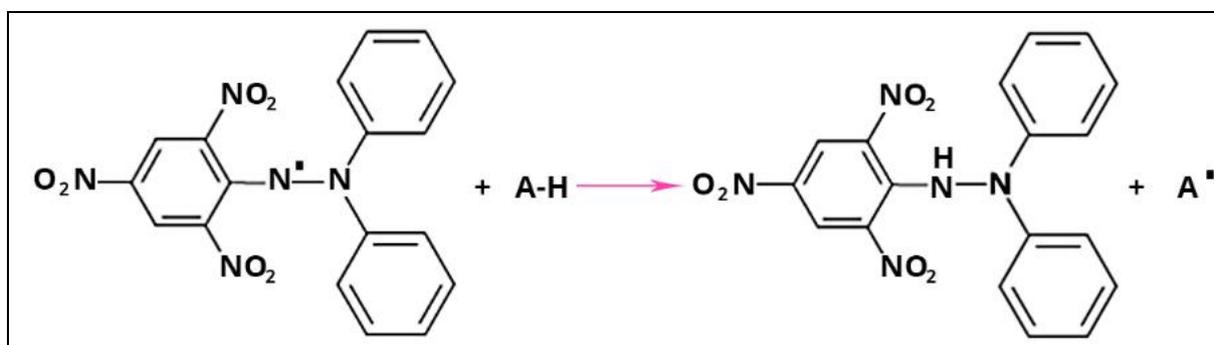
160  $\mu\text{L}$  de solution DPPH préparés à 0,1 mM ont été ajoutés à 40  $\mu\text{L}$  d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à différentes concentrations. L'absorbance des solutions obtenues a

été mesurée à 517 nm, après 30 minutes d'incubation. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme des antioxydants standards. Les plus faibles valeurs d'absorbances indiquent une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(A_{\text{blanc}} - A_{\text{extrait}})}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

$A_{\text{blanc}}$ : est l'absorbance de la réaction ne contenant que le réactif.

$A_{\text{extrait}}$ : est l'absorbance de la réaction contenant le réactif et l'extrait.



**Figure 23:** Mécanisme réactionnel du radical libre DPPH.

## 5.2. Activité du piégeage de l'ABTS

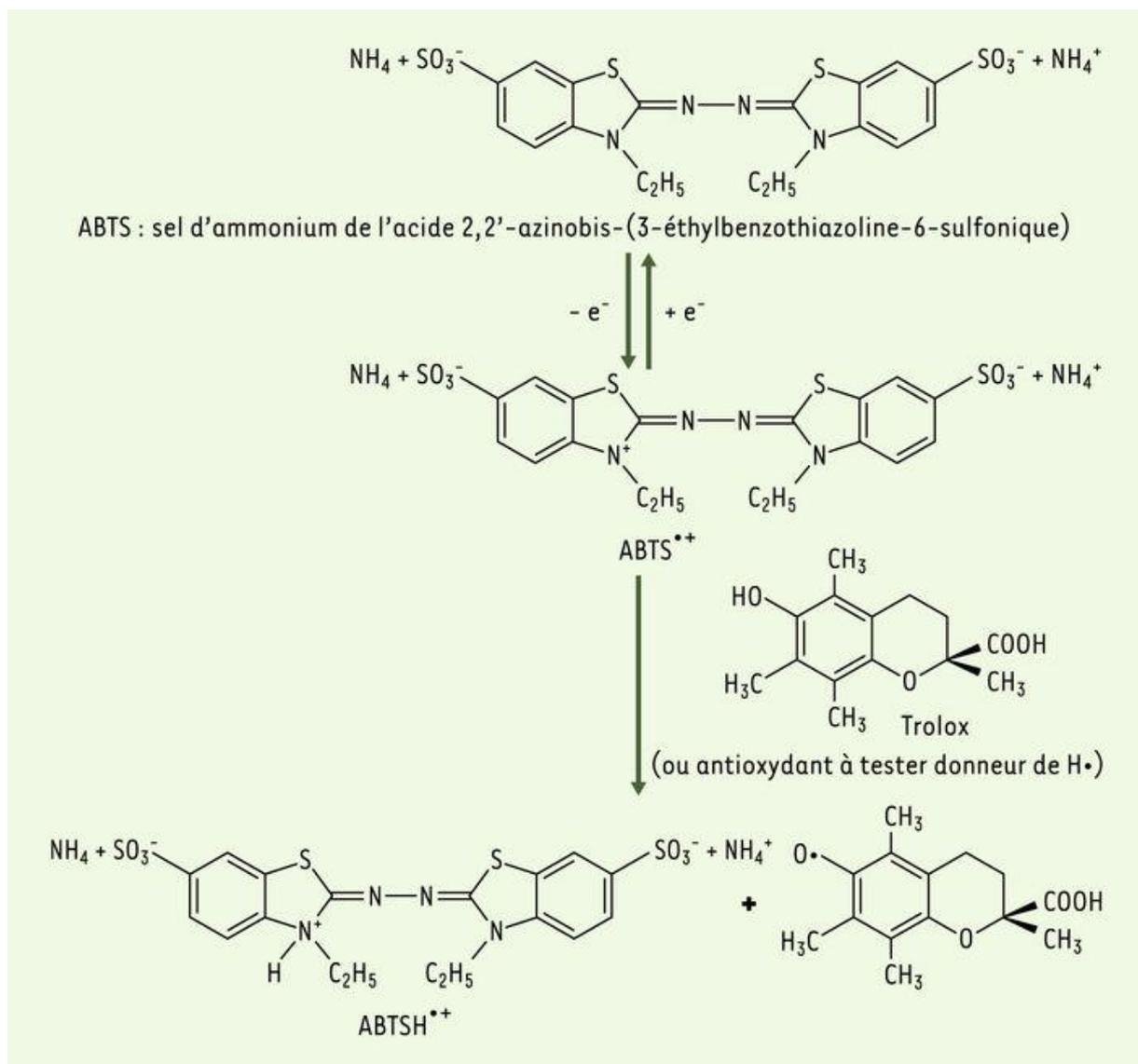
Le radical ABTS est un composé soluble dans les solutions aqueuses et organiques. Cette particularité lui donne l'avantage d'être testé sur des échantillons hydrophiles et lipophiles. Il peut être généré par la réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium avec la production directe d'un chromophore bleu/vert, avec un maximum d'absorption aux longueurs d'ondes 645, 734 et 815 nm, ou plus communément à un maximum de 415 nm. Le radical est ensuite généré directement sous une forme stable avant la réaction avec les antioxydants (Vuolo *et al.*, 2019) (Figure 24).

L'analyse spectrophotométrique de l'activité du piégeage de l'ABTS a été déterminée selon la méthode décrite par Ree *et al.*, (1999). Le radical ABTS a été produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. Le mélange a été stocké à l'obscurité à température ambiante pendant 12h puis dilué jusqu'à l'obtention d'une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm. Ensuite, 160  $\mu\text{L}$  de la solution ABTS ont été ajoutés à 40  $\mu\text{L}$  des extraits à différentes concentrations. Après 10 min

d'incubation l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de l'ABTS a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{ABTS (\%)} = \frac{(A \text{ controle} - A \text{ extrait})}{A \text{ controle}} \times 100$$

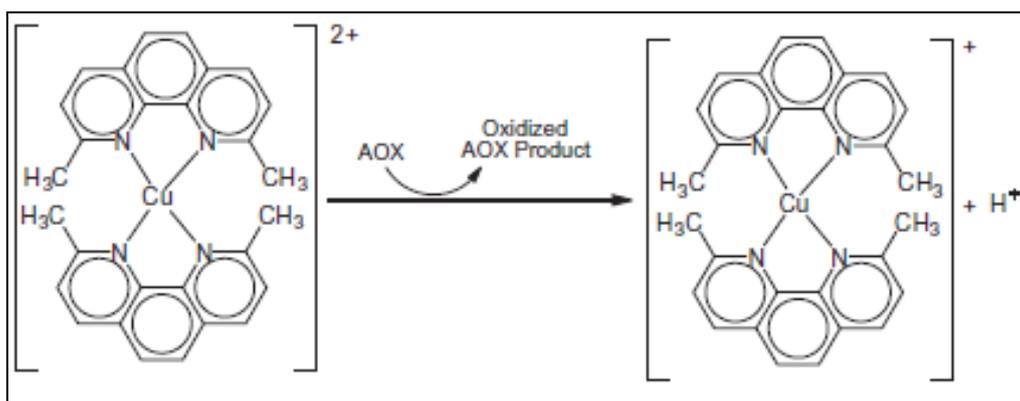


**Figure 24:** Formation et piégeage du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  par un antioxydant donneur de H<sup>•</sup> (Marc *et al.*, 2004).

### 5.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La détermination de la méthode antioxydante CUPRAC (CUPric Reducing Antioxydant Capacity) est basée sur la mesure de l'absorbance du chélate de Cu(I)-Néocuproïne (Nc) formé à la suite de la réaction d'oxydoréduction des antioxydants en clivant la chaîne Cu(II)-Nc, où l'absorbance est enregistrée à la longueur d'onde de 450 nm (**Özyürek et al., 2011**).

La réduction du cuivre (CUPRAC) des extraits a été déterminée par la méthode décrite par **Apak et al., (2004)**. Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 40  $\mu\text{L}$  de nos extraits à différentes concentrations a été mélangé avec 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  (10 mM), 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de neocuproïne (7,5 mM) et 60  $\mu\text{L}$  du tampon acétate d'ammonium (1M, pH 7,0). Après une heure d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm contre un blanc. Les résultats obtenus permettent de calculer la ( $A_{0,5}$ ) qui représente la concentration de l'extrait qui correspond à une absorbance égale à 0,5 obtenue à l'aide de la courbe de régression linéaire.



**Figure 25:** La réaction CUPRAC et le chromophore, neocuproïne chélate les cations.

### 5.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer se traduit par la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , en présence d'antioxydants dans l'échantillon à tester. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet, le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. La quantité de fer réduit ( $\text{Fe}^{2+}$ ) est suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm (**Oyaizu, 1986**).

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et al., (2008)**. Dans une microplaque à 96 puits un volume de 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à différentes concentrations a été mélangé avec 40  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 60  $\mu\text{L}$  d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1% (m/v). La microplaque a été ensuite incubée à

50°C pendant 20 minutes. Ensuite, un volume de 50 µL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% a été ajouté pour chaque puits afin d'arrêter la réaction. Après, 10 µL de solution de FeCl<sub>3</sub> (0,1 %) ont été additionnés aux puits de la microplaque. L'absorbance des extraits a été déterminée à 700 nm contre un blanc.

En parallèle, l'acide ascorbique et la  $\alpha$ -Tocophérol à différentes concentrations ont été utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions opératoires.

Les résultats obtenus nous ont permis de calculer la concentration efficace ( $A_{0,5}$ ) qui est la concentration de l'extrait qui correspond à une absorbance égale à 0,5. Ces résultats ont été comparés avec ceux de l'acide ascorbique et la  $\alpha$ -Tocophérol utilisés comme des standards.

### 5.5. Capacité Antioxydante Totale (CAT)

Ce test est basé sur la réduction du molybdène ( $Mo^{6+}$ ) en molybdène ( $Mo^{5+}$ ) par l'extrait des deux plantes. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/ $Mo^{5+}$  de couleur verte (Prieto *et al.*, 1999).

Une prise de 0,2 mL d'extrait a été mélangée dans un tube avec 2 mL d'une solution composée d'acide sulfurique (0,6 N), de phosphate de sodium ( $Na_3PO_4$ , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ( $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , 4 mM). Les tubes ont été incubés à 95°C pendant 90 min. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre un blanc.

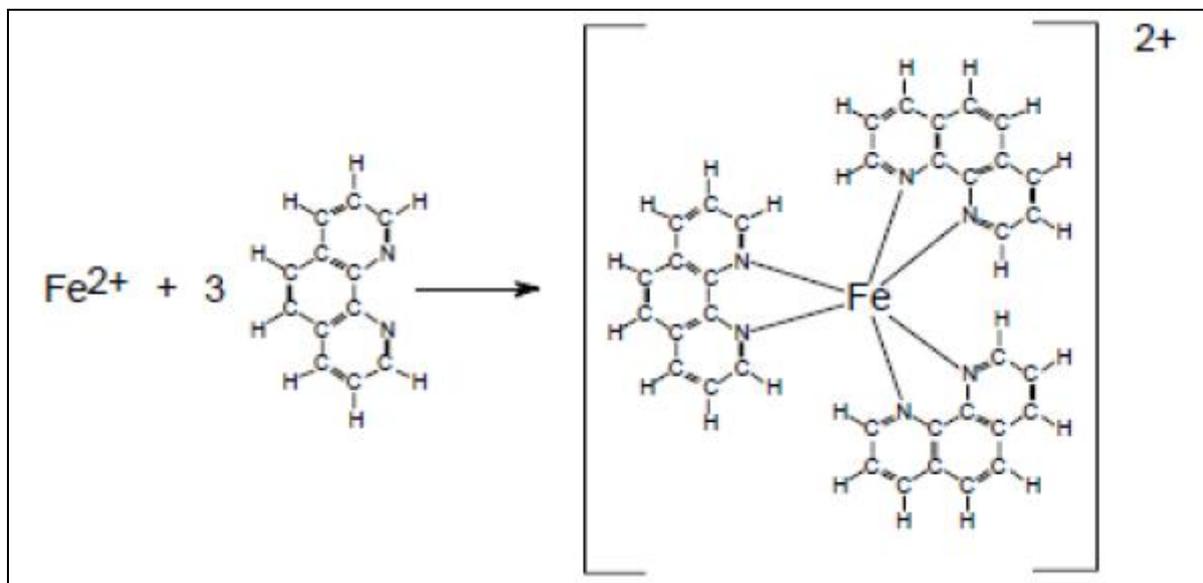
L'activité antioxydante totale a été exprimée en mg d'équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g E).

### 5.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline

Le réactif complexant utilisé dans cette méthode est l'orthophénanthroline qui forme un complexe avec le  $Fe^{2+}$ . Le  $Fe^{2+}$  est le résultat de la réduction de  $Fe^{3+}$  par un antioxydant (Szydłowska-Czerniaka *et al.*, 2008). Ce réactif a été utilisé en quantité excessive pour obtenir un complexe stable (Figure 26).

Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 10 µL de nos extraits à différentes concentrations a été additionné à 50 µL de FeCl<sub>3</sub> (0,2%) et 30 µL de phénanthroline (0,5%), puis 110 µL du méthanol ont été ajoutés. Après incubation à l'obscurité pendant 20 minutes à 30°C, l'absorbance a été mesuré à 510 nm contre un blanc.

Le BHA et le BHT ont été utilisés comme des standards. L'augmentation de l'absorbance due à l'augmentation de la concentration des extraits et ceux des standards nous a permis de calculer la ( $A_{0,5}$   $\mu\text{g/mL}$ ) qui correspond à la concentration de 0,5.



**Figure 26:** Réaction de la 1,10 phénanthroline avec le  $\text{Fe}^{3+}$  après son oxydation en  $\text{Fe}^{2+}$  par un antioxydant.

## 6. Activité antibactérienne

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été inspirées à partir de celles recommandées par l'Institut des Standards Cliniques et des Laboratoires (CLSI, 2009 ; 2012), il s'agit de:

- La technique de diffusion des disques sur milieu solide;
- La technique des dilutions sur milieu liquide.

Seuls les extraits qui ont montré une activité par la méthode des disques ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode de dilution pour une détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

### 6.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide

La méthode des disques permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux composés présents dans nos extraits.

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur un milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes ont été suspendues dans l'eau physiologique 0,85 %.

Ensuite, la suspension a été ajustée au standard 0,5 McFarland avec un spectrophotomètre à 625 nm ce qui correspond à une absorbance de 0,08-0,1 et équivalent à  $10^8$  UFC/ mL.

L'ensemencement a été réalisé par inondation sur milieu Mueller Hinton gélosé. Ensuite, des disques (en papier filtre) stériles de 6 mm de diamètre et préalablement imprégnés par 10  $\mu$ L des extraits à tester à une dose de 512  $\mu$ g/ disque, sont transférés sur la boîte ensemencée.

La gentamycine a été utilisée comme témoin positif. Les boîtes ont été enfin incubées pendant 24h à 37 °C (CLSI, 2012).

La lecture a été effectuée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (exprimés en mm) à l'aide d'une règle graduée (y compris le diamètre des disques) en prenant la moyenne de trois mesures différentes.

## 6.2. Méthode de dilution sur milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'un produit capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie. Nous avons utilisé dans ce test des microplaques stériles à 96 puits, pour déterminer la CMI des extraits par la méthode de microdilution en milieu liquide selon les recommandations de CLSI, (2009).

Une gamme de concentrations décroissantes allant de 10 à 0,019 mg/mL a été préparée. Un volume 100  $\mu$ L de chaque dilution a été déposé dans les puits des microplaques. Les premiers puits de la microplaque ont servi comme contrôles négatifs, ils ont été remplis uniquement par le milieu de culture. Tandis que le dernier puits représente le contrôle positif, rempli uniquement par la suspension bactérienne. 100  $\mu$ L de chaque concentration de l'extrait ont été déposés dans chaque puits contenant 100  $\mu$ L de l'inoculum contenant  $10^6$  cellules/mL préparé dans le bouillon Mueller Hinton pH =  $7,2 \pm 0,2$ .

La lecture a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C à l'œil nu, et la CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé pour laquelle aucun trouble visuel n'est observé.

## 7. Activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'activité des extraits des plantes *G. saharae* et les racines de la plante *G. glabra* vis-à-vis des levures a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide inspirée à partir d'une technique standardisée par le CLSI (Espinel-Ingroff, 2007).

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Mueller Hinton + 2% de glucose + 0,5  $\mu$ g/mL de bleu de méthylène à pH de 7,4. L'inoculum équivalent au 0,5 McFarland a été préparé selon

les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance a été de l'ordre de 0,12-0,15 lue à une longueur d'onde de 530 nm. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage. Les disques ont été déposés après séchage. Les boîtes ont été incubées à 35°C pendant 24h. La lecture a été réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI de la levure a été réalisés de la même manière que celles des bactéries, sauf que le milieu de culture était le RPMI 1640 (additionné avec la glutamine et un indicateur de pH mais dépourvu de bicarbonate)/pH 7,0 supplémenté avec le glucose a une concentration finale de 2% (RPMI 2% G). L'inoculum a été ajusté à une absorbance entre 0,12 à 0,15 lue à 530 nm, ce qui correspond à un inoculum équivalent à  $1-5 \cdot 10^6$  UFC. La lecture a été réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries

### **8. Evaluation de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges**

La mesure de la fuite d'hémoglobine des hématies humaines provoquée par les extraits a été réalisée par la méthode décrite selon **Lee, (2002)**.

- **Préparation de la suspension érythrocytaire**

Du sang fraîchement prélevé sur un tube héparine a été centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse. Après élimination du surnageant, le culot a été lavé 2 fois par une solution de lavage glacée tampon phosphate PBS (10 mM, pH 7,4), puis resuspendu dans la même solution à raison de 2%.

- **Mesure de la fuite l'hémoglobine**

Un volume de 2970  $\mu$ L de la suspension érythrocytaire à 2% a été incubé avec 30  $\mu$ L d'extraits à différentes concentrations pendant 60 minutes dans un incubateur de paillasse type Orbital Shaker Thermo Forma à 37°C.

Des prélèvements de 0,1 mL ont été réalisés chaque 15 minute pour être resuspendus dans 1,9 mL d'une solution de lavage PBS. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 4000 rpm et la fuite de l'hémoglobine intracellulaire a été mesurée par la lecture de l'absorbance du surnageant à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis.

L'hémolyse totale a été obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec le triton X-100. Le tampon seul a été utilisé comme contrôle négatif.

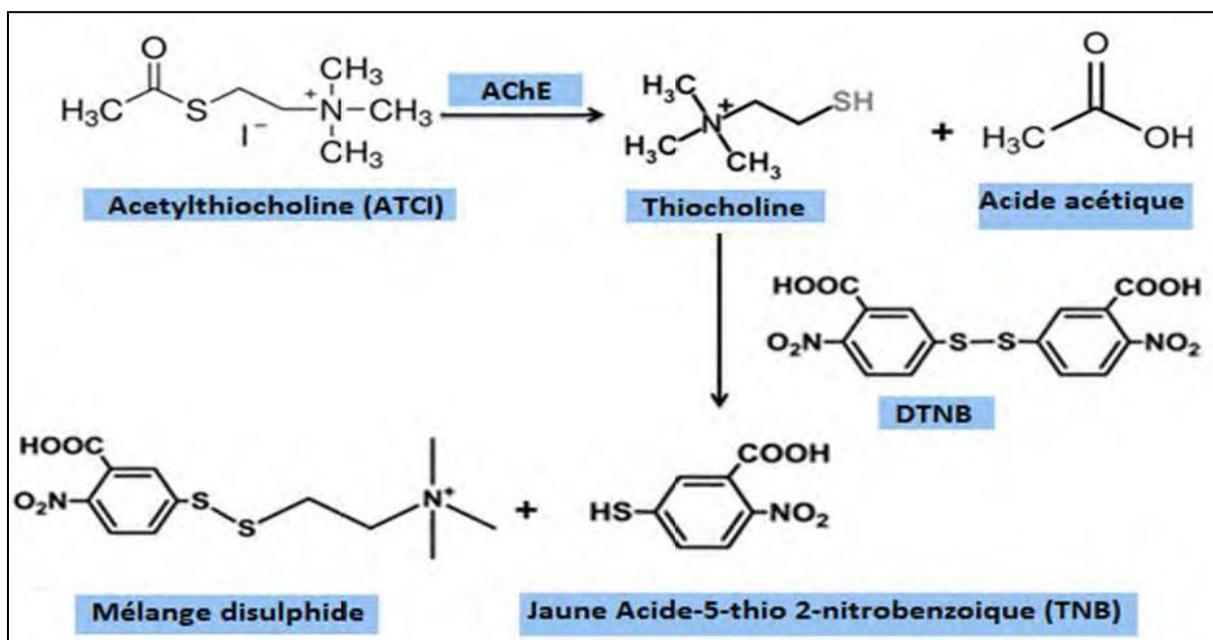
Pour chaque échantillon le pourcentage d'hémolyse a été déterminé par l'équation suivante:

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{A \text{ échantillon} - A \text{ hémolyse spontanée}}{A \text{ hémolyse total} - A \text{ hémolyse spontanée}} \times 100$$

### 9. Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'activité acetylcholinestérase et butyrylcholinestérase a été déterminée par la méthode d'Ellman, (1961) et Rhee *et al.*, (2001).

Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisées, alors que l'iodure d'acétylcholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DNTB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisée pour la mesure de l'activité du cholinestérase (**Figure 27**).



**Figure 27:** Mécanisme d'action de la méthode d'Ellman.

Dans une microplaque 150  $\mu\text{L}$  du tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0) ont été mélangés avec 10  $\mu\text{L}$  des extraits préparés à différentes concentrations. Ensuite, un volume de 20  $\mu\text{L}$  de l'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U) a été mélangé et incubé à 25°C. Après 10  $\mu\text{L}$  de DNTB (0,5 mM) ont été additionnés.

La réaction a été initiée par l'ajout de 20  $\mu\text{L}$  de l'iodure de l'acétylcholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). L'hydrolyse du substrat a été suivies spectrophotométriquement par l'apparition d'une couleur jaune de l'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de DNTB avec thiocholine libéré par hydrolyse enzymatique de l'iodure de l'acétylcholine ou le chlorure de butyrylthiocholine à une

longueur d'onde de 412 nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left[ \frac{(A_c - A_e)}{A_c} \right] \times 100$$

Où  $A_c$  est l'absorbance du control

$A_e$  : représente l'absorbance des échantillons.

La concentration donnant 50% d'inhibition  $CI_{50}$  a été calculée du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. La galantamine a été utilisée comme standard et les tests ont été répétés en triplicatas.

### **10. Analyses statistiques**

Dans ce travail, la validation des résultats des différentes activités ont été effectuées par trois analyses de chaque échantillon et chaque expérience a été réalisée en triple ( $n = 3$ ). La valeur moyenne et l'écart type ont été calculés à partir des données obtenues.

---

## *Résultats et interprétation*

---

## 1. Choix des plantes

Le choix des deux espèces (*Genista saharae* et *Glycyrrhiza glabra*) est justifié par le fait qu'elles sont riches en composés phénoliques notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Le manque d'étude et l'endémisme de la l'espèce *Genista saharae* (Coss. & Dur.) au Sahara dont le climat est le type d'écosystème qui offrent des caractéristiques et des spécificités non-négligeable à la végétation.

## 2. La partie aérienne de la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.).

### 2.1. Dosage des composés phénoliques de la partie aérienne de la plante *G. saharae*

Les résultats relatifs au dosage des polyphénols, flavonoïdes totaux et tanins condensés sont exprimés en microgramme équivalent acide gallique, quercétine et catéchine respectivement par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG, EQ et EC/mg E). Les résultats sont calculés en utilisant l'équation de la régression linéaire des courbes d'étalonnages des standards.

Le **tableau 02** représente les teneurs des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* en composés phénoliques. Nous constatons que l'extrait n-butanol a été le plus riche en polyphénols totaux ( $163,79 \pm 91,54 \mu\text{g}$  EAG/mg E) par rapport aux autres extraits: chloroformique, acétate d'éthyle et l'extrait brut.

Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux des différents extraits de la plante *G. saharae*, ont révélé que l'extrait chloroformique renferme le taux le plus élevé en flavonoïdes  $117,83 \pm 8,25 \mu\text{g}$  EQ/mg E, suivie par l'extrait d'acétate d'éthyle, n-butanol puis l'extrait brut.

D'après les résultats obtenus pour le dosage des tannins condensés, nous remarquons que l'extrait chloroformique et l'extrait brut renferment les teneurs les plus élevées et sont de l'ordre de  $37,86 \pm 0,023$  et  $30,98 \pm 0,048 \mu\text{g}$  EC/mg E respectivement. Les extraits d'acétate d'éthyle et le n-butanol ont révélé les taux les plus faibles.

**Tableau 02:** Teneurs en composés phénoliques des extraits de la plante *G. saharae*.

Extraits de <i>G. saharae</i>	PT <sup>a</sup> (µg EAG/mg E)	FT <sup>a</sup> (µg EQ/mg E)	TC <sup>a</sup> (µg EC/mg E)
Extrait brut	55,92 ± 3,76	30,33 ± 4,16	30,98 ± 0,048
Extrait chloroformique	66,25 ± 4,34	117,83 ± 8,25	37,86 ± 0,023
Extrait d'acétate Ethyle	57,83 ± 1,81	51,50 ± 8,72	12,24 ± 0,012
Extrait n-butanolique	163,79 ± 91,54	32,33 ± 1,04	9,69 ± 0,046

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

\*PT : Polyphénols totaux exprimés en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg E).

\*FT : Flavonoïdes totaux exprimés en microgramme équivalent quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg E).

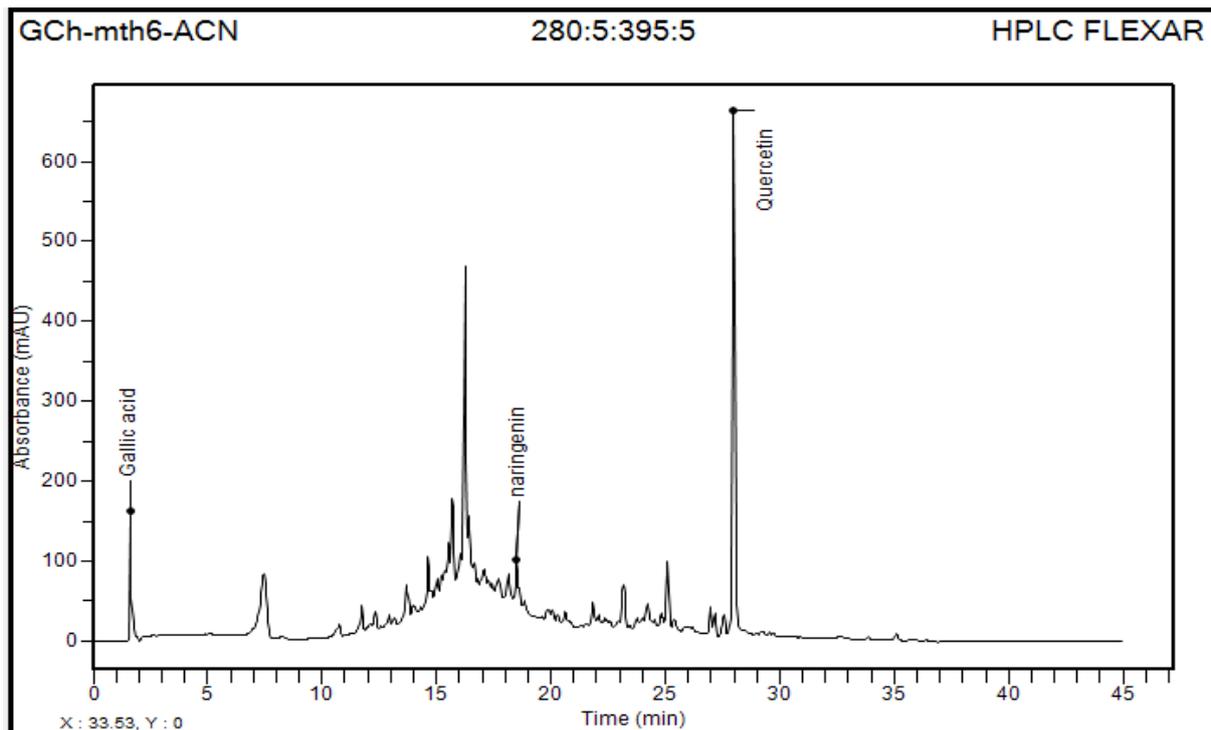
\*TC : Tanins condensés exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/mg E).

## 2.2. Analyse par RP-HPLC-PDA

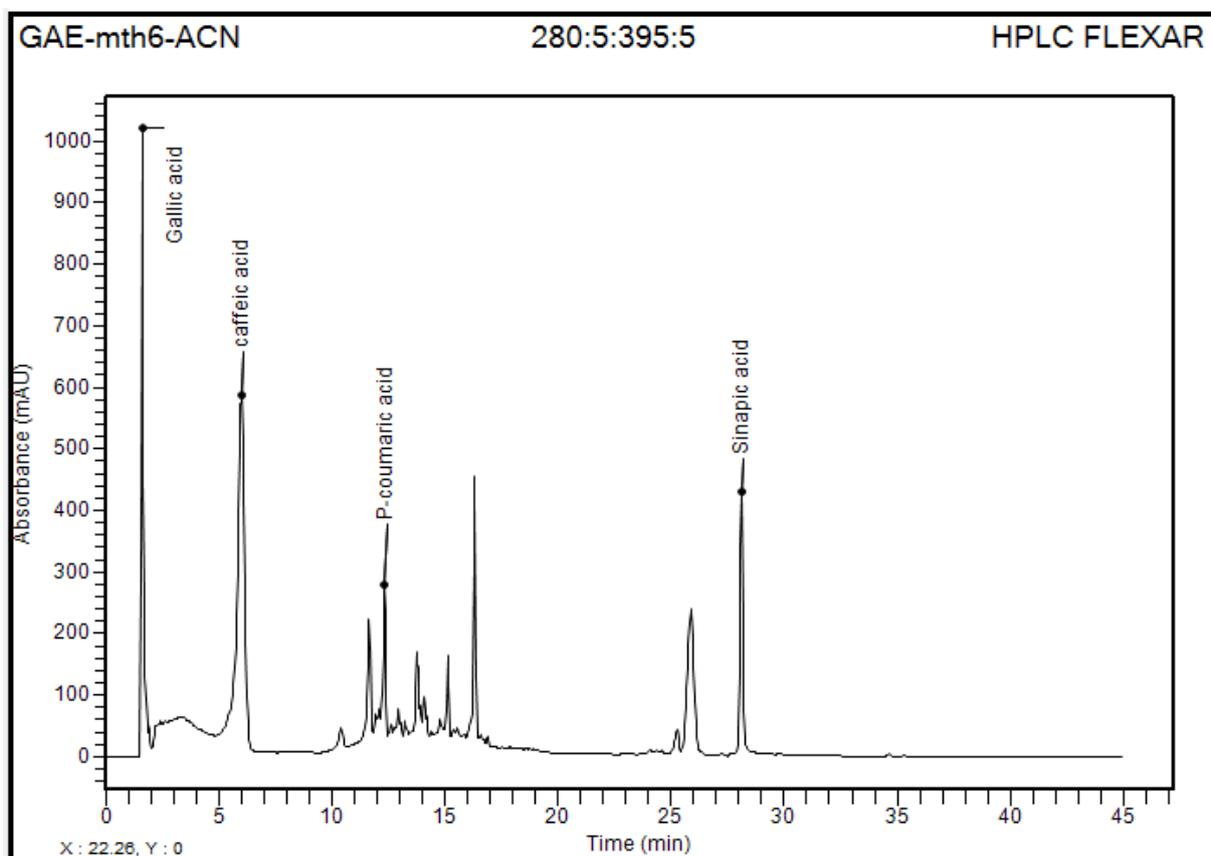
Pour la détection des composés phénoliques nous avons opté pour l'utilisation d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Une technique adaptée pour la séparation des phytoconstituants (Jiri *et al.*, 2013). Elle permet la séparation, l'identification et la quantification simultanées des composés phénoliques (Tomás-Barberán *et al.*, 1990). Le principe de la séparation d'une HPLC repose sur la répartition des analytes entre la phase stationnaire et la phase mobile en fonction de la polarité des composés.

Les deux extraits chloroformiques (GCh) et acétates d'éthyles (GAE) de la partie aérienne de la plante *G. saharae* ont été analysés par RP-HPLC-PDA. Les chromatogrammes résultant obtenus à 280 nm sont représentés dans la **figure 28** et la **figure 29** respectivement.

Plusieurs pics principaux obtenus ont une absorption intense à la longueur d'onde sélectionnée. Les figures montrent que l'extrait chloroformique contient des flavonoïdes de la classe des flavanones (naringinine) et un composé de la classe des flavonols (quercétine) en plus de l'acide gallique alors que l'extrait acétate d'éthyle contient des composés phénoliques, en particulier des acides phénoliques comme l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique.



**Figure 28:** Chromatogramme de la RP-HPLC-PDA de l'extrait chloroformique de la plante *G. saharae*.

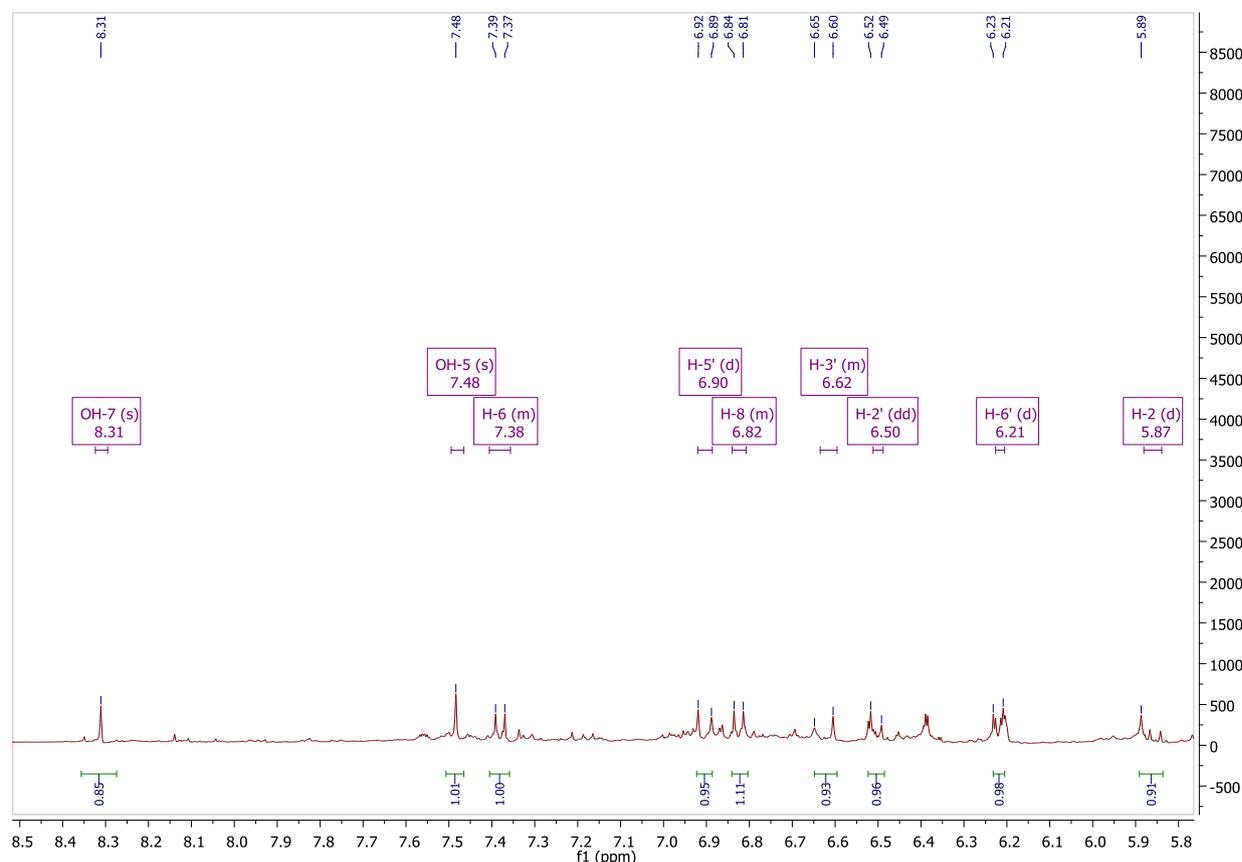


**Figure 29:** Chromatogramme de la RP-HPLC-PDA de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *G. saharae*.

### 2.3. Spectroscopie RMN

L'analyse de la fraction G4 issue de l'extrait chloroformique de la plante *G. saharae* a été réalisée en la solubilisant dans le solvant  $\text{CDCl}_3$  et en utilisant le TMS (tétraméthylsilane) comme étalon interne. Le spectre RMN de cette fraction (**Figure 30** et **Figure 31**) a montré que les signaux de proton et carbone (RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ) représentent celle de la génistéine (**Figure 32**) les signaux enregistrés sont comme suit:

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.31 (s, 1H, OH-7), 7.48 (s, 1H, OH-5), 7.41 – 7.36 (m, 1H, H-6), 6.90 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H, H-5'), 6.84 – 6.81 (m, 1H, H-8), 6.63 – 6.60 (m,  $J = 9.9, 5.6$  Hz, 1H, H-3'), 6.50 (dd,  $J = 4.8, 2.8$  Hz, 1H, H-2'), 6.21 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-6'), 5.87 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, H-2).



**Figure 30:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction G4 de l'extrait chloroformique.

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  179.01 (C4), 166.94 (C3), 162.52 (C1'), 157.95 (C7), 150.81 (C4a), 144.82 (C5), 135.41 (C4'), 130.18 (C6), 128.22 (C2), 121.93 (C8a), 116.96 (C8), 104.89 (C3'), 103.86 (C5'), 99.49 (C6'), 94.47 (C2').

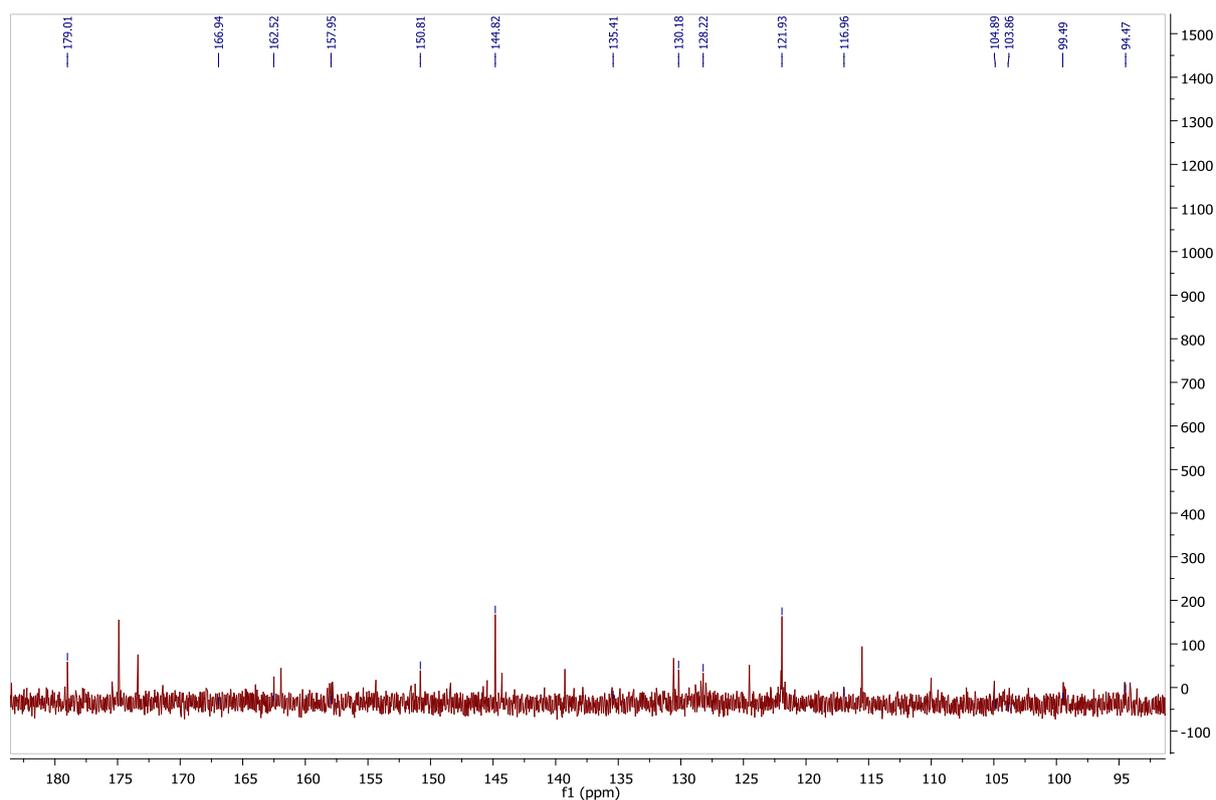


Figure 31: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction G4 de l'extrait chloroformique.

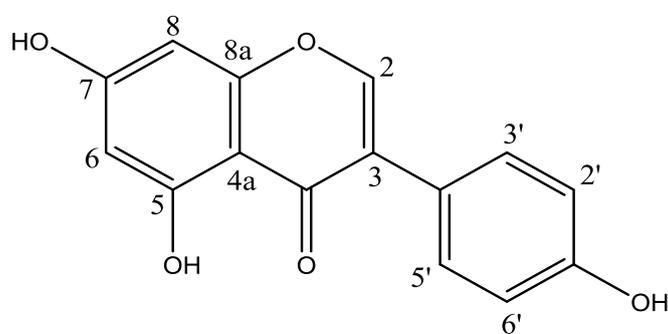


Figure 32: Structure de la génistéine isolée de la fraction G4 de l'extrait chloroformique.

## 2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

### 2.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

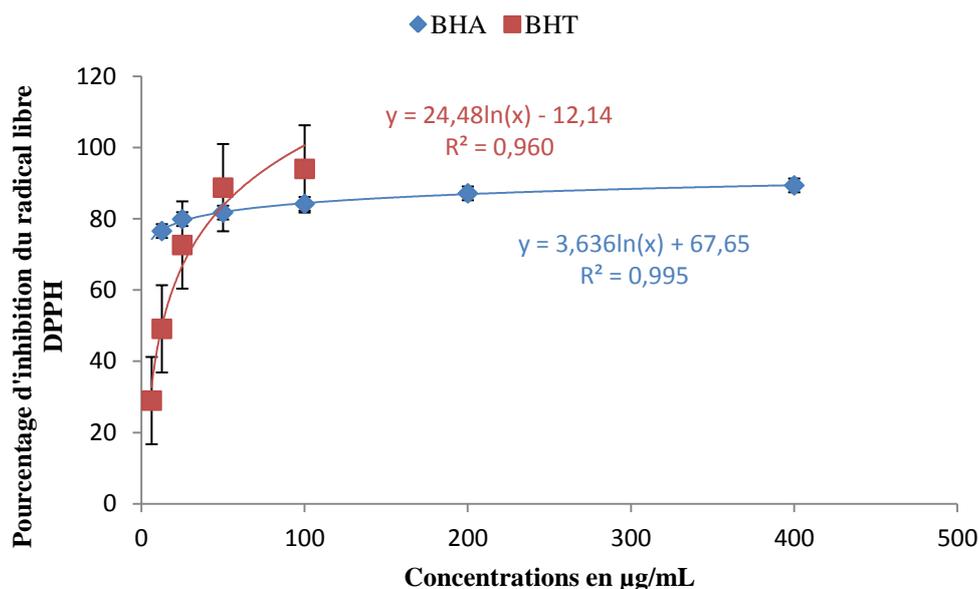
L'activité antiradicalaire des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de chaque extrait. Les valeurs des absorbances obtenues nous ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition.

La  $CI_{50}$  se définit par une concentration médiane d'inhibition du radical. Elle a été déterminée à partir des équations de régressions logarithmiques de courbes tracées illustrées dans les **Figures 33 et 34**. Les résultats des  $CI_{50}$  sont représentés dans le **tableau 03**.

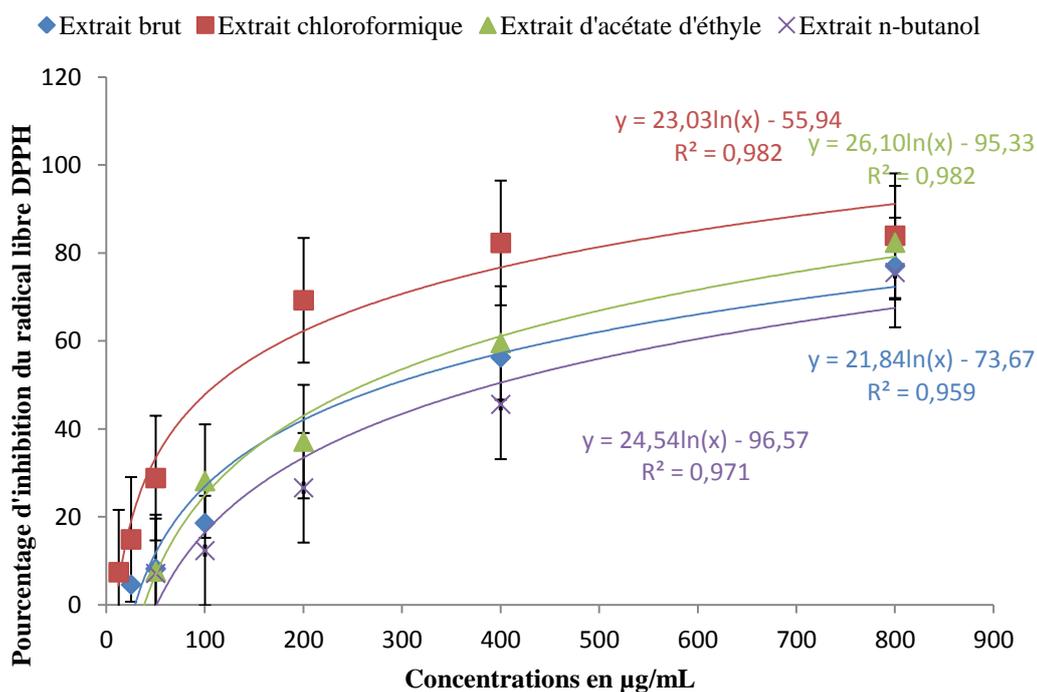
Les résultats ont montré une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des standards BHA et BHT et des extraits testés.

Nous constatons que l'extrait chloroformique de la plante *G. saharae* a montré la meilleure activité antiradicalaire avec une  $CI_{50}$  d'environ  $122 \pm 1,52 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Les  $CI_{50}$  sont classées dans l'ordre suivant:

Extrait chloroformique < extrait d'acétate d'éthyle < extrait brut < extrait n-butanolique. Cependant, les concentrations des antioxydants de synthèses BHA et BHT nécessaires pour réduire 50% du radical DPPH étaient nettement inférieures à celle des extraits. Ces résultats obtenus peuvent être expliqués par la richesse des extraits chloroformique et acétate d'éthyle (extraits les plus actifs) en composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes.



**Figure 33:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.



**Figure 34:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de la plante *G. saharae*.

**Tableau 03:** Valeurs  $CI_{50}$  des extraits de plante *G. saharae*.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Piégeage du radical libre DPPH					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>349,05 ± 1,66</b>	<b>122,86 ± 1,52</b>	<b>322,76 ± 8,78</b>	<b>462,34 ± 7,57</b>	<b>6,14 ± 0,41</b>	<b>12,99 ± 0,41</b>

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

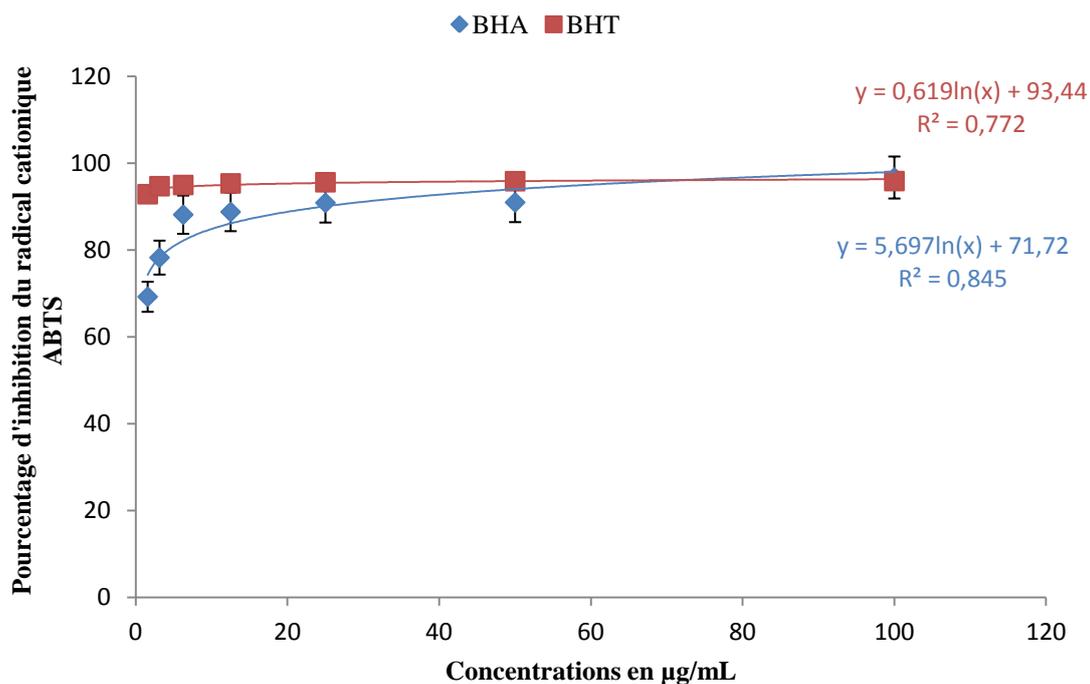
<sup>b</sup>Composés de références.

#### 2.4.2. Piégeage du radical ABTS

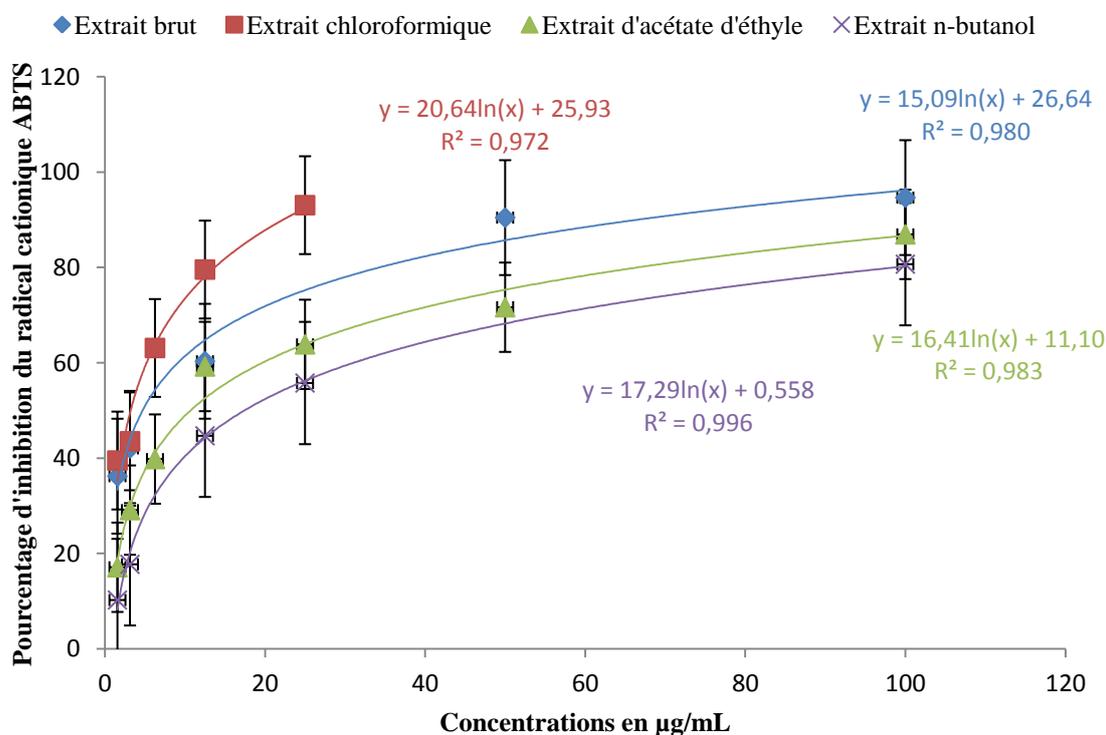
La décoloration du radical ABTS a été déterminée par le pourcentage d'inhibition du cation radicalaire  $ABTS^{+\cdot}$  en fonction de la concentration des différents extraits. Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS et les  $CI_{50}$  sont illustrés dans la **figure 35, 36** et le **tableau 04**.

Les résultats nous montrent que l'extrait chloroformique et l'extrait brut ont été les plus efficaces dans la réduction du radical cationique ABTS avec une  $CI_{50}$  d'environ  $4,03 \pm 0,15$  ;  $4,31 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$  respectivement, suivis par l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol. Cependant, nos résultats sont relativement proches de ceux des standards BHA et BHT.

Dans cette étude, la teneur en composés phénoliques déterminée varie selon les extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae*. Nous avons constaté que le type de solvants utilisé affecte la quantité et la qualité des phytoconstituants extraits en séparant et en épuisant la charge des métabolites contenus dans l'extrait brut. Cela suggère une corrélation entre le taux des composés phénoliques de chaque extrait et l'activité de piégeage des radicaux libres. Cependant, l'extrait chloroformique possède le taux le plus élevé en flavonoïdes particulièrement les isoflavonoïdes qui sont responsables de cette activité antioxydante



**Figure 35:** Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.



**Figure 36:** Pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des extraits de la plante *G. saharae*.

**Tableau 04:** Résultats des  $CI_{50}$  des extraits de plante *G. saharae* par la méthode du piégeage du radical ABTS.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Piégeage du radical cationique ABTS					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>4,31 ± 0,01</b>	<b>4,03 ± 0,15</b>	<b>9,58 ± 0,53</b>	<b>18,45 ± 0,41</b>	<b>1,29 ± 0,30</b>	<b>1,81 ± 0,10</b>

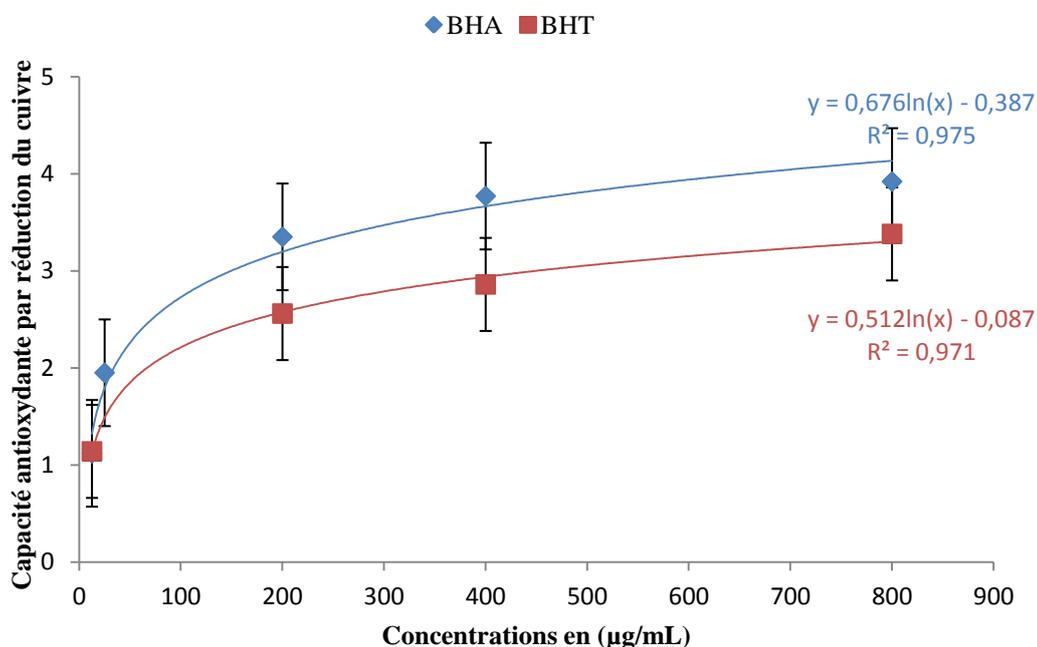
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références

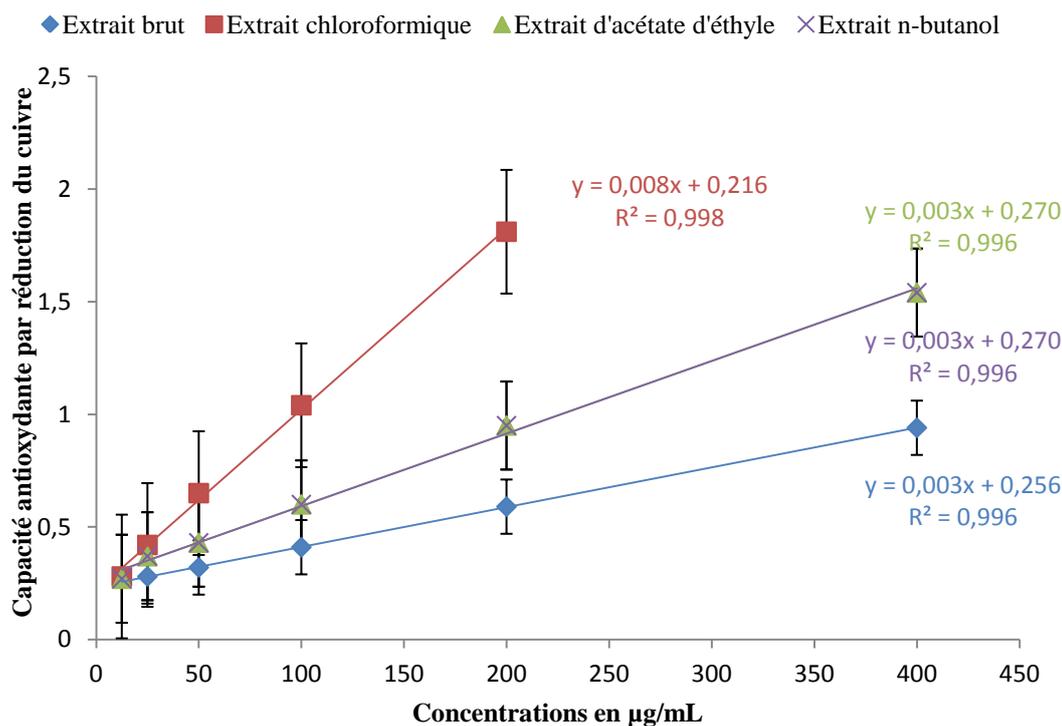
### 2.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les figures 37 et 38 montrent les résultats de la capacité de réduction du cuivre des standards et des extraits de la plante *G. saharae*. Nous remarquons que l'extrait chloroformique a manifesté une forte activité avec une  $A_{0,5}$  d'environ  $35,63 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$  suivie par l'extrait d'acétate d'éthyle. Toutefois, les résultats des antioxydants de synthèse sont inférieurs à ceux des extraits de la plante *G. saharae*.

L'ordre de réduction du cuivre par les différents extraits est classé comme suit: extrait chloroformique < extrait acétate d'éthyle < extrait brut < extrait n-butanol.



**Figure 37:** Capacité de réduction du cuivre des standards BHA et BHT.



**Figure 38:** Capacité de réduction du cuivre des extraits de la plante *G. saharae*.

Les résultats obtenus nous ont permis ensuite de déterminer la concentration efficace qui correspond à l'absorbance 0,5 ou la ( $A_{0,5}$ ). Les résultats sont représentés dans le **tableau 05**.

**Tableau 05:** Résultats des  $A_{0,5}$  des extraits de la plante *G. saharae* par la méthode CUPRAC.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$A_{0,5}$ (µg/mL)	<b>92,44 ± 0,84</b>	<b>35,63 ± 1,42</b>	<b>89,89 ± 4,67</b>	<b>99,22 ± 3,56</b>	<b>5,35 ± 0,71</b>	<b>8,97 ± 3,94</b>

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

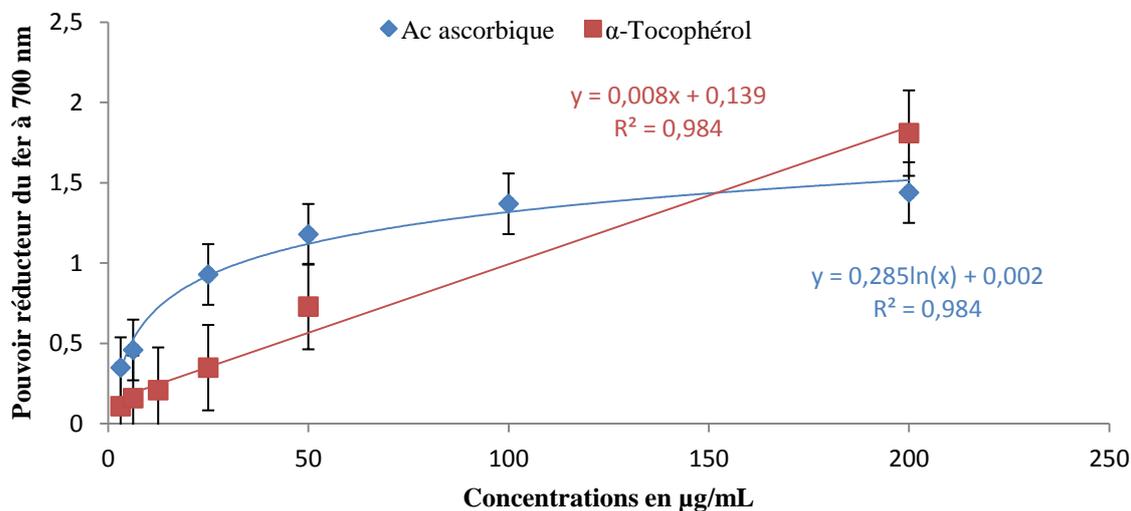
#### 2.4.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Les résultats du pouvoir réducteur du fer des extraits de la plante *G. saharae* et des standards sont représentés dans les **figures 39** et **40**. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes. À partir de ces courbes nous avons déterminé la valeur  $A_{0,5}$  en utilisant l'équation des graphes correspondants (**Tableau 06**).

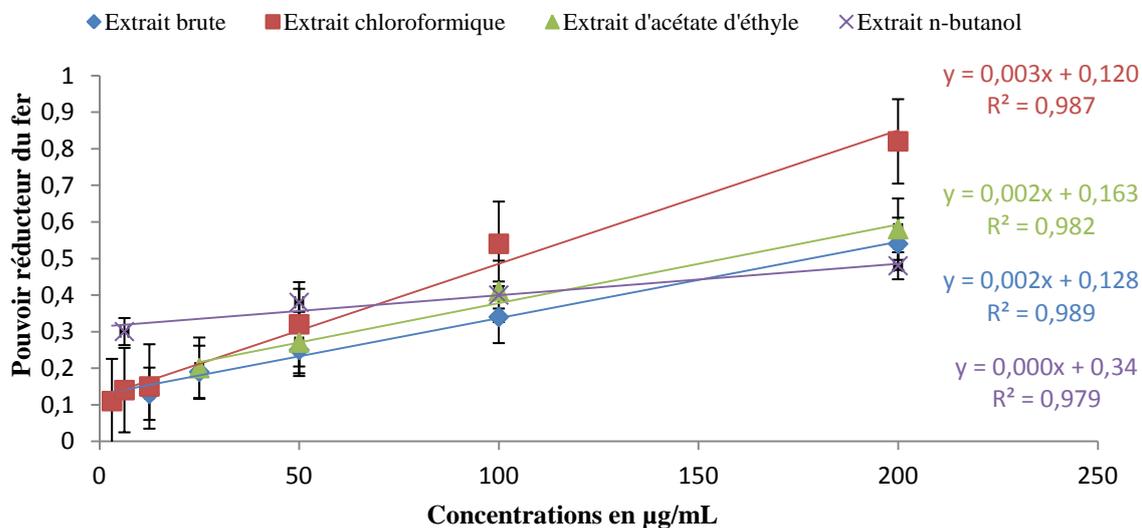
Nous constatons que l'extrait chloroformique présente un potentiel de réduction de fer intéressant avec une  $A_{0,5}$  de  $86,22 ± 1,35$  µg/mL suivie de l'extrait d'acétate d'éthyle

$140,59 \pm 7,63 \mu\text{g/mL}$ . Tandis que, l'extrait brut et l'extrait n-butanol ont montré une faible capacité à réduire le fer.

L'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol ont manifesté des capacités de réduction plus intéressantes par rapport à nos extraits.



**Figure 39:** Pouvoir réducteur du fer des standards.



**Figure 40:** Pouvoir réducteur du fer des extraits de la plante *G. saharae*.

**Tableau 06:** Pouvoir réducteur du fer des extraits de plante *G. saharae* par la méthode FRAP.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Pouvoir réducteur du fer (FRAP)					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	Acide ascorbique <sup>b</sup>	$\alpha$ -Tocophérol <sup>b</sup>
A <sub>0,5</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	199,50 $\pm$ 3,00	86,22 $\pm$ 1,35	140,59 $\pm$ 7,63	>200	6,77 $\pm$ 1,15	34,93 $\pm$ 2,38

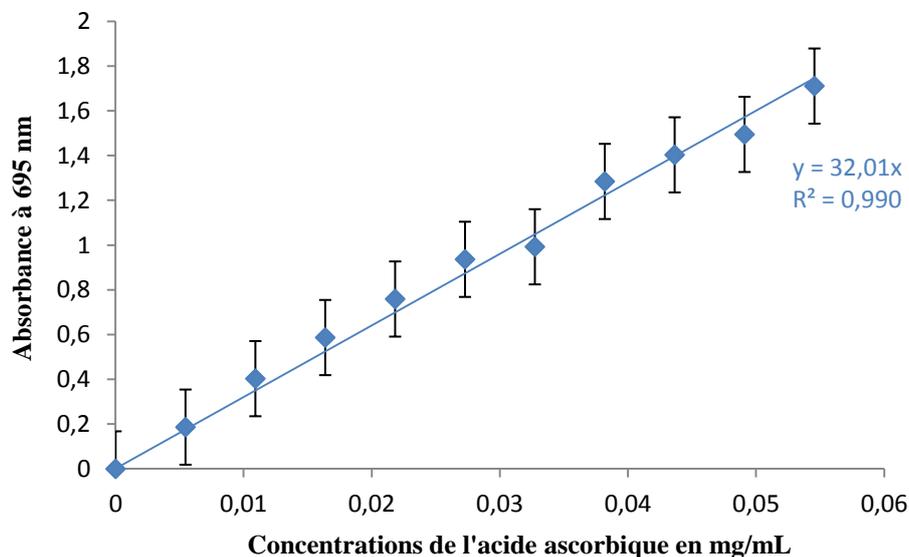
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

#### 2.4.5. Capacité antioxydante totale (CAT)

Cette méthode est basée sur la réduction du ( $\text{Mo}^{6+}$ ) au ( $\text{Mo}^{5+}$ ) par les composés antioxydants et la formation d'un complexe vert phosphate/ ( $\text{Mo}^{5+}$ ) à pH acide.

La capacité antioxydante totale des différents extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* est exprimée par rapport au nombre d'équivalent acide ascorbique. Les résultats sont regroupés dans la **figure 41**. L'activité antioxydante de l'extrait chloroformique de la plante *G. saharae* est légèrement élevée par rapport aux autres extraits (**Tableau 07**). Cette activité a été attribuée aux teneurs en composés phénoliques probablement en raison de leurs propriétés rédox, ce qui leur permet d'agir en tant qu'agents réducteurs.

**Figure 41:** Capacité antioxydante totale de l'acide ascorbique.

**Tableau 07:** Capacité antioxydante totale des différents extraits de *G. saharae*.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Extrait brut	Extrait chloroformique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanolique
CAT <sup>a</sup> (mg EAA/g E)	<b>6,34 ± 0,002</b>	<b>8,50 ± 0,001</b>	<b>6,20 ± 0,000</b>	<b>6,29 ± 0,002</b>

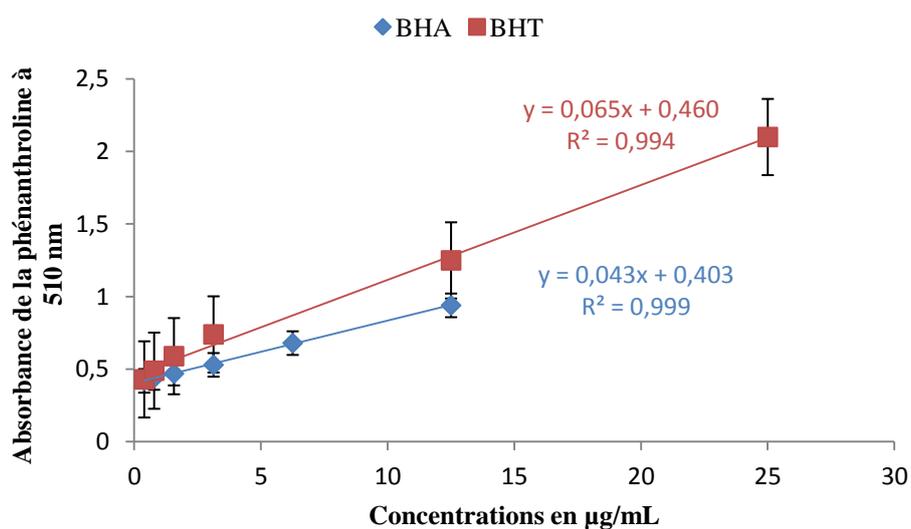
<sup>a</sup>Valeurs exprimées en moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

#### 2.4.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline

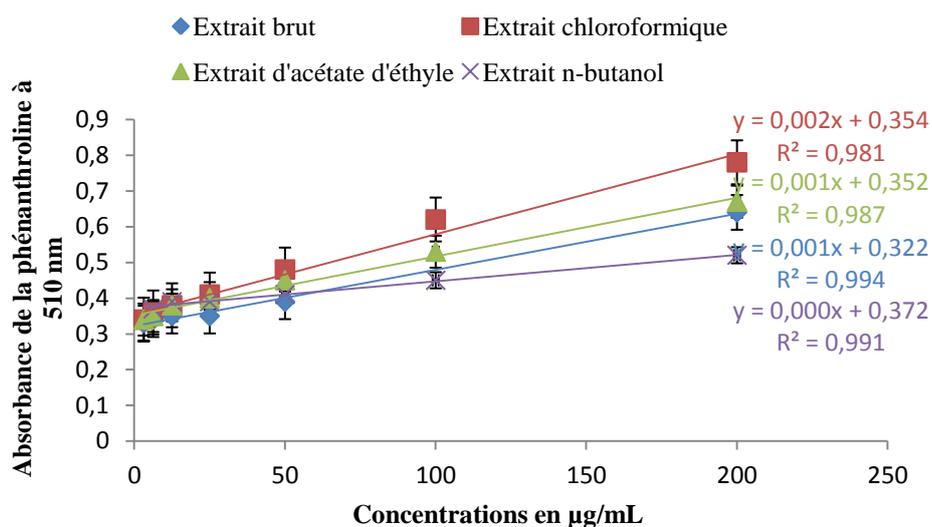
Cette technique est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par l'agent antioxydant, le  $\text{Fe}^{2+}$  ainsi formé réagit à son tour avec la 1,10-phénanthroline pour former le complexe de ferroïne. La concentration de ce complexe orange est déterminée à 510 nm.

Nous remarquons que l'absorbance est proportionnelle à la concentration dans l'ensemble des extraits (**Figure 42 et 43**). D'après les valeurs  $A_{0,5}$  obtenues, nous remarquons que le pouvoir réducteur le plus important a été enregistré avec l'extrait chloroformique. Cependant, les autres extraits possèdent des  $A_{0,5}$  plus faibles par rapport à l'extrait chloroformique (**Tableau 08**).

En comparant les  $A_{0,5}$  des extraits avec celles des antioxydants de synthèse BHA et BHT, il apparaît que les standards sont les plus puissants.



**Figure 42:** Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les standards BHA et BHT.



**Figure 43:** Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les extraits de la plante *G. saharae*.

**Tableau 08:** Résultats  $A_{0,5}$  des différents extraits de la plante *G. saharae* par la méthode de la phénanthroline.

Extraits de <i>G. saharae</i>	Absorbance de la phénanthroline à 510 nm					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$A_{0,5}$ (µg/mL)	>200	75,67 ± 5,01	142,33 ± 1,53	149,00 ± 5,00	2,24 ± 0,17	0,93 ± 0,07

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

## 2.5. Activité antibactérienne

### 2.5.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée dans un premier temps par la technique de diffusion de disque sur milieu Mueller-Hinton gélosé. C'est une technique qualitative permettant de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (mm), qui apparaît autour des disques imprégnés des extraits de la plante.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions des extraits de la partie aérienne de la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.) vis-à-vis des souches bactériennes (Gram+ et Gram-) sont représentés dans le **tableau 09**.

Les résultats obtenus montrent l'existence d'une modeste activité de nos extraits. L'extrait chloroformique a été le plus efficace contre toutes les souches bactériennes à Gram négatif

(7 à 8 mm), à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

L'extrait de l'acétate d'éthyle a présenté une activité vis-à-vis d'*E. cloacae* ATCC 13047 avec un diamètre de zone d'inhibition de 8 mm. L'extrait n-butanol a montré une activité vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 8739 avec une zone d'inhibition de 8 mm.

En ce qui concerne les bactéries à Gram positif, toutes les souches ont montré une résistance à nos extraits, mise à part la souche *S. aureus* ATCC 6538 qui s'est révélée sensible à tous les extraits présentant un diamètre de zone d'inhibition compris entre 7 et 9 mm. Cependant l'extrait chloroformique a enregistré une meilleure sensibilité vis-à-vis de la souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633 avec un diamètre de zone d'inhibition d'environ 10 mm.

**Tableau 09:** Activité antibactérienne des extraits de la plante *G. saharae* par la méthode de diffusion des disques.

Extraits  Bactéries		Infusion de l'extrait hydrométhanolique				Gent (mm)
		Extrait brut	Extrait CHCl <sub>3</sub>	Extrait AE	Extrait n-butanol	
Bactéries Gram négatives	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6	8	6	8	22
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	6	6	6	6	19
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	6	6	6	12
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	8	8	6	6	35
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	6	8	6	6	18
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	6	7	6	6	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	6	8	6	6	22
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	6	7	8	6	21
Bactéries Gram positives	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9	9	7	8	32
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	6	7	6	6	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6	10	6	6	22
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	6	8	6	6	21
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	6	7	6	6	22
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	6	6	6	6	22

(6 mm) : présente le diamètre de disque (pas d'activité).

Gent: Gentamicine composé de référence.

### 2.5.2. Méthode de microdilution sur milieu liquide (CMI)

Les résultats des CMI vis-à-vis des souches ayant donné des résultats positifs par la méthode de diffusion des disques sont présentés dans le **tableau 10**. Nous remarquons que l'extrait chloroformique a montré l'activité antibactérienne la plus forte avec une CMI d'environ 19,5 µg/mL suivi de l'extrait n-butanol où les CMI étaient de 312,5 µg/mL vis-à-vis des souches *E. coli* et *S. aureus*.

En ce qui concerne l'extrait brut hydrométhanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle, les souches *baumanni*, *S. aureus* et *E. cloacae* ont montré de faibles CMI supérieures à 312,5 µg/mL.

On peut dire que les micro-organismes réagissent de différentes manières, que ce soit par la nature de l'extrait ou par le degré de résistance et de sensibilité d'une même substance.

**Tableau 10:** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae*.

Souches	Extrait brut (µg/mL)	Extrait CHCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Extrait AE (µg/mL)	Extrait n-butanol (µg/mL)	Gentamicine (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>312,5	19,5	>312,5	312,5	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,65
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,19
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,65
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	2,60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	>312,5	19,5	>312,5	312,5	0,19
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,19
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,65
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	2,6
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	>312,5	19,5	>312,5	>312,5	0,19

## 2.6. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique des extraits de la plante *G. saharae* a été également recherchée par la technique de diffusion des disques sur milieux gélose Muller-Hinton supplémenté vis-à-vis de trois souches de référence de *Candida albicans*. Les diamètres des zones d'inhibition mesurés sont regroupés dans le **tableau 11**.

Nous observons que l'extrait chloroformique exerce une meilleure activité antifongique vis-à-vis de toutes les levures testées et les diamètres d'inhibitions sont compris entre 12 et 8 mm.

L'extrait brut et l'extrait d'acétate d'éthyle présentent également un effet antifongique vis-à-vis des levures *Candida albicans* IP 444 et *Candida albicans* 26790 avec des diamètres de zone d'inhibition de l'ordre de 9 mm et 7 mm respectivement. Il est à noter également que l'extrait n-butanol n'exerce aucune activité antifongique.

**Tableau 11:** Diamètres des zones d'inhibition des extraits de la plante *G. saharae* vis-à-vis des levures testées.

Extractions de <i>G. saharae</i> Levures	Extrait brut	Extrait chloroformique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	AMB
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	6	12	7	6	21,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	8	6	6	15
<i>Candida albicans</i> IP 444	9	9	6	6	20

Les résultats des CMI vis-à-vis des levures sont représentés dans le **tableau 12**. Nous observons que les extraits exercent une faible activité antifongique avec une CMI de 10 mg/mL.

**Tableau 12:** Concentration Minimale Inhibitrice des extraits de la plante *G. saharae* vis-à-vis des levures testées.

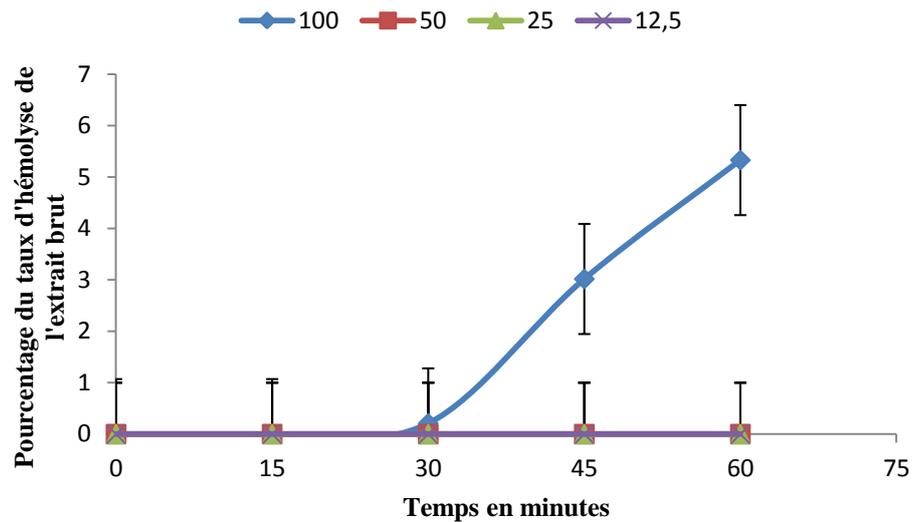
Extractions de <i>G. saharae</i> Levures	Extrait brut (mg/mL)	Extrait chloroformique (mg/mL)	Extrait d'acétate d'éthyle (mg/mL)	Extrait n-butanol (mg/mL)	AMB (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	>10	10	10	>10	0,8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>10	10	>10	>10	0,4
<i>Candida albicans</i> IP 444	10	10	>10	>10	2

## 2.7. Evaluation de l'activité hémolytique

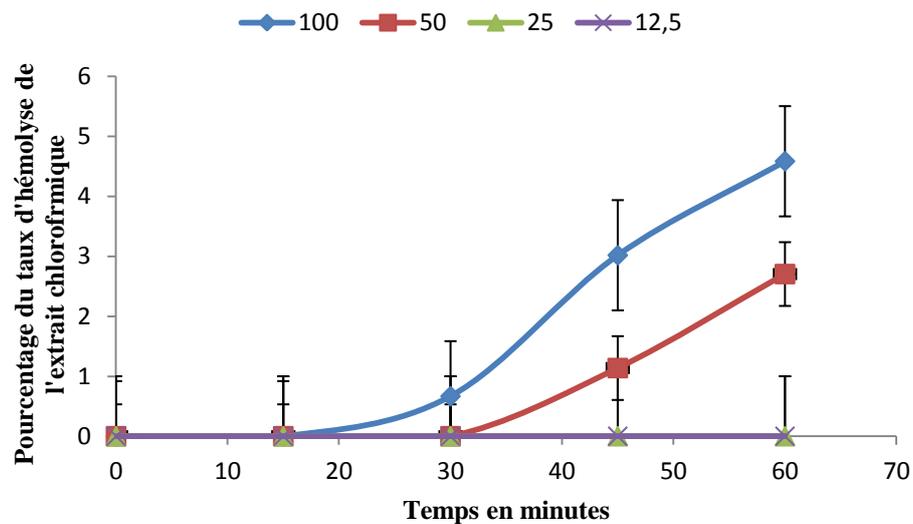
Les figures 44, 45, 46 et 47 représentent l'effet des différentes concentrations des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* sur la fuite d'hémoglobine des globules rouges humaines. Afin de comprendre le comportement de ces composés au cours du temps, l'effet cytotoxique a été suivi pendant 60 min à 37°C.

Les résultats révèlent l'existence d'une relation dose-réponse entre les concentrations des différents extraits et leurs effets cytotoxiques. Les concentrations 25 et 12,5 µg/mL des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* ne provoquent pratiquement pas de lyse de globules rouges pendant la période d'incubation. Les taux d'hémolyse qui varient entre 0% et 0,69% pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Cependant, les concentrations 100 et 50 µg/mL ont montré une élévation des taux d'hémolyses qui sont presque identiques pour l'extrait brut et l'extrait n-butanol qui ont passé à 5,33% pour l'extrait brut et à 5,38% pour l'extrait n-butanol durant les 60 min.

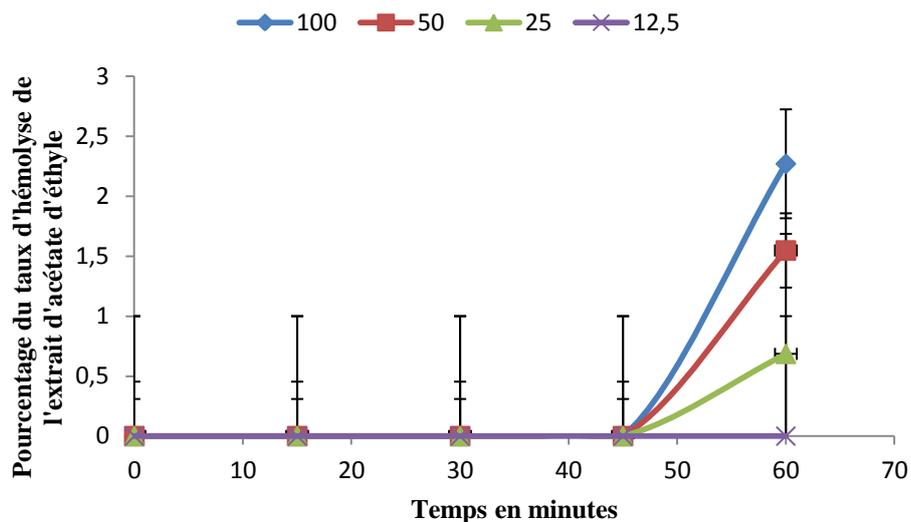
Concernant, les mêmes concentrations 100 et 50 µg/mL de l'extrait chloroformique et d'acétate d'éthyle, ces derniers ont révélé un taux d'hémolyse plus bas que les autres avec des taux qui varient de 0% à 4,58% pour l'extrait chloroformique et de 0% à 2,27% pour l'extrait d'acétate d'éthyle après 60 min d'incubation. Nous observons aussi que les taux d'hémolyse de l'extrait chloroformique ont été presque le double des taux d'hémolyse de l'extrait d'acétate d'éthyle 4,58% et 2,27% pour la concentration de 100 µg/mL et 2,70% et 1,55% pour la concentration 50 µg/mL dans le temps 60 min. ces taux d'hémolyses les plus élevés ne dépassent pas 5,38% pour l'ensemble des extraits testés, et de ce fait ils sont considérés comme inoffensifs vis-à-vis des globules rouges humains.



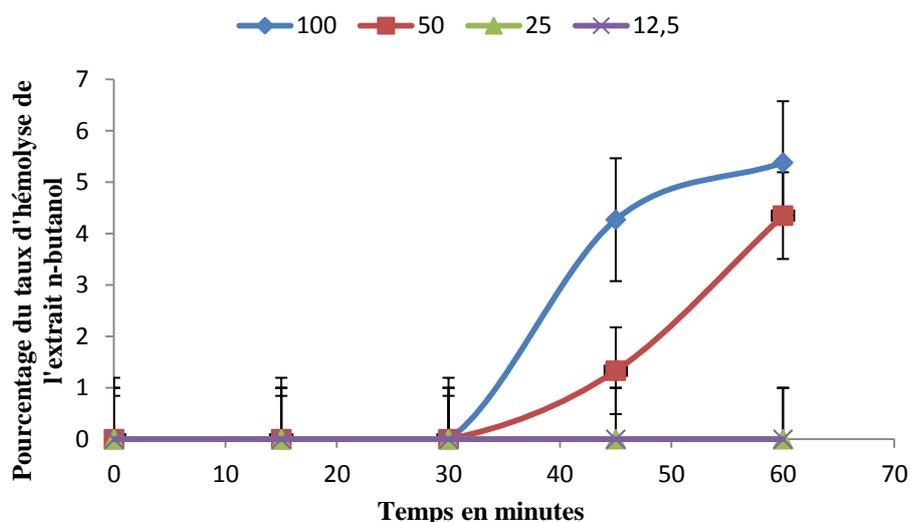
**Figure 44:** Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut de la partie aérienne de la plante *G. saharae*.



**Figure 45:** Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la partie aérienne de la plante *G. saharae*.



**Figure 46:** Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante *G. saharae*.



**Figure 47:** Evolution des taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'extrait n-butanol de la partie aérienne de la plante *G. saharae*.

## 2.8. Evaluation de l'activité anticholinestérase

### 2.8.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE)

Les résultats obtenus ont montré que les extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* n'exercent pas un pouvoir inhibiteur sur enzymes de l'anticholinestérase à savoir l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase empêchant de déclencher la maladie.

### 3. Les racines de la plante *Glycyrrhiza glabra* L.

#### 3.1. Dosage des composés phénoliques des racines de la plantes *Glycyrrhiza glabra* L.

Le **tableau 13** rapporte les teneurs en composés phénoliques dans les extraits des racines de la plante *Glycyrrhiza glabra* L. Ces résultats montrent que les teneurs en composés phénoliques varient considérablement entre les extraits où l'extrait d'acétate d'éthyle possède la teneur la plus élevée  $71,75 \pm 5,17 \mu\text{g EAG/ mg E}$ . Par contre, nous constatons que la teneur en flavonoïdes et en tanins condensés dans l'extrait chloroformique des racines de la plante *G. glabra* est nettement supérieure à celle des autres extraits.

**Tableau 13:** Teneurs en composés phénoliques de racine de la plante *G. glabra*.

Extraits de racine de <i>G. glabra</i>	PT <sup>a</sup> ( $\mu\text{g EAG/mg E}$ )	FT <sup>a</sup> ( $\mu\text{g EQ/mg E}$ )	TC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g EC/mg E}$ )
Extrait brut	$60,63 \pm 6,13$	$81,83 \pm 6,03$	$12,59 \pm 0,006$
Extrait chloroformique	$65,75 \pm 6,87$	$103,8 \pm 0,12$	$86,83 \pm 0,043$
Extrait d'acétate Ethyle	$71,75 \pm 5,17$	$79,56 \pm 0,15$	$32,96 \pm 0,056$
Extrait n-butanolique	$28,75 \pm 5,77$	$8,47 \pm 0,023$	$2,95 \pm 0,038$

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles.

\*PT : Polyphénols totaux exprimés en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg E}$ ).

\*FT : Flavonoïdes totaux exprimés en microgramme équivalent quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg E}$ ).

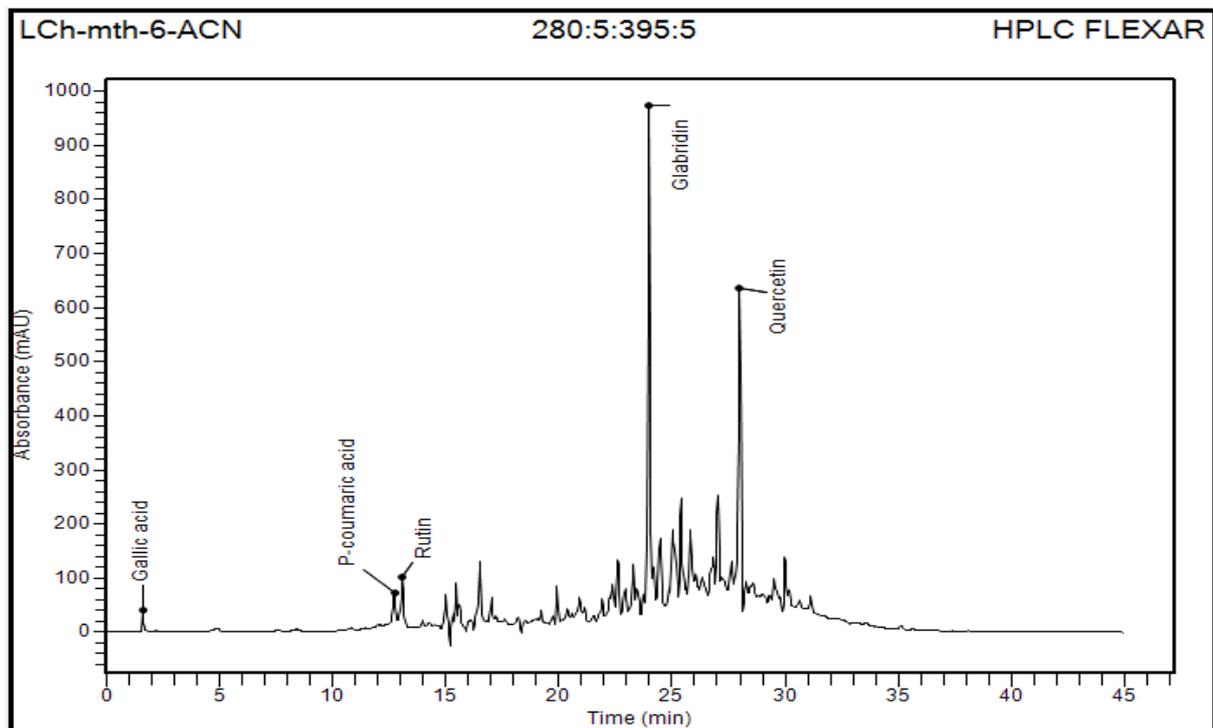
\*TC : Tanins condensés exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EC/mg E}$ ).

#### 3.2. Analyse de la RP-HPLC-PDA

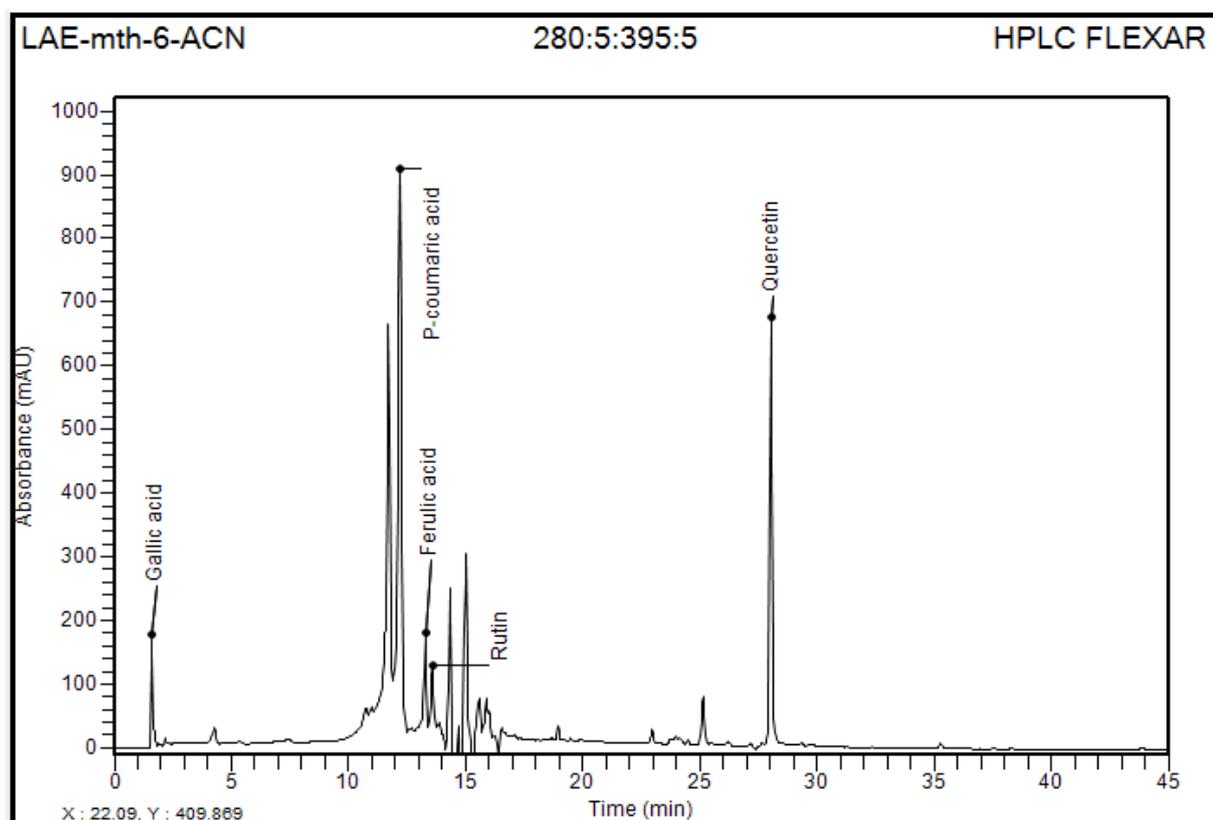
L'extrait chloroformique (LCh) et acétate d'éthyle (LAE) ont été analysés par la technique RP-HPLC-PDA. Les chromatogrammes obtenus à 280 nm sont représentés dans les **figures 48** et **49**.

Les résultats nous montrent que ces extraits contiennent plusieurs pics qui ont une absorption intense à 280 nm. Selon leurs profils de spectre UV, ces composés sont de natures polyphénoliques, en particulier l'acide phénolique à savoir l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique et l'acide hydroxycinnamique comme l'acide ferulique. D'autre part, la classe des flavonoïdes a été représentée par la quercétine et rutine (flavonols) et la glabridine (isoflavane).

La méthode RP-HPLC-PDA décrite présente l'avantage de la simplicité, précision et sensibilité d'analyse ce qui nous permis d'identifier des composés spécifiques.



**Figure 48:** RP-HPLC-PDA chromatogramme de l'extrait chloroformique des racines de la plante *G. glabra*.

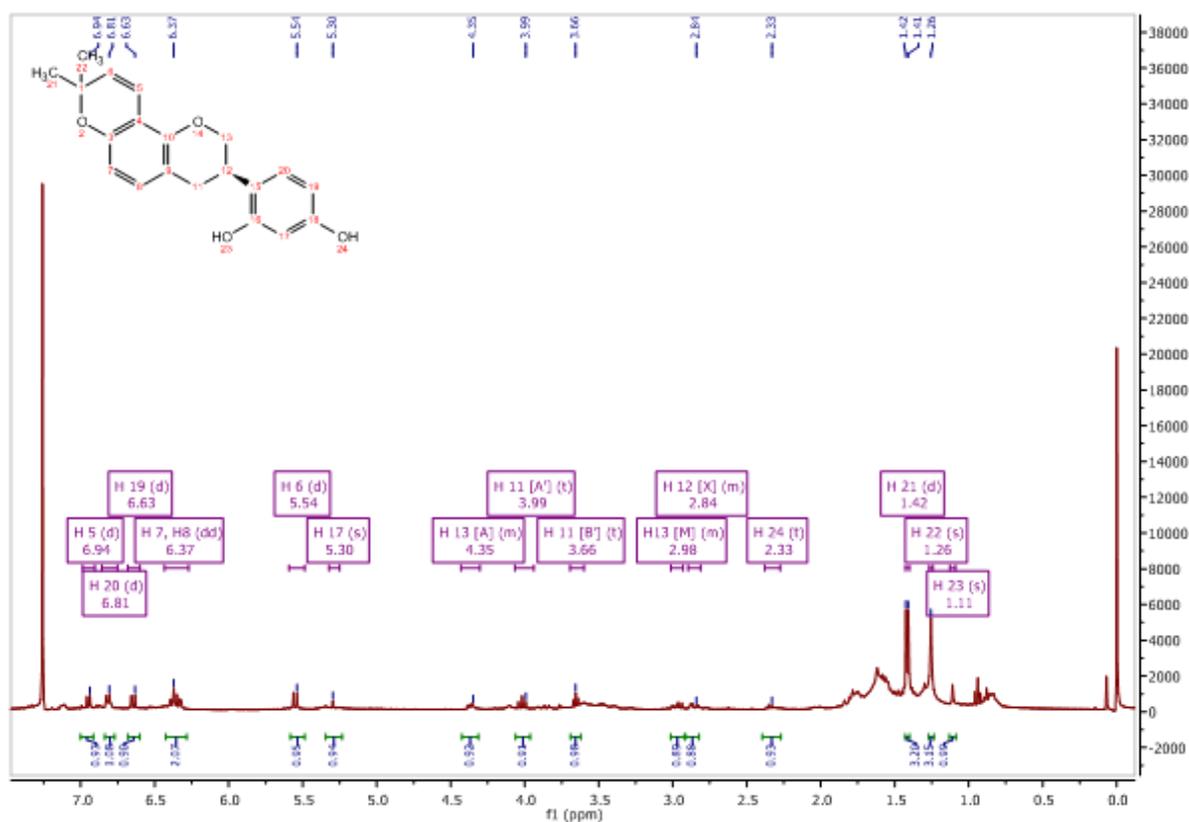


**Figure 49:** RP-HPLC-PDA chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante *G. glabra*.

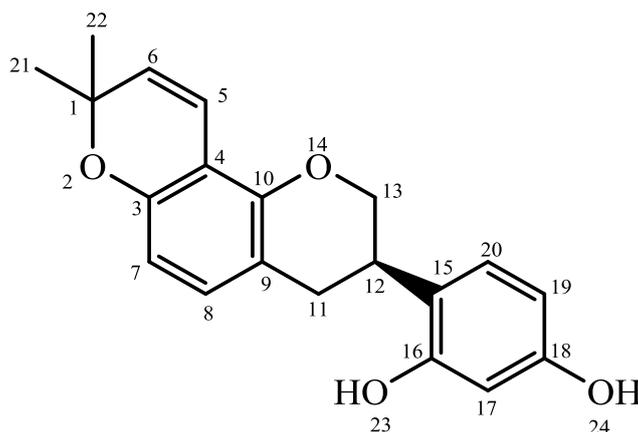
### 3.3. Spectroscopie RMN $^1\text{H}$

L'analyse spectrale par RMN  $^1\text{H}$  a montré que la fraction L4 est composée de la glabridine (**Figure 51**). Les signaux de proton sont illustrés dans la **figure 50** ci-dessous.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.94 (d, 1H, H-5), 6.81 (d, 1H, H-20), 6.63 (d, 1H, H-19), 6.37 (dd, 2H, H-(7, 8)), 5.54 (d, 1H, H-6), 5.30 (s, 1H, H-17), 4.43 – 4.30 (m, 1H, H-13 [A]), 3.99 (t, 1H, H-11 [A']), 3.66 (t, 1H, H-11 [B']), 3.01 – 2.93 (m, 1H, H-13 [M]), 2.90 – 2.81 (m, 1H, H-12 [X]), 2.33 (t, 1H, 24 O-H), 1.42 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H-21), 1.26 (s, 2H, 22 O-H), 1.11 (s, 1H, H-23).



**Figure 50:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la glabridine extraite de la fraction L4 de l'extrait chloroformique.



**Figure 51:** Structure de la glabridine isolée de la fraction L4 de l'extrait chloroformique.

### 3.4. Evaluation de l'activité antioxydante

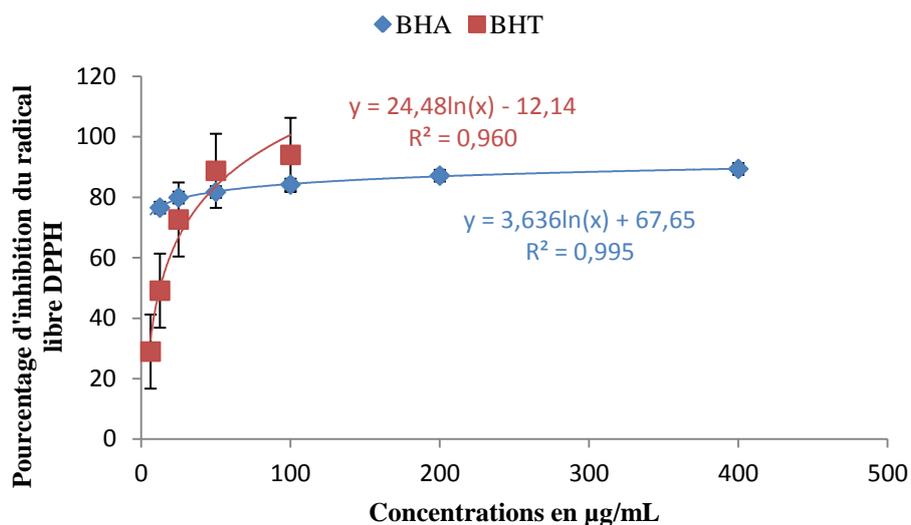
#### 3.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

Les résultats de l'évolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits et des standards sont illustrés dans les **figures 33, 52** et le **tableau 14**.

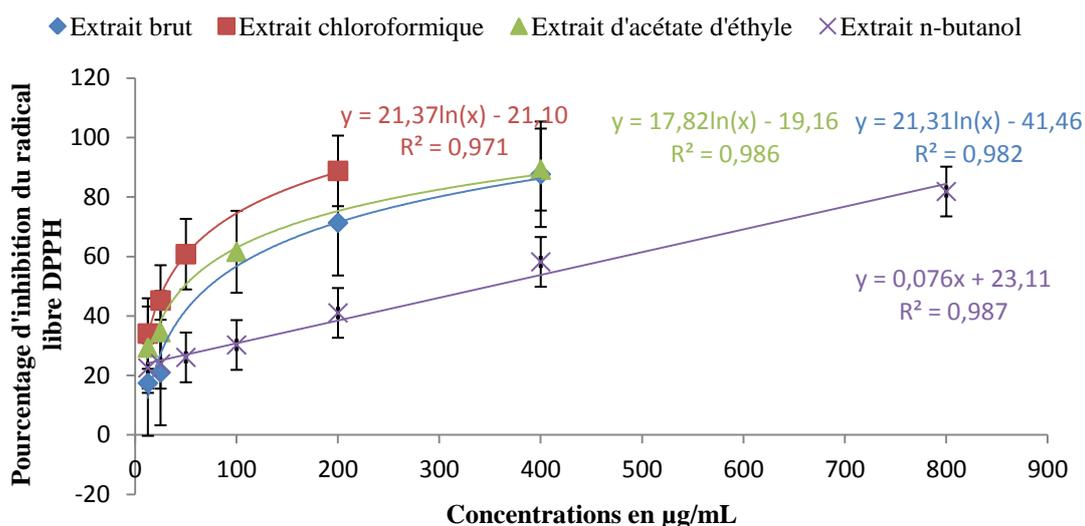
Nous constatons que les extraits exercent un pouvoir inhibiteur du radical libre DPPH. Ce pouvoir augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration des extraits ainsi que les standards).

Le pourcentage d'inhibition le plus important a été enregistré par l'extrait chloroformique à la concentration 200 µg/ mL (88,76% ± 0,20). Ces pourcentages d'inhibitions nous ont permis de calculer la  $CI_{50}$  et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la  $CI_{50}$  est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres. D'après les valeurs obtenues, l'extrait chloroformique présente la  $CI_{50}$  la plus basse à celle des autres extraits, et donc la meilleure activité avec une  $CI_{50}$  d'environ  $33,94 \pm 1,23$  µg/mL suivie de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait brut. Tandis que, la  $CI_{50}$  la plus élevée a été enregistrée par l'extrait n-butanolique ce qui signifie l'activité antioxydante la plus faible.

Cependant, en comparant avec les antioxydants de standards, les extraits testés s'avèrent moyennement actifs.



**Figure 33:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.



**Figure 52:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de racine de la plante *G. glabra*.

**Tableau 14:** Valeurs  $CI_{50}$  des extraits de racine de la plante *G. glabra*.

Extraits de <i>G. glabra</i>	Piégeage du radical libre DPPH					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$CI_{50}$ (µg/mL)	<b>123,64 ± 5,06</b>	<b>33,94 ± 1,23</b>	<b>67,57 ± 2,57</b>	<b>304,46 ± 9,64</b>	<b>6,14 ± 0,41</b>	<b>12,99 ± 0,41</b>

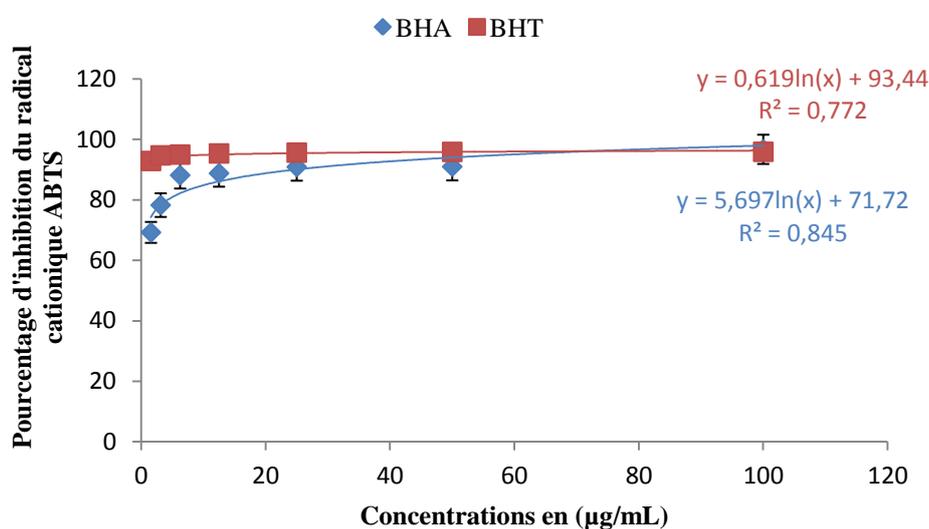
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

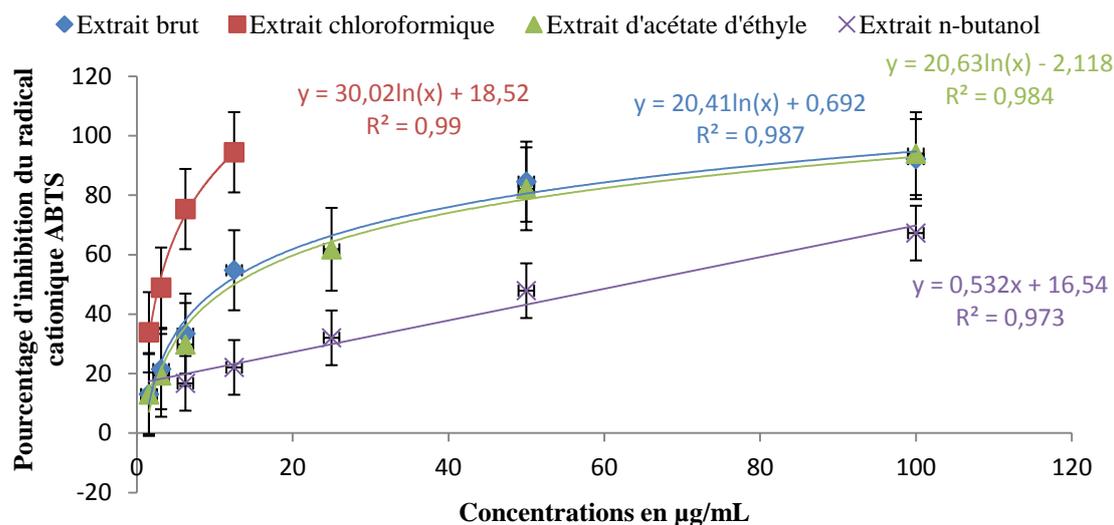
### 3.4.2. Piégeage du radical ABTS

Les figures 35, 53 et le tableau 15 regroupent les pourcentages d'inhibition à 50% du radical ABTS par rapport aux extraits ainsi que les antioxydants de références. Ce pourcentage augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. En effet, les résultats ont montré que l'extrait chloroformique a présenté la  $CI_{50}$  la plus intéressante de l'ordre de  $3,54 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$ . Les valeurs des  $CI_{50}$  du piégeage du radical ABTS sont dans l'ordre suivant : extrait chloroformique < extrait brut < extrait acétate d'éthyle < extrait n-butanol.

Cependant, les  $CI_{50}$  des références BHA et BHT sont légèrement inférieures à celles obtenues par les extraits en particulier l'extrait chloroformique.



**Figure 35:** Evolution des pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des standards BHA et BHT.



**Figure 53:** Evolution des pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des extraits de la plante *G. glabra*.

**Tableau 15:** Résultats des CI<sub>50</sub> des extraits de plante *G. saharae* par la méthode du piégeage du radical ABTS.

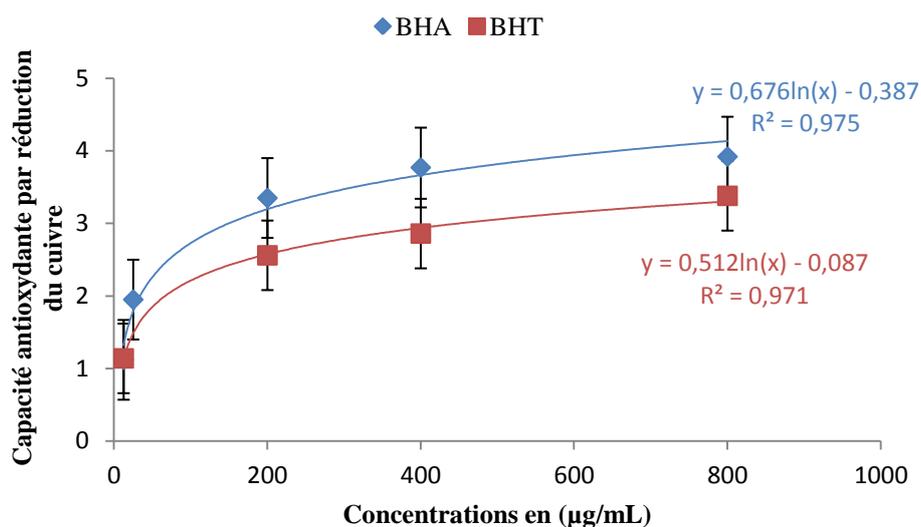
Extraits de <i>G. glabra</i>	Piégeage du radical cationique ABTS					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
CI <sub>50</sub> (µg/mL)	11,11 ± 0,35	3,54 ± 0,99	17,46 ± 0,89	60,50 ± 1,75	1,29 ± 0,30	1,81 ± 0,10

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

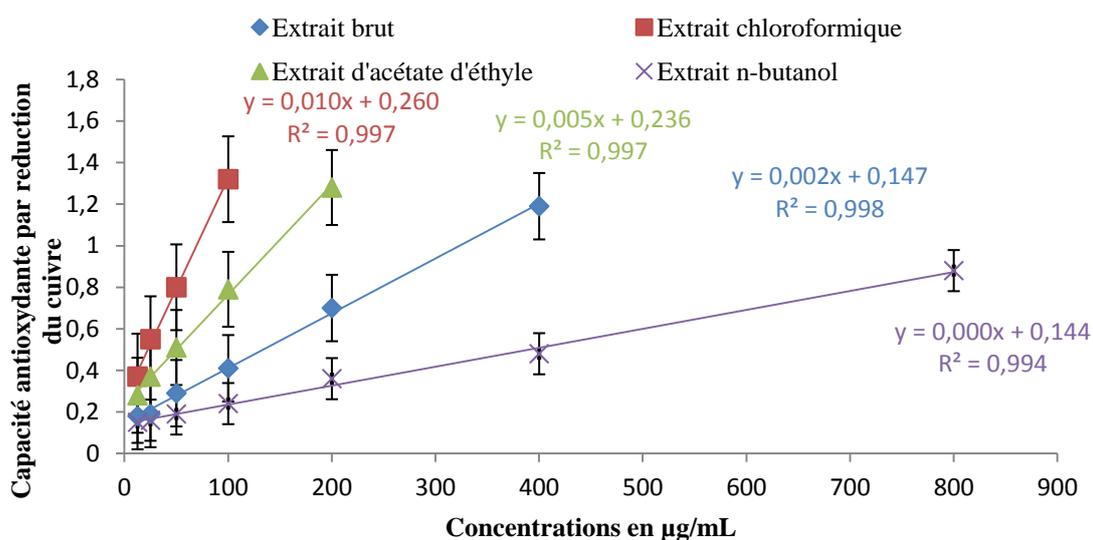
<sup>b</sup>Composés de références.

### 3.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le **tableau 16** montre l'évolution des absorbances du chélate de Cu(I)-Néocuproïne en fonction des concentrations des extraits des racines de la plante *G. glabra* et les standards (BHA et BHT). Nous notons une évolution des absorbances d'une manière dose-dépendante (**Figure 37** et **Figure 54**). Ce qui nous a permis de calculer la valeurs A<sub>0,5</sub> où nous constatons que la valeur A<sub>0,5</sub> la plus intéressante a été enregistrée par l'extrait chloroformique (21,78 ± 2,91 µg/mL) suivie de l'extrait d'acétate d'éthyle. Tandis que, l'extrait brut et n-butanolique possèdent les A<sub>0,5</sub> les plus faibles. Cependant le pouvoir réducteur de cuivre de nos extraits reste inférieur par rapport à celui des standards.



**Figure 37:** Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) des standards BHA et BHT.



**Figure 54:** Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits de la plante *G. glabra*.

**Tableau 16:** Résultats  $A_{0,5}$  des extraits de plante *G. saharae* par la méthode CUPRAC.

Extraits de <i>G. glabra</i>	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$A_{0,5}$ (µg/mL)	$132,67 \pm 5,00$	$21,78 \pm 2,91$	$45,22 \pm 6,98$	$400,33 \pm 0,58$	$5,35 \pm 0,71$	$8,97 \pm 3,94$

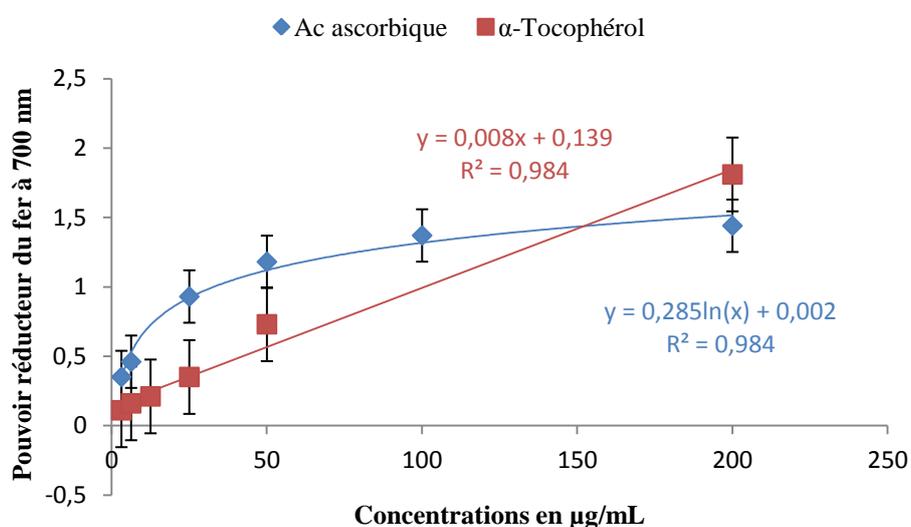
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

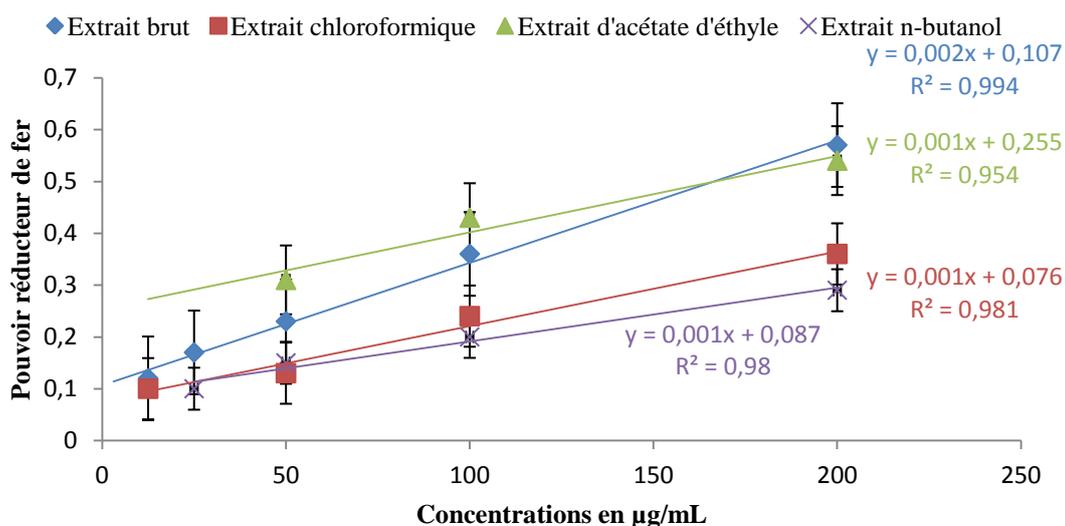
### 3.4.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Les résultats du pouvoir réducteurs du fer des extraits de racines de la plante *G. glabra* sont regroupés dans les **figures 39, 55** et le **tableau 17**.

Nous constatons que l'extrait d'acétate d'éthyle présente une faible valeur  $A_{0,5}$  d'environ  $176,00 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$  ce qui signifie une meilleure capacité à réduire le fer suivie par l'extrait chloroformique et l'extrait brut respectivement. Cependant, l'extrait n-butanol montre le pouvoir réducteur du fer le plus faible. Les résultats obtenus avec les antioxydants de références sont nettement inférieurs par rapport à ceux obtenus par nos extraits.



**Figure 39:** Pouvoir réducteur du fer des standards.



**Figure 55:** Pouvoir réducteur du fer des extraits de racine de la plante *G. glabra*.

**Tableau 17:** Pouvoir réducteur du fer des extraits de plante *G. saharae* par la méthode FRAP.

Extraits de <i>G. glabra</i>	Pouvoir réducteur du fer (FRAP)					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	Acide ascorbique <sup>b</sup>	$\alpha$ -Tocophérol <sup>b</sup>
A <sub>0,5</sub> (µg/mL)	<b>194,00 ± 3,00</b>	<b>186,50 ± 0,50</b>	<b>176,59 ± 0,21</b>	<b>&gt;200</b>	<b>6,77 ± 1,15</b>	<b>34,93 ± 2,38</b>

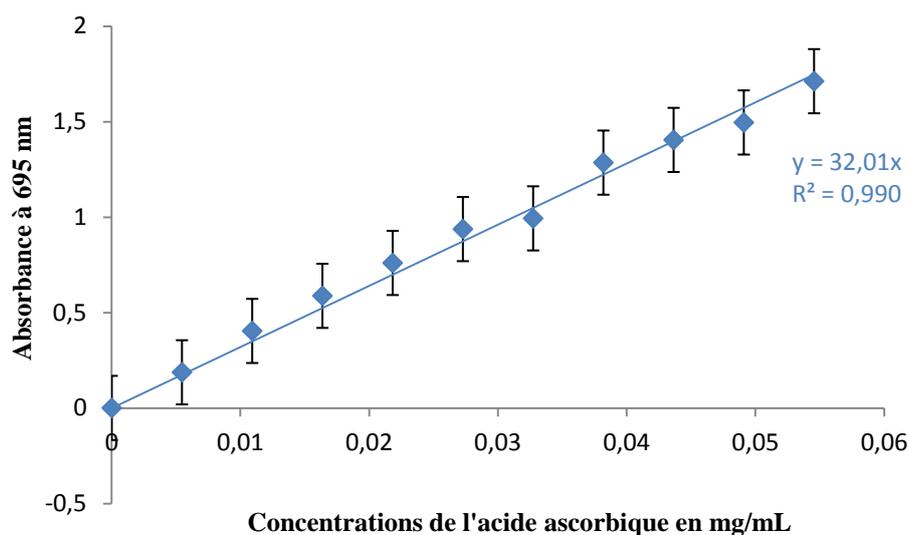
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

### 3.4.5. Capacité antioxydante totale (CAT)

Le test au phosphomolybdate est très utilisé pour déterminer la capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de plantes. Les résultats sont regroupés dans la **figure 41** et le **tableau 18**.

Nous constatons que l'efficacité des échantillons à réduire le Mo<sup>6+</sup> en Mo<sup>5+</sup> est variable. Tous les extraits des racines de la plante *G. glabra* ont montré une bonne activité dont la plus forte est enregistrée par les extraits n-butanol, brut et acétate d'éthyle.

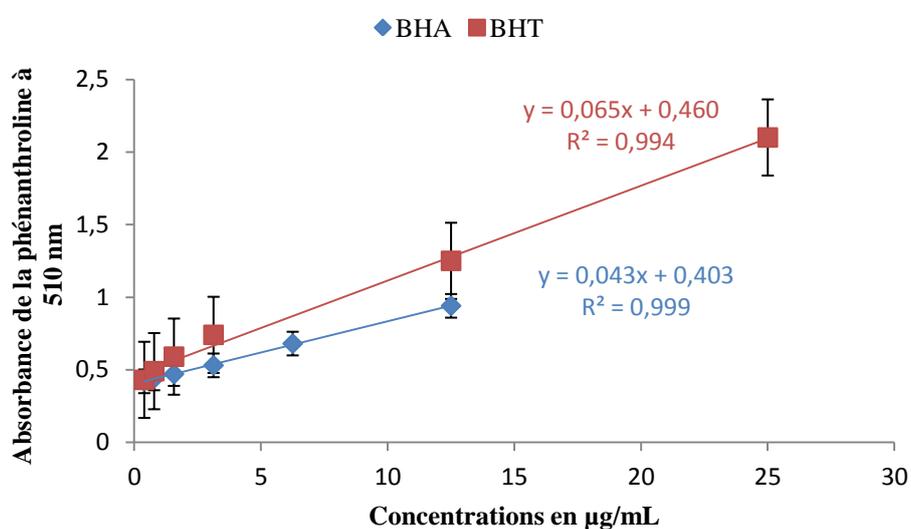
**Figure 41:** Capacité antioxydante totale de l'acide ascorbique.**Tableau 18:** Capacité antioxydante totale des différents extraits de *G. glabra*.

Extraits de racine de <i>G. glabra</i>	Extrait brut	Extrait chloroformique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanolique
CAT <sup>a</sup> (mg EAA/g E)	<b>3,81 ± 0,001</b>	<b>7,54 ± 0,001</b>	<b>3,90 ± 0,002</b>	<b>3,33 ± 0,001</b>

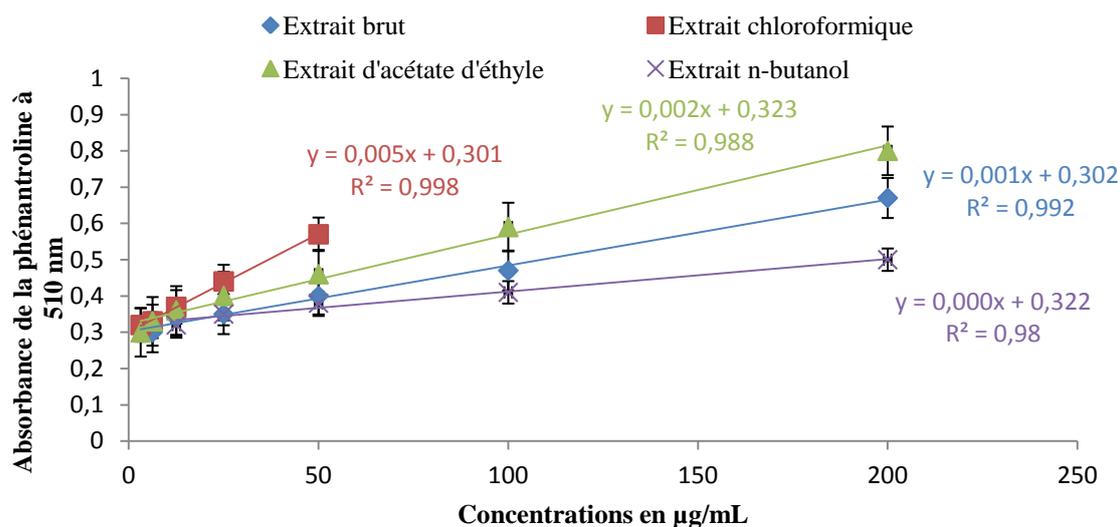
<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

### 3.4.6. Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline

L'intensité de la couleur orange due à la complexation du fer réduit avec la 1,10-phénanthroline pour former la ferroïne dépend largement de l'augmentation de la concentration des extraits ainsi que les antioxydants de standards (BHA et BHT) (**Figure 42** et **Figure 56**). D'après les résultats représentés dans le **Tableau 19**, nous remarquons que la valeur  $A_{0,5}$  la plus faible et donc l'activité antioxydante la plus intéressante est obtenue par l'extrait chloroformique ( $34,34 \pm 3,13 \mu\text{g/mL}$ ) suivie de l'extrait acétate d'éthyle. L'extrait brut et la fraction butanolique ont le pouvoir réducteur le plus bas.



**Figure 42:** Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les standards BHA et BHT.



**Figure 56:** Test de l'activité antioxydante par la méthode de la phénanthroline par les extraits de racine de la plante *G. glabra*.

**Tableau 19:** Résultats  $A_{0,5}$  des différents extraits de la plante *G. saharae* par la méthode de la phénanthroline.

Extraits de <i>G. glabra</i>	Absorbance de la phénanthroline à 510 nm					
	Extrait brut <sup>a</sup>	Extrait chloroformique <sup>a</sup>	Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	Extrait n-butanolique <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	BHT <sup>b</sup>
$A_{0,5}$ (µg/mL)	<b>196,33 ± 6,03</b>	<b>34,34 ± 3,13</b>	<b>81,33 ± 2,75</b>	<b>197,78 ± 9,81</b>	<b>2,24 ± 0,17</b>	<b>0,93 ± 0,07</b>

<sup>a</sup>Valeurs exprimées autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

### 3.5. Activité antibactérienne

#### 3.5.1. Technique de diffusion des disques sur milieu solide

La sensibilité des souches aux extraits des plantes a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines de la plante *G. glabra* vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont illustrés dans le **Tableau 20**.

Nous remarquons que toutes les bactéries à Gram positif ont montré une sensibilité vis-à-vis des deux extraits brut et chloroformique avec des diamètres compris entre 8 et 12,5 mm à l'exception d'*Enterococcus faecalis* ATCC 49452. Par contre, nous constatons que les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol ont été les moins actifs pour les mêmes souches, sauf *Micrococcus luteus* ATCC 9341 où elle s'est avérée sensible à de l'extrait n-butanol avec un diamètre de zone d'inhibition de 8 mm.

Pour les bactéries Gram négatif, les deux extraits brut et chloroformique, se sont révélés être actifs à leur tour avec des diamètres de zones d'inhibitions compris entre 7 et 15 mm à l'exception des souches *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 pour l'extrait brut et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 pour l'extrait chloroformique. Cependant, les mêmes souches ont montré une résistance vis-à-vis des extraits d'acétate d'éthyle et n-butanol à l'exception de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 qui ont présenté une sensibilité avec des diamètres des zones d'inhibition de 7 et 8 mm respectivement pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Tandis que l'extrait n-butanol a été actif vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 avec 7 mm comme un diamètre de zone d'inhibition.

**Tableau 20:** Diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines de la plante *G. glabra* vis-à-vis des souches bactériennes.

Extraits Bactéries		Extraits de racine de la plante <i>G. glabra</i>				Gent (mm)
		Extrait brut	Extrait CHCl <sub>3</sub>	Extrait AE	Extrait n-butanol	
Bactéries à Gram négatifs	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6	10	6	6	22
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	6	6	6	6	19
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15	6	6	6	12
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	9	6	6	6	35
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	9	9	6	7	18
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	6	6	6	6	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	7	7	7	6	22
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	6	7	8	6	21
Bactéries à Gram positifs	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12	10	6	6	32
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	11	10	6	6	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	11	6	6	22
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	6	6	6	6	21
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	8	11	6	6	22
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	10	12,5	6	8	22

(6mm) : représente le diamètre de disque (pas d'activité).

Gent: Gentamicine.

### 3.5.2. Méthode de la microdilution sur milieu liquide

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de racines de la plante *G. glabra* sont présentés dans le **tableau 21**.

Nous remarquons que l'extrait le plus puissant contre les bactéries Gram négatif et Gram positif est l'extrait chloroformique avec une CMI de 19,5 µg/mL suivi de l'extrait brut (CMI = 312,5 µg/mL). La plus faible CMI pour l'extrait brut a été obtenus vis-à-vis des souches *Micrococcus luteus* ATCC 9341 et *Escherichia coli* ATCC 8739 avec une

CMI  $\geq$  312,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté les CMI les plus élevées vis-à-vis de toutes les souches (CMI  $\geq$  312,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Tableau 21:** Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de racine de la plante *G. glabra* vis-à-vis des bactéries testées.

Souches	Extrait brut ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Extrait $\text{CHCl}_3$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Extrait AE ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Extrait n-butanol ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Gentamicine ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	$\geq 312,5$	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,5
<i>Acinitibacter baumannii</i> ATCC 19606	312,5	$\geq 312,5$	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,65
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	312,5	$\geq 312,5$	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,19
<i>Proterus mirabilis</i> ATCC 35659	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	2,60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,19
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,19
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,65
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	312,5	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,19
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	$\geq 312,5$	19,5	$\geq 312,5$	$> 312,5$	0,12

### 3.6. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique a été effectuée par la méthode de diffusion de disque sur milieu solide vis-à-vis de trois souches de référence *Candida albicans*. Les diamètres de zones d'inhibition mesurés sont regroupés dans le **tableau 22**.

Les résultats montrent que l'extrait chloroformique a été le plus actif vis-à-vis des 03 souches avec des diamètres d'inhibition qui varient entre (7 et 10 mm), suivi de l'extrait brut avec des zones d'inhibition qui sont de 7 à 8 mm. Cependant, les souches *C. albicans* ATCC 26790 et ATCC 10231 ont montré une résistance vis-à-vis de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol à l'exception de la souche *C. albicans* IP 444 qui s'est avérée sensible avec un diamètre de zone d'inhibition de 8 mm avec les mêmes extraits.

**Tableau 22:** Diamètres des zones d'inhibition en mm des extraits de la plante *G. glabra* vis-à-vis des levures testées.

Levures \ Extraits de <i>G. glabra</i>	Extrait brut	Extrait chloroformique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	AMB
	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	7	7	6	6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7	8	6	6	15
<i>Candida albicans</i> IP 444	8	10	8	8	20

Les résultats des CMI vis-à-vis des levures sont représentés dans le **tableau 23**. Nous observons que l'extrait chloroformique exerce une faible activité antifongique avec une CMI de 20 mg/mL suivi de l'extrait brut avec une CMI de 40 mg/mL. Cependant, les extraits acétate d'éthyle et n-butanol ont enregistré les CMI les plus faibles (>40 mg/mL).

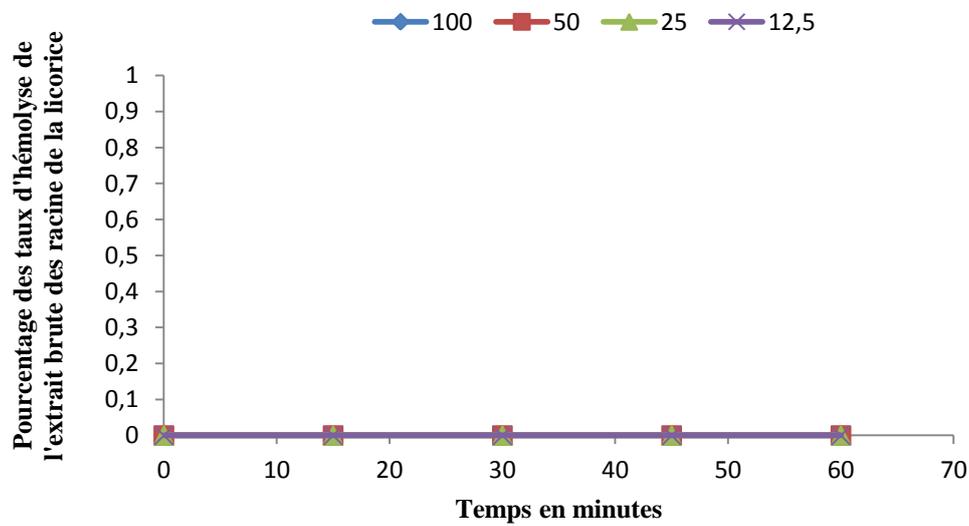
**Tableau 23:** Concentration Minimale Inhibitrice des extraits de la plante *G. glabra* vis-à-vis des levures testées.

Levures \ Extraits de <i>G. glabra</i>	Extrait brut (mg/mL)	Extrait chloroformique (mg/mL)	Extrait d'acétate d'éthyle (mg/mL)	Extrait n-butanol (mg/mL)	AMB (µg/mL)
	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	40	20	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	40	20	/	/	0,4
<i>Candida albicans</i> IP 444	40	20	>40	>40	2

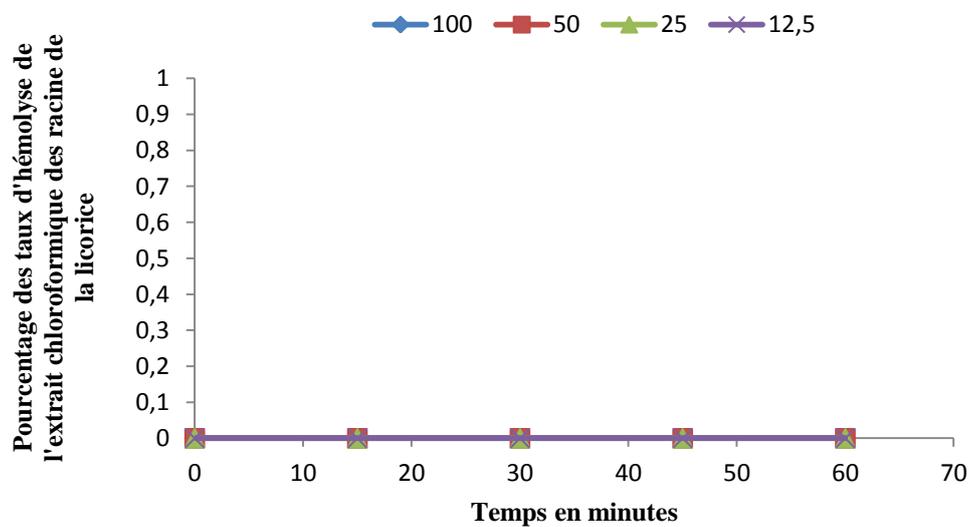
### 3.7. Evaluation de l'activité hémolytique

Les résultats du test d'hémolyse sont présentés sous forme d'évolution du pourcentage de taux d'hémolyse en fonction du temps d'incubation à 37°C à quatre concentrations (12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL) des extraits des racines de la plante *G. glabra* (**Figures 57, 58, 59 et 60**).

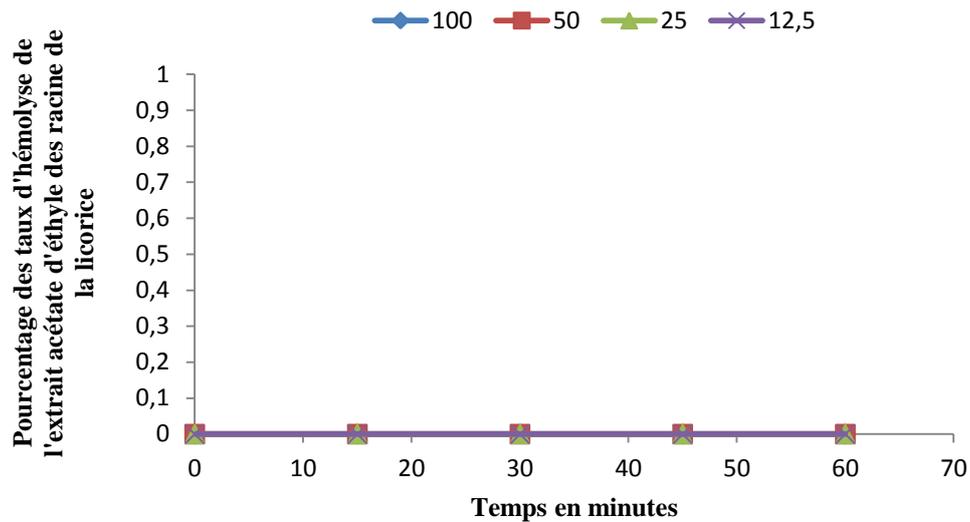
D'après les résultats obtenus, aucune forme d'hémolyse n'a été enregistrée par l'ensemble des extraits de racine de la plante *G. glabra* en fonction du temps et des concentrations.



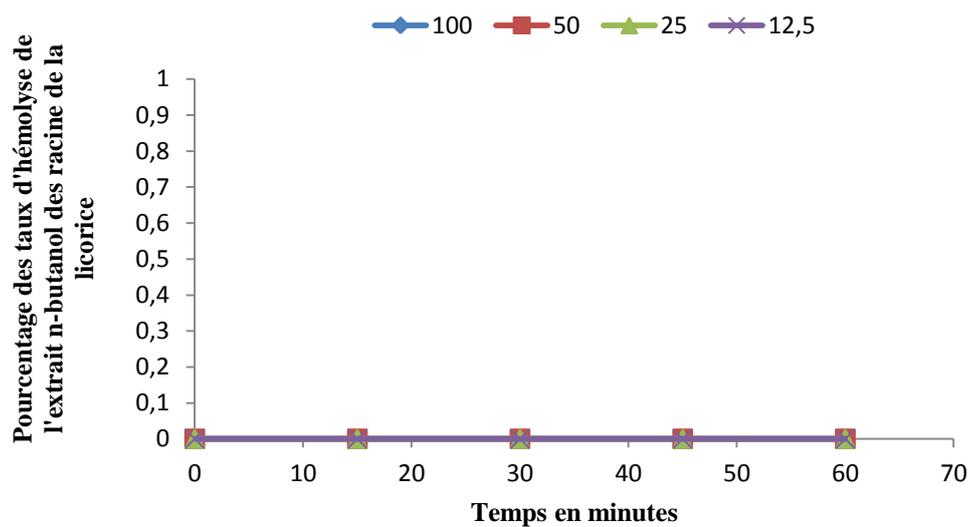
**Figure 57:** Effet des différentes concentrations de l'extrait brut des racines de la plante *G. glabra* sur la fuite d'hémoglobine.



**Figure 58:** Effet des différentes concentrations de l'extrait chloroformique des racines de la plante *G. glabra* sur la fuite d'hémoglobine.



**Figure 59:** Effet des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante *G. glabra* sur la fuite d'hémoglobine.



**Figure 60:** Effet des différentes concentrations de l'extrait n-butanol des racines de la plante *G. glabra* sur la fuite d'hémoglobine.

### 3.8. Evaluation de l'activité anticholinestérase

Les résultats des activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) des extraits de racines de *G. glabra*, exprimés en pourcentage d'inhibition, sont résumés dans les **tableaux 24** et **25**. Tous les échantillons testés ont présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de l'AChE et de la BChE. L'extrait chloroformique est le plus efficace vis-à-vis des deux enzymes et plus particulièrement contre la BChE avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de 4,72  $\mu\text{g/mL}$ . Ce résultat est plus intéressant que celui du standard utilisé.

L'extrait brut a montré une activité inhibitrice modérée contre AChE et BChE avec une  $CI_{50}$  de  $190,18 \pm 8,44$  et  $176,88 \pm 5,73$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. L'activité inhibitrice la plus faible a été enregistrée avec l'extrait d'acétate d'éthyle avec une  $CI_{50} > 200$   $\mu\text{g/mL}$  via les deux enzymes.

**Tableau 23:** Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de racine de la plante *G. glabra*.

Extraits de racine de <i>G. glabra</i>	Pourcentage d'inhibition de l'AChE							
	3,125 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$
Extrait brut <sup>a</sup>	4,17 $\pm$ 12,37	3,47 $\pm$ 25,16	1,04 $\pm$ 25,15	13,80 $\pm$ 19,52	22,37 $\pm$ 8,20	38,33 $\pm$ 10,51	52,42 $\pm$ 5,85	<b>190,18 <math>\pm</math> 8,44</b>
Extrait chloroformique <sup>a</sup>	NA	NA	30,42 $\pm$ 5,68	44,01 $\pm$ 6,99	56,95 $\pm$ 6,06	74,89 $\pm$ 5,92	87,37 $\pm$ 1,24	<b>38,43 <math>\pm</math> 8,98</b>
Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	NA	NA	NA	NA	18,64 $\pm$ 8,16	29,59 $\pm$ 5,76	39,87 $\pm$ 4,17	<b>&gt;200</b>
Extrait n-butanol <sup>a</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	39,95 $\pm$ 45,63	<b>&gt;200</b>
Galantamine <sup>b</sup>	35,93 $\pm$ 2,28	43,77 $\pm$ 0,00	68,50 $\pm$ 0,31	80,69 $\pm$ 0,41	85,78 $\pm$ 1,63	91,80 $\pm$ 0,20	94,77 $\pm$ 0,34	<b>6,27 <math>\pm</math> 1,15</b>

<sup>a</sup>Valeurs exprimés autant que moyenne  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles.

<sup>b</sup>Composés de références.

NA: absence d'absorbance.

**Tableau 24:** Pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de racine de la plante *G. glabra*.

Extraits de racine de <i>G. glabra</i>	Pourcentage d'inhibition de la BChE							
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	CI <sub>50</sub> µg/mL
Extrait brut <sup>a</sup>	NA	NA	NA	4,56 ± 2,95	5,32 ± 4,26	16,83 ± 14,70	57,79 ± 1,58	<b>176,88 ± 5,73</b>
Extrait chloroformique <sup>a</sup>	46,09 ± 16,59	62,09 ± 8,34	66,24 ± 4,25	77,03 ± 2,72	87,74 ± 0,56	93,66 ± 0,92	SAT	<b>4,72 ± 0,72</b>
Extrait d'acétate d'éthyle <sup>a</sup>	NA	NA	9,23 ± 13,83	17,27 ± 13,16	1,97 ± 5,92	30,30 ± 5,32	30,44 ± 17,96	<b>&gt; 200</b>
Extrait n-butanol <sup>a</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>NA</b>
Galantamine <sup>b</sup>	35,93 ± 2,28	43,77 ± 0,00	68,50 ± 0,31	80,69 ± 0,41	85,78 ± 1,63	91,80 ± 0,20	94,77 ± 0,34	<b>6,27 ± 1,15</b>

<sup>a</sup>Valeurs exprimés autant que moyenne ± S.D. de trois mesures parallèle.

<sup>b</sup>Composés de références.

NA: absence d'absorbance.

SAT: Saturation.

---

## *Discussion*

---

Cette étude décrit les analyses du contenu phénolique de deux plantes récoltées en Algérie et appartenant à la famille des fabacées en l'occurrence *Genista saharae* (Coss. & Dur.) et *Glycyrrhiza glabra* L.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement distribués dans les plantes comestibles et non comestibles. Ces composés ont reçu une attention considérable en raison de leur activité antioxydante et de leur capacité à piéger les radicaux libres. Ils peuvent être extraits par différents solvants et méthodes. Parmi les composés phénoliques, les flavonoïdes sont l'un des groupes de composés naturels les plus divers et les plus répandus qui sont probablement les phénols naturels les plus importants (**Prasard et al., 2009**).

Concernant la plante *Genista saharae* (Coss. & Dur.), la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistrée par l'extrait n-butanol. Ce résultat est en accord avec celui de **Chebbah et al., (2014)** qui a obtenu une forte teneur en polyphénols pour l'extrait n-butanolique de la plante *G. cephalantha* ( $156,86 \pm 4,35 \mu\text{g EAG/mg E}$ ). En ce qui concerne le dosage des flavonoïdes totaux et les tanins condensés, l'extrait chloroformique a montré le taux le plus élevé par rapport aux autres extraits.

Les résultats obtenus par l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante *G. saharae* sont proches de ceux du même extrait de la plante *G. cephalantha* ( $65,83 \pm 4,35 \mu\text{g QE/mg E}$ ) (**Chebbah et al., 2014**). Cependant, d'autres recherches ont eu des valeurs nettement supérieures aux nôtres (**Bouchouka et al., 2012**) ( $242 \text{ mg EQ/g E}$ ) ; (**Maanani et al., 2018**) ( $159,94 \pm 0,11 \text{ mg ER/g E}$ ).

Certaines études ont montré que le contenu en composés phénoliques change de manière significative d'une espèce à une autre et au sein d'une même espèce, en raison des facteurs extrinsèques (température, climat...) (**Ksouri et al., 2008**). Cette variation est peut-être due à plusieurs paramètres influençant la qualité des extraits et les composés phytochimiques à extraire telles que la partie de la plante utilisée, l'origine, la période de la récolte, la taille des particules des tissus végétaux, la nature du solvant employé et le mode d'extraction réalisé, ainsi que, la durée d'extraction et la température (**Ncube et al., 2008 ; Das et al., 2010 ; Tiwari et al., 2011**).

Selon les profils des spectres UV, les composés phénoliques identifiés sont l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique, quercétine et la naringinine. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Chouikh et al., (2018)** qui a confirmé la présence des

métabolites comme l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide hydroxybenzoïque (la vanilline) et la rutine (flavonols).

L'extrait chloroformique de la plante *G. saharae* a été sélectionné pour être analysé par RMN. Il a été fractionné sur colonne chromatographique en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire. 10 fractions ont été obtenues (G1-G10) après confirmation par chromatographie sur couche mince (CCM), la fraction G4 a fait l'objet de l'analyse RMN  $^1\text{H}$  (2D) et  $^{13}\text{C}$ . Nous avons pu identifier la présence d'un isoflavone nommé la génistéine (5,7,4'-trihydroxyisoflavone) dans la plante *G. saharae*. C'est un flavonoïde présent dans certaines légumineuses et les plantes médicinales chinoises *Genista tinctoria* Linn et *Sophora subprostrata* Chun. Il est largement utilisé comme complément alimentaire aux États-Unis pour divers avantages présumés pour la santé (Erdman, 2000 ; Sacks *et al.*, 2006 ; Si *et al.*, 2008).

D'après plusieurs auteurs, il a été bien noté que les plantes médicinales qui contiennent de grandes quantités en composés phénoliques sont douées de potentiel antioxydant important (Da Silva *et al.*, 2006 ; Falleh *et al.*, 2011 ; Dehshiri *et al.*, 2013). Ce qui nous a poussés de tester l'activité antioxydante des quatre extraits de la plante *G. saharae* par six méthodes différentes. Nous avons constaté que l'extrait chloroformique a montré les meilleures activités. Ce potentiel antioxydant peut s'expliquer par la présence des phénols et des flavonoïdes et leur capacité à réduire les ions métalliques et à agir comme donneurs d'électrons et piègeurs des radicaux libres (Leopoldini *et al.*, 2010 ; Kiliani-Jaziri *et al.*, 2011 ; Ghasemzadeh *et al.*, 2012 ; Chaouche *et al.*, 2014). L'activité antioxydante des composés phénoliques tels que les flavonoïdes dépend de leur structure chimique, notamment la distribution des groupes hydroxyles où la réduction des radicaux libre est liée étroitement à la 3',4'-orthodihydroxy sur le cycle B et le groupe 4-carbonyl sur le cycle C. les groupes 3-OH et 5-OH sur le cycle C sont également appropriés pour l'effet antioxydant (Chekroun *et al.*, 2015). Elle est largement influencée par le nombre des hydroxyles présents dans les molécules (Halbwirth, 2010).

Une autre étude de la relation structure-activité a montré que l'origine de l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leurs groupes hydroxyles. L'emplacement des groupes -OH et -OCH<sub>3</sub> peut augmenter ou diminuer l'activité. En particulier, les composés ayant un second -OH en position ortho ou para présente une activité antioxydante plus élevée qu'en position méta (Muhammad *et al.*, 2016).

En effet, plusieurs études ont montré que les composés phénoliques extraits des plantes ont la capacité à se complexer avec des ions des métaux de transition et ils deviennent plus stables (**Lee et al., 2007**). Ces résultats sont cohérents avec les recherches antérieures concernant la quantité de flavonoïdes avec l'efficacité d'élimination des radicaux (**Guettaf et al., 2016**).

D'après **Halliwell et Gutteridge, (2007)**, les polyphénols et les flavonoïdes sont de puissants antioxydants et agissent en piégeant de nombreuses espèces réactives de l'oxygène, notamment les radicaux hydroxyles, les radicaux peroxy, les acides radicalaires hypochloreux, l'anion superoxyde et le peroxy nitrite.

L'acide caféique, la naringénine et la quercétine, sont des composés caractérisés dans notre extrait et se sont révélés avoir des effets biologiques et thérapeutiques élevés, notamment des activités antioxydantes et anticancéreuses (**Maatook et al., 2016**). La naringénine est une flavanone présente principalement dans plusieurs plantes qui s'est avérée posséder de nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment antioxydantes, hypolipidémiques, anti-inflammatoires (**Alam et al., 2017**).

Selon **Meriane et al., (2014)**, les isoflavones polaires et apolaires sont les principaux contributeurs à l'activité antioxydante.

Nos analyses RMN pour l'extrait chloroformique nous ont permis de mettre en évidence d'un isoflavone : la génistéine (5,7,4'-trihydroxyisoflavone) dans la plante *G. saharae*. **Ruiz-Larrea et al., (1997)** ont étudié l'activité antioxydante de quatre isoflavones. La génistéine était de loin l'antioxydant le plus puissant parmi cette série de composés étudiés. Cependant, cet effet de la génistéine n'est atteint qu'à des concentrations allant de 25 à 100  $\mu\text{M}$ , (**Luo et al., 2018**).

Les études d'**Agarwal, (2000)** et **Ravindranath et al., (2004)** ont montré que la structure de cette molécule est semblable à celle de l'œstradiol, ce qui lui confère la capacité de se lier aux récepteurs œstrogéniques (phytoestrogène). Cette molécule naturelle est la plus active des isoflavones et présente des caractéristiques intéressantes comme l'inhibition de l'angiogenèse, la différenciation cellulaire, la destruction des cellules tumorales, le traitement des symptômes de la ménopause et la prévention de l'ostéoporose.

L'évaluation de l'activité antileucémique *in-vitro* et *in-vivo* de la génistéine a montré qu'elle possède une activité antinéoplasique dépendante de la dose et du temps contre les lignées cellulaires de leucémies myéloïdes et lymphoïdes (**Raynal et al., 2008**).

Nous pensons fortement au rôle de la génistéine dans l'activité antioxydante décelée par l'extrait chloroformique.

En science théorique, l'activité antioxydante consiste à réduire ou à éliminer les radicaux libres et l'oxygène naissant d'un environnement. D'un autre côté, de nombreuses bactéries pourraient également dépendre de ces oxygènes naissants pour leur survie dans un environnement donné. Ainsi, par implication, la réduction ou l'élimination des radicaux libres où des oxydants pourraient être liés à l'activité antimicrobienne. Ce qui laisse à admettre que de nombreux agents phénoliques peuvent présenter à la fois des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour cela nous avons testé les quatre extraits de la plante *G. saharae* vis-à-vis de 14 bactéries et 3 levures. Nous avons choisi un panel de micro-organismes qui sont virulents et qui peuvent provoquer des gastro-entérites, des infections des voies urinaires et des méningites néonatales. Ces microorganismes sécrètent différents types de toxines, principalement des entérotoxines et des exotoxines et provoquent diverses maladies sauvages chez les êtres humains.

Nous avons démontré que nos extraits ont une très bonne activité antimicrobienne. On peut dire que les micro-organismes utilisés réagissent de différentes manières soit par rapport à la nature de l'extrait, soit au degré de résistance et de sensibilité face à une même substance (**Venugopal et al., 2009**).

Il a été rapporté que la fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *G. saharae* possède une excellente activité antibactérienne contre *S. aureus* (**Bouchouka, 2012**). Cette activité est due probablement au rôle de l'acide gallique dans l'activité antimicrobienne montrée par notre extrait. L'acide gallique est un composé phénolique obtenu en particulier à partir de plantes et les composés apparentés possèdent structurellement de nombreuses propriétés thérapeutiques potentielles, notamment des effets anticancéreux, anti-inflammatoires et antimicrobiens (**Alam et al., 2017**). L'acide gallique isolé des feuilles de *Ludwigia abyssinica* s'est révélé posséder des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes *in vitro*, ce qui en fait une source de produits de santé naturels (**Oyedeji et al., 2014**).

Les Gram-positifs étaient plus sensibles que les bactéries Gram-négatives, cela peut s'expliquer par la différence dans les constitutions morphologiques de ces souches. Les bactéries à Gram négatif ont une membrane phospholipidique externe possédant des composants lipopolysaccharides qui contribuent à la capacité de la bactérie à provoquer des maladies (**Pitchamuthu et al., 2012**). Cela rend la paroi cellulaire imperméable aux

substances chimiques antimicrobiennes. En outre, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles, car elles ne possèdent qu'une couche de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace (Nostro *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2010).

Pour qu'un nouveau produit puisse être utilisé par l'industrie pharmaceutique ou comme additif alimentaire, la première chose à vérifier est l'innocuité de ces composés vis-à-vis de l'être humain. Le premier indicateur de la toxicité chez l'être humain est le globule rouge humain. Dans nos tests biologiques, nous avons déterminé le taux d'hémolyse vis-à-vis des globules rouges humains d'un donneur unique sain. En sachant que l'hémolyse est un phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leurs hémoglobines (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007).

Dans ce sens, la FDA recommande d'évaluer les seuils hémolytiques potentiels des composés administrés dans le corps humain (FDA, 2005). L'activité hémolytique des extraits de *G. saharae* peut être donc un inconvénient grave pour la poursuite du développement d'un produit pharmaceutique.

Les tests d'hémolyse des quatre extraits de la plante de *G. saharae* n'ont pas montré une hémolyse notable vis-à-vis des GRH. Le taux d'hémolyse le plus élevé a été obtenu par l'extrait acétate d'éthyle (4,58%).

Cette légère cytotoxicité de la partie aérienne de la plante *G. saharae* est peut-être due aux saponnines qui peuvent conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses exerçant une activité hémolytique. Ces composés ont une capacité à former des complexes avec le cholestérol de la membrane cellulaire conduisant par conséquent à la formation de pores et à la perméabilisation cellulaire. Ils ont également la capacité de provoquer des altérations dans les portions de glucides chargées négativement sur la surface de la cellule (Abe *et al.*, 1981 ; Melzig *et al.*, 2001 ; Gauthier *et al.*, 2009).

Du fait que, les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention des effets délétères des radicaux libres par leur neutralisation; ils peuvent également empêcher la formation de radicaux libres en séquestrant des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Gali *et al.*, 2019). La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative multifactorielle qui se définit cliniquement par une déficience cognitive et comportementale (Jia *et al.*, 2009). Divers faits corroborent le rôle central des radicaux libres dans les lésions du tissu cérébral et leur implication dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Ils peuvent

également activer l'expression de gènes pro-inflammatoires qui maintiendront la réponse inflammatoire et induiront des lésions des tissus cérébraux (**Ramesh et al., 2013**).

Malheureusement nos résultats n'ont pas montré des activités inhibitrices sur les enzymes de l'anticholinestérase : l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase, enzymes qui empêchent le déclenchement de la maladie d'Alzheimer.

Concernant les racines de la plante *G. glabra*, l'extrait chloroformique est celui qui a montré les taux les plus élevés en polyphénols, à savoir les flavonoïdes totaux et tanins condensés. Ce résultat a confirmé aussi que les flavonoïdes sont le principal groupe naturel de composés phénoliques présents dans les racines de *G. glabra*. Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'**Asan-Ozusaglam et Karacoka, 2014**, qui ont obtenu des teneurs plus élevées en composés phénoliques dans l'extrait dichlorométhane que celles obtenues par extraits aqueux et éthanolique des racines de la réglisse Turque. Cependant, ces teneurs restent plus importantes que celles que nous avons retrouvées.

De plus, selon **Damle, (2014)**, les racines de *G. glabra* ont montré un grand nombre de constituants bioactifs formant 40 à 50% du poids total de matière sèche avec une importance ethnopharmacologique.

L'extrait chloroformique LCh et acétate d'éthyle LAE ont été analysés par la RP-HPLC-PDA. Cette technique présente l'avantage de la simplicité, de la précision et de la sensibilité.

Les résultats suggèrent que les extraits LCh et LAE contenaient plusieurs pics qui avaient une absorption intense à 280 nm. Selon les profils de spectres UV, ces composés ont été de nature polyphénoliques, en particulier l'acide phénolique (acide gallique, acide *p*-coumarique) et l'acide hydroxycinnamique sous forme d'acide férulique. D'autre part, les principales sous-classes de flavonoïdes ont été caractérisées par la quercétine, la rutine (flavonols) et la glabridine (isoflavane).

En comparant nos résultats avec ceux de **Liao et al., (2012)** nous constatons que l'analyse chromatographique des racines de la plante *G. glabra* d'origine Taïwanaise ne contenait pas de quercétine contrairement à notre cas. Cette variation peut s'expliquer par le fait que les composés phénoliques changent de façons considérables d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce (**Ksouri et al., 2009**), à cause des facteurs génétiques (la variété et l'origine d'espèces) (**Ebrahimzadeh et al., 2008**), et physiologiques (le degré de maturation de la plante, nature des organes utilisés) (**Maisuthisakul et al., 2007**).

Les analyses RMN de l'extrait chloroformique nous confirment que le composant majoritaire de cet extrait est la glabridine. Ce composé naturel a été isolé et caractérisé pour la première fois en 1976 par **Saitoh et al., (1976)**.

**Shanker et al., (2007)** et **Liao et al., (2012)** ont confirmé dans leurs travaux la présence de la glabridine dans les échantillons de racines de la plante *G. glabra*. D'après les mêmes auteurs le contenu de glabridine varie avec l'origine de la plante (**Hatano et al., 1991 ; Hayashi et al., 2003**).

À ce jour, les paramètres nécessaires à une caractérisation chimique exhaustive de la glabridine sont répartis dans toute la littérature. Les données de résonance magnétique nucléaire (RMN) de la glabridine ont été principalement acquises dans le chloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ) (**Kinoshita et al., 1996**) et le diméthylsulfoxyde (DMSO- $d_6$ ) deutérés, à 300 ou 400 MHz (**Jirawattanapong et al., 2009**). Les deux solvants offrent une bonne dispersion du signal et les spectres acquis dans le DMSO- $d_6$  sont essentiellement exempts de chevauchement de résonances lors de l'utilisation d'instruments de 300 à 600 MHz. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de la glabridine acquis dans ces solvants ne sont pas identiques, notamment dans la région aromatique, où les signaux des protons H-6 et H-5' se chevauchent dans  $\text{CDCl}_3$ . Dans certains articles, les affectations de protons ont été inexactes, en particulier en ce qui concerne les protons aromatiques qui ont été signalés comme des gammes de signaux (par exemple, «6,37-6,41 (2H, m)») (**Vaya et al., 1997 ; Cui et al., 2008**).

L'activité antioxydante des racines de la plante *G. glabra* a été aussi évaluée par six méthodes. Cette activité est corrélée à la valeur  $\text{CI}_{50}$  et  $\text{A}_{0,5}$ . Une valeur  $\text{CI}_{50}$  ou  $\text{A}_{0,5}$  inférieure indique une activité antioxydante plus élevée.

Nos résultats ont montré que l'extrait chloroformique a été le plus efficace en tant que piègeur des radicaux libres DPPH et ABTS ( $\text{CI}_{50} = 33,94 \pm 1,23$  et  $3,45 \pm 0,99$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement). le même extrait s'est avéré avoir un puissant potentiel à réduire les ions métalliques CUPRAC et la phenanthroline ( $\text{A}_{0,5} = 21,78 \pm 2,91$  et  $34,34 \pm 3,13$   $\mu\text{g/mL}$ ). Par contre, l'extrait acétate d'éthyle avait le pouvoir réducteur de fer et la capacité antioxydante les plus élevés. Ces résultats peuvent être rapportés aux grandes teneurs en composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes dans les deux extraits chloroformique et d'acétate d'éthyle.

Le profil HPLC a démontré que les flavonoïdes constitue le groupe principal des racines de *G. glabra*, qui agissent en tant qu'agents antioxydants contre les radicaux libres (**Ali et al., 2013**).

**Ju et al., (1989)** a rapporté que les flavonoïdes de la réglisse sont les plus puissants antioxydants naturels connus. Cette diversité de composants phénoliques d'extraits de racines de réglisse peut offrir une résistance au stress oxydatif en piégeant les radicaux libres, en inhibant la peroxydation des lipides (**Badkhan et al., 2014**).

Nos résultats sont en accord avec l'étude menée par **Mehreen et al., (2012)** qui a indiqué que l'extrait chloroformique des racines de *G. glabra* a été plus efficace en tant que piègeur des radicaux libres et avait un bon pouvoir de réduction. Une autre étude fournie par **Visavadiya et al., (2009)** démontre que *G. glabra* possède une activité antioxydante et un effet protecteur considérables contre le système de stress oxydatif des lipoprotéines humaines étudié *in vitro*.

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits nous a révélé que les extraits testés présentent des niveaux d'activités variables en fonction des souches étudiées. Notre étude est en accord avec celle trouvée par **Karami et al., (2013)** où la souche *Enterococcus faecalis* a montré une résistance à l'extrait chloroformique. Aucune activité n'a été marquée par les extraits vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ce qui est en accord avec les résultats obtenus par **Ercisli et al., (2008)**. Cette variation entre les diamètres des zones d'inhibitions obtenues s'explique par la sensibilité de ces souches vis-à-vis des extraits de racines de *G. glabra*. Les études réalisées par **Sultana et al., (2010)**, et par **Asan-Ozusaglam et Karakoca, (2014)**, confirment nos résultats. Selon **Sharma et al., (2013)**, l'extrait hydrométhanolique des racines de la réglisse a présenté une activité antibactérienne puissante contre les bactéries à Gram positif et négatif.

L'intéressante activité antibactérienne de l'extrait chloroformique et l'extrait brut est certainement liée à la présence des métabolites secondaires présents dans la plante. Ces métabolites servent de mécanisme de défense contre l'invasion par des micro-organismes (**Demizu et al., 1988 ; Murugan et al., 2013 ; Sharma et al., 2013**), ou chaque composant joue un rôle primordial dans la plante.

**Asha et al., (2013)** a testé la glabridine et un extrait enrichi en flavonoïdes de *G. glabra* (GutGard®, contenant  $\geq 3,5\%$  p/p de Glab) contre différentes souches d'*Helicobacter pylori*, considéré comme la principale cause d'ulcère-duodéal. Les CMI mesurés pour la Glabridine et GutGard® étaient de 12,5 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivement.

Une autre étude fournie par **Thakur et al., (2016)** a démontré que des échantillons de glycyrrhizine extraite à partir des racines de la réglisse (**Nassiri et Hosseinzadeh, 2008**), ont

une action antibactérienne efficace sur les six micro-organismes. Des rapports ont confirmé que les flavonoïdes, les isoflavanes et l'isoflavane sont les substances phénoliques hydroxylées, dont leur synthèse par les plantes est connue en réponse à l'action microbienne (Cowan, 1999 ; Manoj *et al.*, 2010), cependant, les saponines sont actives en raison de la fuite de protéines et de certaines enzymes (Zablotowicz *et al.*, 1996 ; Patil *et al.*, 2009) et les tanins se lient aux protéines riches en proline et interfèrent avec la synthèse des protéines (Shimada *et al.*, 2006).

Concernant l'évaluation de l'activité hémolytique les résultats obtenus, n'ont montré aucune toxicité de nos extraits en fonction du temps et des concentrations. Cela est du probablement, à l'absence des composés toxiques agissant sur les cellules érythrocytaires. Ce qui confirme le fait que la réglisse est une plante réputée pour ces vertus ethnopharmacologique très utilisée dans la médecine traditionnelle pour son potentiel de prévention et de traitement des maladies et sans effet toxique.

Les inhibiteurs du cholinestérase sont utilisés cliniquement en première ligne dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Howes *et al.*, 2003). Plusieurs composants phytochimiques présentaient une activité inhibitrice de la cholinestérase, ce qui pourrait être bénéfique dans le traitement des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (Dasmalshi *et al.*, 2007). Conformément à Vinutha *et al.*, (2007), qui a classé l'efficacité du pourcentage d'inhibition de l'AChE comme suit: puissant (inhibition > 50%), modéré (inhibition de 30 à 50%), faible (inhibition < 30%) et nul (< 5% d'inhibition). Selon cette classification, l'extrait chloroformique peut être considéré comme puissant et peut être bénéfique pour la santé humaine (Taylor, 2009). Cela est probablement dû à la teneur élevée en composés phénoliques actifs présents dans l'extrait offrant une relation structure-activité, mais le composé responsable de cette activité ou le fragment actif et le mécanisme de liaison à l'enzyme nécessitent des recherches supplémentaires. En effet, aucun rapport d'activité inhibitrice de l'enzyme cholinestérase in vitro n'a été évalué chez cette espèce.

Ce pendant, une étude récente de Ravanfar *et al.*, (2018) a montré que la sclérose en plaque (SEP) et la maladie d'Alzheimer (MA) sont des troubles neurologiques chroniques caractérisés par une perte progressive de cellules neurales par diverses voies moléculaires et pathologiques. Les voies les plus étudiées par lesquelles les auteurs soupçonnent que la réglisse joue son rôle neuroprotecteur sont :

Voie du facteur de nécrose - kappa B (NF - kB) (Srinivasan *et al.*, 2015), la voie du glutamate et la voie PI3K / Akt (Kao *et al.*, 2009)

Dans l'étude de **Cherng *et al.*, (2006)**, des cellules cultivées en hippocampe de rat ont été traitées avec du glutamate pour induire l'apoptose. Les caractéristiques morphologiques microscopiques de l'apoptose étaient significativement diminuées de manière dépendante de la concentration en présence d'acide glycyrrhizique. Cette étude a montré que l'acide glycyrrhizique provoque une diminution significative de la voie médiée par les récepteurs NMDA de la signalisation du glutamate ainsi que NF-kB qui est un signal en aval dans cette voie. L'acide glycyrrhizique a été déterminé pour bloquer de manière significative la liaison du facteur kB à ses sites d'ADN, ce qui entraîne des voies d'apoptose d'activation.

---

## *Conclusion*

---

Les plantes sont l'une des sources importantes des médicaments et leur valeur médicinale réside dans certaines substances chimiques qui produisent une action physiologique définie sur le corps humain. Étant donné la toxicité et les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse, Il existe une demande croissante de drogues naturelles.

Dans ce contexte, la présente étude a porté sur l'étude phytochimique et biologique d'extraits de deux plantes médicinales *Genista saharae* (Coss. & Dur.) et *Glycyrrhiza glabra* L. utilisés empiriquement dans la pharmacopée traditionnelle locale, pour le traitement de divers maladies. À la lumière des résultats obtenus, il ressort de notre travail les points suivants:

- Les extraits chloroformiques des deux *Fabacées* *G. saharae* et *G. glabra*, sont très riches en métabolites secondaires, particulièrement les flavonoïdes.
- L'analyse chromatographique par HPLC des extraits chloroformiques et acétates d'éthyles nous a permis d'identifier les acides phénoliques (l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique), de l'acide hydroxycinnamique comme l'acide férulique. Ainsi que des flavonoïdes représentés par la quercétine et la rutine (flavonol) de la glabridine (isoflavane) et la naringinine (flavanone);
- L'analyse spectrale RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des fractions G4 et L4 issus du fractionnement sur colonne chromatographique des extraits chloroformiques de *G. saharae* (GCh) et *G. glabra* (LCh) a mis en évidence des isoflavonoïdes : la génistéine dans la plante *G. saharae* et la glabridine dans la plante *G. glabra*;
- La diversité en phytoconstituants de la partie aérienne de la plante *G. saharae* et les racines de *G. glabra* confère aux deux plantes étudiées des propriétés antioxydantes remarquables. Les  $\text{CI}_{50}$  et les  $\text{A}_{0,5}$  les plus intéressantes ont été obtenus par les extraits chloroformiques et d'acétates d'éthyles;
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *G. saharae* et de *G. glabra* réalisée *in-vitro* par la méthode de diffusion de disque sur gélose et des microdilutions en milieu liquide, montrent que les différentes souches testées présentent des degrés variables de sensibilités vis-à-vis des extraits. Les extraits chloroformiques ont été les plus actifs avec une CMI de 19,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ce pendant, l'activité antifongique des extraits s'est révélée faible vis-à-vis des souches *Candida albicans*;
- L'étude de la fuite d'hémoglobine des deux plantes *G. saharae* et *G. glabra* procédé *in-vitro* n'ont manifesté aucune cytotoxicité notable aux fortes concentrations;
- Les résultats de l'inhibition des enzymes de la cholinestérase ont montré que l'extrait chloroformique des racines de la réglisse possède un pouvoir d'inhibition intéressant

vis-à-vis de la butyrylcholinestérase BChE avec une  $CI_{50}$  de  $4,72 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ . Une  $CI_{50}$  considérée comme la plus puissante que la galantamine.

Nous pouvons dire que les espèces *Genista saharae* (Cos. & Durr.) et *Glycyrrhiza glabra* L. peuvent être des sources gorgées de substances naturelles dotées de propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes.

L'ensemble des résultats tirés ne constitue qu'une première étape dans la recherche pour un travail plus vaste et plus approfondi, il serait souhaitable de:

- Purifier et isoler les molécules contenues dans les extraits des deux plantes *G. saharae* et *G. glabra*;
- Élucider les mécanismes d'action, l'efficacité et les effets synergiques des composés identifiés;
- Étudier la cytotoxicité de ces molécules *in-vivo* afin de confirmer leur usage thérapeutique.

---

## *Références Bibliographiques*

---

1. Abe H, Konishi H, Komiya H. **1981**. Effects of saikosaponins on biological membranes. *Planta Medica*, 42: 356-363.
2. Agarwal R. **2000**. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochemical Pharmacology*, 60: 1051-1059.
3. Agelet A, Vallès J. **2003**. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 84: 211-227.
4. Aguilar-Martinez P. **2007**. H2- Erythrocytes-MB7. Hématologie H2-Faculté de médecine Montpellier-Nimes.
5. Alam P, Parvez M.K, Arbab A.H, Al-Dosari M.S. **2017**. Quantitative Analysis of Rutin, Quercetin, Naringenin, and Gallic Acid by Validated RP- and NP-HPTLC Methods for Quality Control of anti-HBV Active Extract of *Guiera Senegalensis*. *Pharmaceutical Biology*, 55: 1317-1323.
6. Ali M.S, Ahmad F, Ahmad V.U, Azhar I, Usmanhani K. **2001**. Unusal chemical constituents of *Lotus gracinii* (Fabaceae). *Turkish Journal of Chemistry*, 25: 107-112.
7. Ali R, Hossain M, Kuri S, Islam M.S. **2013**. Evaluation of total Phenolic content, free radical scavenging activity and phytochemical screening of different extracts of *Averhoa bilimbi* (fruits). *International Current Pharmaceutical Journal*, 2: 92-96.
8. Ameyaw Y, Duker-Eshun G. **2009**. The alkaloid contents of the ethno-plant organs of three antimalarial medicinal plant species in the eastern region of Ghana. *International Journal of Chemical Sciences*, 7: 48-58.
9. Ammosov S, Litvinenko V.I. **2003**. Triterpenoids of plants of *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. Et Mey genuses (A review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37: 83-94.
10. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S.E. **2004**. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
11. APG. **2009**. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121.

12. Asan-Ozusaglam M, Karakoca K. **2014**. Evaluation of biological activity and antioxidant capacity of Turkish licorice root extracts. *Romanian Biotechnological Letters*, 19: 8994-9005.
13. Asha M.K, Debraj D, Prashanth D.S, Edwin J.R, Srikanth H.S, Muruganantham N, Deth S.M, Anirban B, Jaya B, Deepak M, Agarwal A. **2013**. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of a flavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 145: 581-586.
14. Ayad M.F, Fahmy N.Z, Rosenstiel S.F. **2008**. Effect of surface treatment on roughness and bond strength of a heat-pressed ceramic. *The Journal Prosthetic Dentistry*, 99: 123-130.
15. Baba-Aïssa F. **2011**. Encyclopédie des plantes utiles: Flore Méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale) Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. BEO Alger: El Maarifa, p 471.
16. Badkhan Y, Yadar A.S, Bajaj A, Ajit K, Sharma V, Raghuwanshi D.K. **2014**. *Glycyrrhiza glabra* L. A miracle medicinal herb. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4: 5808-5816.
17. Bamforth C.W. **2000**. Perceptions of beer foam. *Journal of the Institute of Brewing*, 106: 229-238.
18. Benkhniq O, Zidane L, Fadli M, Elyacoubi H, Rochdi A, Douira A. **2011**. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonsia*, 53: 191-216.
19. Bennett R.N, Wallsgrove R.M. **1994**. Tansley Review No. 72: Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist Trust*, 127: 622-633.
20. Block G, Patterson B, Subar A. **1992**. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18: 1-29.
21. Bouayyadi L, El Hafian, M, Zidane L. **2015**. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. *Journal of Applied Biosciences*, 93: 8760-8769.
22. Bouchouka E, Abdelouahad Dj, Bekkouche A. **2012**. Antibacterial and antioxidant activities of three plants from Algerian Sahara. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11: 61-65.

23. Boutaghane N. **2013**. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista utlicina* Spach (*Fabaceae*) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (*Asteraceae*). Diplôme de Doctorat. Université de Constantine 1. Faculté des Science exactes Département de chimie, p 11-13.
24. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igc R, **2008**. Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). *Food Chemistry*, 111: 925-929.
25. Bruneton J. **1993**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique & Documentation, Lavoisier 2<sup>ème</sup> Édition, Paris.
26. Bruneton J. **1999**. Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, p 369-404.
27. Bruneton J. **2009**. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>e</sup> Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, p 1288.
28. Buckingham J. **2004**. (ed.) *Dictionary of Natural Products*. Version 9.2 on CD-ROM. Chapman & Hall/CRC Press, London, New York.
29. Chaïh K, Bekki A, Bouras N, Holtz M.D, Soussou S, Mauré L, Brunel B, de Lajudie Ph, Cleyet-Mare J.C. **2016**. Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genita saharae* in the northeastern Algerian Sahara. Springer Science Business Media Dordrecht.
30. Chaouche T.M, Haddouchi F, Ksouri R, Atik-Bekkara F. **2014**. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medicinal Association*, 77: 302-307.
31. Chebbah K, Eric M, Menad A, Mekkiou R, Sarri Dj, Ammeddah S, Boumaza O, Seghiri R, Benayache S, Benayache F. **2014**. Preliminary phytochemical screening, analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of *Genista cephalantha* Spach. (*Fabaceae*). *International Journal of Phytomedicine*, 6: 360-369.
32. Chekroun E, Benariba N, Adida H, Bechiri A, Azzi R, Djaziri R. **2015**. Antioxidant activity and phytochemical screening of two *Ccurbitaceae*: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 8: 632-637.
33. Cherg J.M, Lin H.J, Hung M.S, Lin Y.R, Chan M.H, Lin J.C. **2006**. Inhibition of nuclear factor kappaB is associated with neuroprotective effects of glycyrrhizic acid on glutamate-induced excitotoxicity in primary neurons. *European Journal of Pharmacology*, 547: 10-21.

34. Chouikh A, Allia F, Neffar S, Rebiai A, Adjal H, Chefrou A. **2018**. Evaluation of phenolic contents (quantitative and qualitative) and antioxidant activities in different physiological phases of *Genista Saharæ* Coss. & Dur. growing in the Sahara of Algeria. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie*, 25: 115-121.
35. Christov V, Dutshevska H, Selenghe D, Zhavsan S, Zhamyansan Y. **1991**. 13-epi-Hydroxysparteine and Desoxyangustifoline, New alkaloids from *Thermopsis mongolica*. *Journal of Natural Products*, 54: 1413-1415.
36. Clarkson T.B, Anthony M.S. Hughes Jr.C.L. **1995**. Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease: risks and benefits. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 6: 11-16.
37. Clifford, M.N. **1986**. Phenol-protein interactions and their possible significance for astringency. In G.G. Birch and M.G. Lindley (eds), *Interaction of Food Components*. Elsevier Applied Science, London, p 143-164.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute. **2009**. Methods for Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Growth Aerobically, 8<sup>th</sup> ed. Approved Standard M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. **2012**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 9<sup>th</sup> ed. Approved standard M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
40. Cotelle N, Bernier J.L, Hénichart J.P, Catteau J.P, Gaydou, E, Wallet, J.C. **1992**. Scavenger and antioxydant properties of ten synthetic Flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 13: 211-219.
41. Couplan F. **2000**. Dictionnaire étymologique de botanique. Delachaux et Niestle, Paris, p 85-97.
42. Cowan M.M. **1999**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
43. Crozier A, Clifford M.N, Ashihara H. **2006**. Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, p 4.
44. Cui Y.M, Ao M.Z, Li W, Yu L.J. **2008**. Effect of glabridin from *Glycyrrhiza glabra* on learning and memory in mice. *Planta Medica*, 74: 377-380.
45. Da Silva J.F.M, De Sousa M.C, Matta S.R, De Andrade M.R, Nova Vidal F.V. **2006**. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431-435.

46. Damle M. **2014**. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice)-a potent medicinal herb. *International Journal of Herbal Medicine*, 2: 132-136.
47. Dangles O, Stoeckel C, Wigand M.C, Brouillard R. **1992**. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Letters*, 33: 5227-5230.
48. Das K, Tiwari R.K.S, Shrivastava D.K. **2010**. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 104-111.
49. Dasmalchi K, Dorman H.J.D, Vuorela H, Hilttunen R. **2007**. Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*, 1: 83-104.
50. De Matta S.M, Monache F.D, Ferrari F, Marini-Bettolo G.B. **1976**. Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. From Peru. *Il Farmaco edizione Scientifica*, 31: 527-535.
51. Debeltas A.M., Delaveau P. **1983**. Guide des plantes dangereuses, IIème, édition. Paris, p 200.
52. Dehshiri M.M, Aghamollaei H, Zarini M, Nabavi S.M, Mirzaei M, Loizzo M.R, Nabavi S.F. **2013**. Antioxidant activity of different parts of *Tetrataenium lasiopetalum*. *Pharmaceutical Biology*, 51: 1081-1085.
53. Delaveau P. **2003**. Expliquez-moi les plantes- Voyage en botanique. Paris: Pharma thèmes édition communication sante, p 505.
54. Demizu S, Kajiyama K, Takahashi, Y, Hiraga S, Yamamoto Y, Tamura K, Kinoshita T.O. **1988**. Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36: 3474-3479.
55. Dewick P.M. **2001**. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and steroids. In P.M. Dewick (ed.), *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p 167-289.
56. Dewick, P.M. **1993**. Isoflavonoids. *The Flavonoids Advances in research since 1986*. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London, p 117-238.
57. Dixon R.A, Ferreira D. **2002**. Genistein, *Phytochemistry*, 60: 205-211.
58. Dixon R.A. **1999**. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Sankawa U., ed. (Elsevier Oxford UK), 1: 773-823.

59. Dixon R.A. **2004**. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 225-261.
60. Duke J.A. **2003**. Hand book of medicinal spices. CRC Press, Florida.
61. Dupont F. Guignard J.L. **2007**. Abrégé de Botanique 14ème édition. Editions Masson, Paris; p 285.
62. Ebrahimzadeh M.A, Pourmorad F, Bekhradnia A.R. **2008**. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7: 3188-3192.
63. Echevin R. **1964**. Angiospermes I, éditeur Doin p 496.
64. El Rhaffari L, Zaid A, El Alami F. **1999**. Valorisation et protection de la flore utilisée en médecine traditionnelle dans le Tafilalet et ces environs. *Minbar Al-Jamiâa*, 1: 183-189.
65. El Tahchy A. **2010**. Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. et criblage phytochimique de quelques *Amaryllidaceae*. Thèse de doctorat en chimie. Université Henri Poincaré, Nancy-Université, Faculté des sciences, p 20.
66. Elbl G, Wagner H. **1991**. A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting Enzyme (ACE), Using the chromophore- and fluophore-labeled substrate, dansyltriglycine. *Planta Medica*, 57: 137-141.
67. Ellman G.L, Courtney K.D, Andres V, Featherston R.M. **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
68. Emin J.A, Oliveira A.B, Lapa A.J. **1994**. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a *Citrus* bioflavonoids, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46: 118-122.
69. Ercisli S, Coruh I, Gormez A, Sengul M, Bilen S. **2008**. Total phenolics, mineral contents, antioxidant and antibacterial activities of *Glycyrrhiza glabra* L. roots grown wild in Turkey. *Italian Journal of Food Science*, 20: 91-99.
70. Erdman Jr.J.W. **2000**. AHA Science Advisory: Soy protein and Cardiovascular Disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation: Journal of American Heart Association*, 102: 2555-2559.
71. Espinel-Ingroff A. **2007**. Standardized disk diffusion for yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29: 97-100.
72. Estévez-Braun, González A.G. **1997**. Coumarins. *Natural Product Reports*, 14: 465-475.

73. Fabricant D.S, Farnsworth N.R. **2001**. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109: 69-75.
74. Falleh H, Ksouri R, Medini F, Guyot S, Abdelly C, Magné C. **2011**. Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*, 34: 1066-1071.
75. Farag S.F, Ahmed A.S, Terashima K, Takaya Y, Niwa M. **2001**. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sissoo*. *Phytochemistry*, 57: 1263-1268.
76. FDA. **2005**. Guidance for industry-Nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients.
77. Ferrari J.P. **1984**. Dictionnaire étymologique de la flore française. Le chevalier, Paris.
78. Fintelmann V. **2004**. Manuel pratique de phytothérapie. Vigot, Paris.
79. Fleeger J.L, Flipse I.J. **1964** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 47: 535-538.
80. Fowler Z.L, Koffas M.A.G. **2009**. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 799-808.
81. Franke A.A, Hankin J.H, Yu M.C, Maskarinec G, Low S.H, Custer L.J. **1999**. Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 977-986.
82. Fritch H, Griesbach H. **1975**. Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry*, 14: 2437-2442.
83. Fuchs J. **1998**. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection, *Free Radical Biology and Medicine*, 25: 848-873.
84. Gaby A. **1988**. Deglycyrrhizinated licorice treatment of pepticulcer. *Food chemistry*, 56: 150-160.
85. Gali L, Bedjou F. **2019**. Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120: 163-169.
86. Garnier G, Debraux G, Bézanger-Beauquesne L. **1961**. Ressources médicinales de la flore française. Vigot Frères, tome II, Paris.

87. Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K. **2009**. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 2002-2008.
88. Ghasemzadeh A, Azarifar M, Soroodi O, Jaafar H.Z.E. **2012**. Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants. *Journal of Medicine Plant Research*, 6: 2639-2643.
89. Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. **2010**. *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) Réglisse. *Phytothérapie*, 8: 185-190.
90. Ghourri M, Zidane L, El Yacoubi H, Rochdi A, Fadli M, Douira A. **2012**. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc Saharien). *Journal of Forestry Faculty*, 12: 218-235.
91. Girre L. **1992**. La sante par les plantes. Rennes : Ouest France, p 221.
92. Girre L. **2001**. Les plantes et les médicaments. Paris : Delachaux et Niestle, p 253.
93. Goetz P. **2013**. La diversité de la phytothérapie. *Phytothérapie*, 11: 147-148.
94. Gordon M. **1996**. Dietary antioxydants in disease prevention. *Natural Product Reports*, 13: 265-273.
95. Gorger C, Scholz E, Rimpler H. **1994**. Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Medica*, 6: 384-385.
96. Greinwald R, Cants P, Bachmann P, Witte L, Czygan F.C. **1992**. Distribution and taxonomic signifiacnce of alkaloids in the *Genista cinerea* agregat. *Biochemical Systematics and Ecology*. 20: 75-81.
97. Griesbach R.J. **1996**. The inheritance of flower color in *Petunia hybrida* vilm. *Journal of Hereditary*, 87: 241-245.
98. Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L, Bouriche H. **2016**. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista saharae* (Coss. & Dur.). *Der Pharmacia Letter*, 8: 50-60.
99. Gutteridg, J.M.L, Halliwell B. **1994**, Antioxidants in nutrition, Health and Disease. Oxford University Press. Oxford.
100. Hagerman A.E, Riedl K.M, Jones G.A, Sovik K.N, Ritchard N.T, Hartzfeld P.W, Richel T.L. **1998**. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1887-1892.

101. Halbwirth H. **2010**. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 595-621.
102. Halliwell B, Gutteridge J. **2007**. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Oxford University Press.
103. Han Y, Nishibe S, Noguchi Y, Jin Z. **2001**. Flavanol glycosides from the stems of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry*, 58: 577-580.
104. Hanganu D, Olah N.K, Benedec D, Mocan A, Crisan G, Vlase L, Popica I, Oniga I. **2016**. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* L. Gams (*Fabaceae*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29: 301-307.
105. Harborne J.B. **1989**. Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 25: 85-109.
106. Harborne, J.B. **1993**. The Flavonoids: Advances in Research since 1986. Chapman & Hall, London.
107. Hartmann T. **2007**. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831-2846.
108. Hashimoto F, Jamal Uddin A.F.M, Shimizu K, Sakaba Y. **2004**. Multiple allelism in flavonoid hydroxylation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Flowers. *Journal of Japanese Society Horticultural Science*, 73: 235-240.
109. Haslam E, Cai Y. **1994**. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Reports*, 11: 41-66.
110. Hatano H, Fukuda T, Liu Y.Z, Noro T, Okud T. **1991**. Phenolic constituents of licorice. IV. Correlation of phenolic constituents and licorice specimens from various sources, and inhibitory effects of licorice extracts on xanthine oxidase and monoamine oxidase. *Yakugaku Zasshi*, 111: 311-321.
111. Hatano T, Yasuhara T, Fukuda T, Noro T, Okuda T. **1989**. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37: 3005-3009.

112. Hayashi H, Hattori S, Inoue K, Khodzhimatov O, Ashurmetov O, Ito M, Honda G. **2003**. Field survey of *Glycyrrhiza* plants in Central Asia (3). Chemical characterization of *G. glabra* collected in Uzbekistan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51: 1338-1340.
113. Hayashi H, Yamada K, Fukui H, Tabata M. **1992**. Metabolism of exogenous 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, 31: 2724-2733.
114. Heller W, Forkmann G. **1993**. The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, p 399-425.
115. Hertog M.G, Hollmann P.C, Katan M.B, Kromhout D. **1993**. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20: 21-29.
116. Hesse M. **2002**. Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?, Ed: WILEY-VCH, p 1-12.
117. Hikino H. **1985**. Recent research on oriental medicinal plants, in economic and medicinal plant research, H Wagner, H Hikino, NR Farnsworth (Eds), London, Academic Press, vol. 1, 53-85.
118. Hornok L. **1992**. Cultivation and processing of medicinal plants. Budapest: Akademiai Kiado.
119. Howes M.J.R, Perry N.S.L, Houghton P.J. **2003**. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, 17: 1-18.
120. Huxley A. **1992**. The new RHS dictionary of gardening. Edited by Mark Griffiths, ISBN 0-333-47494-5.
121. Huxtable R.J. **1990**. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacology and therapeutics*, 47: 371-389.
122. Indu H, Seenivasan R. **2013**. *In vitro* antioxidant activity of selected seaweeds from southeast coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 474-484.
123. Ito C, Itoigawa M, Kanematsu T, Ruangrunsi N, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. **2003**. Isoflavonoids from *Dalbergia olivari*. *Phytochemistry*, 64: 1265-1268.

124. Iwashina T. **2000**. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113: 287-299.
125. Jakupovic J, Paredes L, Bohlmann F, Watson L. **1988**. Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochemistry*, 27: 3273-3275.
126. Jia, P, Zhang J, Fang L, He Q, Yang B, Hu Y. **2009**. Design, synthesis and evaluation of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 772-784.
127. Jirawattanapong W, Saifah E, Patarapanich C. **2009**. Synthesis of glabridin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Archives of Pharmacal Research*, 32: 647-654.
128. Jiri D, Ondrej Z, Jiri S, Branislav R.N, Petr B, Miroslava B, Jindrich K, Jaromir H, Borivoj K, Rene K, Vojtek A. **2013**. Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants. *International Journal of Electrochemical Science*, 8: 4520-4542.
129. Jouglard J, Airaudo R, Richardot R. **1973**. Intoxication accidentelles par ingestion de graines de 'Mimosa du Japon'. *Bulletin de Médecine légale de Toxicologie*, 16: 55-58.
130. Ju S.H, Li X.J, Zhao B.L, Han Z.W, Xin W.J. **1989**. Effect of Glycyrrhiza flavonoids on lipid peroxidation and active oxygen radicals. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 24: 807-812.
131. Julkunen-Tiitto R. **1985**. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 213-217.
132. Kacem N, Roumy V, Dual N, Merouane F, Neut C, Christen P, Hostettmann K, Rhouati S. **2016**. Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*, 90: 87-93.
133. Kamei J, Nakamura R, Ichiki H, Kubo M. **2003**. Antitussive principles of *Glycyrrhiza radix*, a main component of Kampo preparations Bakumondo-to (Mai-men-dong-tang). *European Journal of Pharmacology*, 469: 159-163.
134. Kao T.C, Shyu M.H, Yen G.C. **2009**. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 754-761.
135. Karagözler A, Erdag B, Calmaz Emek Y, **2008**. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.

136. Karami Z, Mirzaei H, Emam-Djomeh Z, Sadeghi Mahoonak A.R, Khomeiri M. **2013**. Effect of harvest time on antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract and evaluation of its antibacterial activity. *International Food Research Journal*, 20: 2951-2957.
137. Karou D, Savadogo A, Canini A, Yameogo S, Montesano C, Simpore J, Colizzi V, Traore A.S. **2006**. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4: 1452-1457.
138. Kashani H.H, Hoseini E.S, Nikzad H, Aarabi M.H. **2012**. Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. *Life Science Journal*, 9: 509-520.
139. Kaufman P.B, Duke J.A, Brielmann H, Boik J, Hoyt J.E. **1997**. Comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 3: 7-12.
140. Keeler R.F. **1989**. Quinolizidine alkaloids in range and grain Lupins. *Toxicants of plant origin*, 1: 133-167.
141. Khalifa A.A. **2000**. Alkaloids and isoflavonoids from *Lupinus pubescens* benth. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 23: 117-123.
142. Kilani-Jaziri S, Bhourri W, Skandrani I, Limem I, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. **2011**. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. *South African Journal of Botany*, 77: 767-776.
143. Kinoshita T, Kajiyama K, Hiraga Y, Takahashi K, Tamura Y, Mizutani K. **1996**. Isoflavan derivatives from *Glycyrrhiza glabra* (licorice). *Heterocycles*, 43: 581-588.
144. Köing M, Seholz E, Hartmann R, Lehmann W, Rimpler H. **1994**. Ellagitannins and complex tannins from *Quercus patrae* bark. *Journal of Natural Products*, 57: 1411-1415.
145. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C. **2008**. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus de Biologies*, 331: 865-873.
146. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, Bakhrouf A, Magné C, Abdelly C. **2009**. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2083-2091.
147. Kumar R, Sharma R.J, Bairwa K, Roy R.K, Kumar A. **2010**. Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents. *Der Pharma Chemica*, 2: 66-93.

148. Lakhdari W, Dehliz A, Acheuk F, Mlik R, Hammi H, Doumandji-Mitiche B, Gheriani S, Berrekbia M, Guermit K, Chergui S. **2016**. Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4: 204-211.
149. Leda Mathias, Ivo J.C. Vieira, Bras-Filho R, Rodrigues-Filho E. **1998**. A new isoflavone glycoside from *Dalbergia nigra*. *Journal of Natural Products*, 61: 1158-1161.
150. Lee H.P, Gourley L, Duffy S.W, Estéve J, Lee J, Day N.A. **1991**. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*, 337: 1197-1200.
151. Lee J.Y, Cho P.Y, Kim T.Y, Kang S.Y, Song K.Y, Hong S.J. **2002**. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296: 1238-1244.
152. Lee W.M, Sung H.J. Jong C, Cho J.Y. Park H.J. Kim S, Rhee M.H. **2007**. Effects of solvent-extracted fractiond from *Salicornia herbacae* on anti-oxydative activity and lipopolysaccharides-induced NO production in murine macrophage RAW 246.7 cells. *Journal of Experimental Biology and Medicine Science*, 13: 161-168.
153. Lekhal H, Boudiar T, Kabouche A, Laggoune S, Kabouche Z, Topçu G. **2011**. Flavonoids and antioxidant activity of *Stachys ocymastrum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46: 964-966.
154. Leopoldini M, Russo N, Toscano M. **2010**. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125: 288-305.
155. Liao W.C, Lin Y.H, Chang T.M, Huang W.Y. **2012**. Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components. *Food Chemistry*, 132: 2188-2193.
156. Liao W.C, Lin Y.H, Chang T.M, Huang W.Y. **2012**. Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components. *Food Chemistry*, 132: 2188-2193.
157. Lograda T. **1996**. Variabilités cariologiques et biochimiques de quatre espèces endémiques du genre *Genista* L. Thèse de magister en biologie végétale. Université Ferhat Abbas-Sétif.
158. Lograda T. **2010**. Etude caryologique et phytochimique de six espèces endémiques de genre *Genista* L. en Algérie. Diplôme de Doctorat d'état en science. Option Biologie Végétal. Université Farhat Abbas-Setif. Faculté des Science Département de Biologie.

159. Lopez Lazaro M, Martin-Cordero C, Iglesias-Guerra F, Ayuso Gonzalez. **1998**. An isoflavones glucoside from *Retama sphaerocarpa* boissier, *Phytochemistry*, 48: 401-402.
160. Luo J, Wang A, Zhen W, Wang Y, Si H, Jia Z, Alkhalidy H, Cheng Z, Gilbert E, Xu B, Liu D. **2018**. Phytonutrient genistein is a survival factor for pancreatic  $\beta$ -cells via GPR<sub>30</sub>-mediated mechanism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 58: 59-70.
161. Maanani Dj, Segueni N, Rhouati S, Çakmak Y.S, Asan-Ozusaglam M, May A, Zellagui A, Akkal S. **2018**. Phenolic contents, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Genista microcephala* (Coss. & Dur.). *Acta Scientifica Naturalis*, 5: 8-22.
162. Maatouk M, Elgueder D, Mustapha N, Chaaban H, Bz  ouich I.M, Loannou I, Kilani S, Ghoul M, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. **2016**. Effect of Heated Naringenin on Immunomodulatory Properties and Cellular Antioxidant Activity. *Cell Stress Chaperones*, 21: 1101-1109.
163. Maire R. **1987**. La flore de l'Afrique du Nord. Les *Légumineuses.*, Lechevalier Ed., Paris XVI, p 123-193.
164. Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon M.H. **2007**. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100: 1409-1418.
165. Manoj M, Nitalikar K.C, Balaji M, Dhore V, Sajid N, Shikalgar. **2010**. Studies of antibacterial activities of *Glycyrrhiza glabra* root extract. *International Journal of PharmTech Research*, 2: 899-901.
166. Marc F, Davin A, Degl  ne-Benbrahim L, Ferrand C, Baccaunaud M, Fritsch P. **2004**. Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. *Médecine Sciences*, 20: 387-490.
167. Matsuda H, Yano M, Kubo M, Linuma M, Oyama M, Mizuno M. **1991**. Pharmacological Study on *Citrus* fruits. II. Anti-allergic effect of fruit *Citrus unshiu* Markovich (2). On Flavonoid Components. *Yakugata Zasshi*, 111: 193-198.
168. Maylona P, Pawlowski K, Bessiling T. **1995**. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*, 7: 869-885.
169. Mebarki N. **2010**. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application a la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, magister en génie des proc  des chimique et pharmaceutiques, Université M'Hamed Bougara Boumerdes, p 11.

170. Mehreen L, Iqbal L, Nudrat F, Kauser S, Nighat A, Muhammad Z, Mansoor A. **2012**. Evaluation of antioxidant and urease inhibition activities of roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25: 99-102.
171. Mekkiou R, Touahar H, Dijoux-Franca M.G, Mariotte A.M, Benayache S, Benayache F. **2005**. A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 635-638.
172. Melzig M.F, Bader G, Loose R. **2001**. Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica*, 67:43-48.
173. Meriane Dj, Genta-Jouve G, kaabache M, Michel S, Boutefnouchet. **2014**. Rapid identification of antioxidant compounds of *Genisa saharae* (Coss. & Dur.) by combination of DPPH scavenging assay and HPTLC-MS. *Molecules*, 19: 4369-4379.
174. Messier C, Grenier D. **2011**. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. *Mycoses*, 54: e801-806.
175. Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R. **2004**. Botanique, biologie et physiologie végétales. Maloine, Paris.
176. Morreel K, Goeminne G, Storme V, Sterck L, Ralph J, Coppieters W, Breyne P, Steenackers M, Georges M, Messens E, Boerjan W. **2006**. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 47: 224-237.
177. Muhammad A, Tel-Çayan G, Öztürk M, Duru M.E, Nadeem S, Anis I, Ng S.W, Shah M.R. **2016**. Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure-activity relationships. *Pharmaceutical Biology*, 54: 1649-1655.
178. Muniz M.N. **2006**. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)- camptothécine, Thèse de doctorat en chimie. Université Joseph Fourier -Grenoble I, p 17.
179. Murugan T, Wins J.A, Murugan M. **2013**. Antibacterial activity and phytochemical constituents of leaf extract of *Cassia auriculata*. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 75: 122-125.
180. Mute V.M. **2009**. Anthelmintic effect of *Tamarind indica* linn leaves juice extract on *Pheretima posthuma*. *International Journal of Pharma Research and Development*, 7: 1-6.

181. Nakajima T, Imanishi M, Yamamoto K, Cyong J.C, Hirai K. **2001**. Inhibitory effects of Baicalein, a Flavonoid in *Scutellaria* Root, on Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts. *Planta Medica*, 67: 132-135.
182. Namdeo A. G. **2007**. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 69-79.
183. Nassiri M.A, Hosseinzadeh H. **2008**. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 22: 709-724.
184. Ncube N.S, Afloyan A.J, Okoh A.I. **2008**. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7: 1797-1806.
185. Néve, J. **2002**. Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16: 292-300.
186. Newall C.A, Anderson L.A, Phillipson J.D, **1996**. Herbal Medicines. *The Pharmaceutical Press*, London, p 25.
187. Newmann D.J, Cragg G.M. **2012**. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75: 311-335.
188. Nostro A, Germano M.P, D'angelo V, Marino A, Cannateli M.A. **2000**. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 379-384.
189. Olukoga A, Donaldson D. **1998**. Historical perspectives on health. The history of liquorice: the plant, its extract, cultivation, and commercialization and etymology. *Journal of the Royal Society of Health*, 118: 300-304.
190. Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 45: 133-143.
191. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **2002**. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005, Genève : 1-65.
192. Osama B.A, Hosny A.A, Halaweish F.T, et Halim A.F. **2000**. Isoflavonoids and Alkaloids from *Spatidium saharae*. *Natural Product Sciences*, 6: 189-192.
193. Oyaizu M. **1986**. Study on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

194. Oyedeji O, Taiwo F.O, Ayinde F.O, Ajayi S.O, Ozeigbe M, Kelani M.T, Adewole H. **2014**. *In vitro* antimicrobial and antioxidant analysis of gallic acid from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. *European Journal of Medicinal Plants*, 4: 1098-1112.
195. Ozenda P. **1991**. Flore et végétation du Sahara. Paris : 3<sup>ème</sup> édition CNRS, p 279-280.
196. Özyürek M, Gülçü K, Apak R. **2011**. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30: 652-664.
197. Palici I.F, Liktör-Busa E, Zupkó I, Touzard B, Chaieb M, Urban E, Hohmann J. **2015** Study of *in vitro* antimicrobial and ant proliferative activities of selected Saharan plants. *Acts Biological Hungarica*, 66: 385-394.
198. Patel J, Kumar G.S, Qureshi M.S, Jena P.K. **2010**. Anthelmintic activity of ethanolic extract of whole plant of *Eupatorium odoratum*. *International Journal of Phytomedicine*, 2: 127-132.
199. Patil S.M, Patil M.B, Sapkale G.N. **2009**. Antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* linn roots. *International Journal of Chemical Science*, 7: 585-591.
200. Pawlowska A.M, De Leo M, Braca A. **2006**. Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 10234-10238.
201. Pitchamuthu A, Muthiah G, Rajaram P. **2012**. Preliminary study on the antimicrobial activity on *Enicostem malittorale* using different solvents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5: 552-555.
202. Prasad K.N, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, Jiang Y. **2009**. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 627-632.
203. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. **1999**. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269: 337-341.
204. Quezel P, Santana S. **1963**. Nouvelle flore Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, édition du Centre National de Recherche Scientifique Paris. p 1170.
205. Quezel P, Santana S. **1963**. Nouvelle flore Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, édition du Centre National de Recherche Scientifique Paris. p 1170.
206. Ramesh B.N, Rao T.S.S, Prakasam A, Sambamurti K, Rao K.S.J. **2013**. Neuronutrition and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 19: 1123-1139.

207. Rates S.M. **2001**. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613.
208. Rauter A.P, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro L.M, Araújo M.E, Borges C, Justino J, Silva F.V, Goulart M, Thomas-Oates J, Rodrigues J.A, Edwards E, Noronha J.P, Pinto R, Mota-Filipe H. **2009**. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 384-393.
209. Ravanfar P, Namazi G, Borhani-Haghighi A, Zafarmand S. **2018**. Neurologic effects of licorice: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 12: 115-119.
210. Ravindranath M, Muthugounder S, Presser N, Viswanathan S. **2004**. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 546: 121-165.
211. Raynal N, Momparler L, Charbonneau M, Momparler R.L. **2008**. Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products. *Journal of Natural Product*, 71: 3-7.
212. Ree R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evens C, **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
213. Rensen I.V, Wray V, Witte L, Canto P, Greinwald R, Veen G, Veit M, Czygan F.C. **1994**. Ester Alkaloids of *Genista Cinerea* Subspecies *Cinerea*., *Phytochemistry*, 35: 421-424.
214. Rhee K, Van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. **2001**. Screening for Acetylcholinesterase inhibitors using silica gel chromatography in combination with bioactive staining. *Journal of Chromatography A*, 915: 217-223.
215. Richter G. **1993**. Métabolisme des végétaux. *Physiologie et Biochimie*. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, p 322-323.
216. Ríos M.J, Recio M.K. **2005**. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
217. Rodney C, Kutchan T.M, Lewis N.G. **2000**. Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, (Eds.), American Society of Plant Physiologists, pp.1268-1277.
218. Ross I. **2001**. Medicinal plants of the world. Totowa: Humana Press, vol. 2, p 487.

219. Ruiz-Larrea M.B, Mohan A.R, Paganga G, Miller N.J, Bolwell G.P, Rice-Evans C.A. **1997**. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Research*, 26: 63-70.
220. Sacks F.M, Lichtenstein A.H, Van Horn L, Harris W.S, Kris-Etherton P, Winston M. **2006**. American Heart Association Nutrition Committee. Soy protein, isoflavones, and Cardiovascular Health: An American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, 113: 1034-1044.
221. Saitoh T, Kinoshita T, Shibata S. **1976**. New isoflavan isolated from licorice root. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24: 752-755.
222. Saoudi M. **2008**. Les bactéries nodulant les légumineuses (BNLP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister : Génomique et Techniques Avancées de Végétaux. Constantine: Université Mentouri de Constantine, p 11-12.
223. Sarni-Manchado P, Cheynier V. **2006**. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, p 300-398.
224. Sasaki K, Takahashi T.A. **2002**. flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry*, 61: 339-343.
225. Saxena R.C, Gupta R.N, Gupta G.P, Bhargava K.P. **1965**. Aclinical trial of *Glycyrrhiza glabra* in pemphigus. *Journal of the Indian Medical Profession*, 12: 5575-5576.
226. Scarpato R, Paganucci L, Bertoli A, Fiore L, Pistelli L, Federico G. **2008**. Licoflavone C attenuates the genotoxicity of cancer drugs in human peripheral lymphocytes. *Phytotherapy Research*, 22: 1650-1654.
227. Schauenberg P, Paris F. **2005**. Guide des plantes médicinales. Paris : Delachaux et Niestle, p 396.
228. Seeram N.P, Henning S.M, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. **2006**. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition*, 136: 2481-2485.
229. Seigler D.S, Seilheimer S, Keesy J, Huang H.F. **1986**. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and northeastern Mexico. *Economic Botany*, 40: 220-232.
230. Shahat A.A, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda F.M, Ismail S.I, Azzam S, Claeys M, Goovaets E, Pieters L, Bergue D.V, Vlietinck A.J. **2002**. Antiviral and

- Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica*, 68: 539-541.
231. Shanker K, Fatima A, Negi A.S, Gupta M, Darokar M.P, Gupta M.M, Khanuja S.P.S. **2007**. RP-HPLC method for quantitation of Glabridin in Yashti-madhu (*Glycyrrhiza glabra*). *Chromatographia*, 65: 771-774.
232. Sharma A, Chandraker S, Patel V.K, Ramteke P. **2010**. Antimicrobial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71: 136-139.
233. Sharma U.S, Sharma U.K, Singh A, Sutar N, Singh P.J. **2010**. *In vitro* anthelmintic activity of *Murraya koenigii* linn. Leaves extracts. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1: 1-4.
234. Sharma V, Agrawal, R.C, Pandey S. **2013**. Phytochemical screening and determination of antibacterial and antioxidant potential of *Glycyrrhiza glabra* root extracts. *Journal of Environmental Research and Development*, 7: 1552-1558.
235. Shimada T. **2006**. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1149-11463.
236. Shimizu N, Tomoda M, Satoh M, Gonda R, Ohara N. **1991**. Characterization of a polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the stolon of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39: 2082-2086.
237. Shinoda J, Ueeda S. **1934**. Über das Flavanonglucosid in *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et Herder. *Chemische Berichte*, 67: 434-440.
238. Si H, Liu D. **2008**. Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutrition*, 138: 297-304.
239. Simmler C, Pauli G.F, Chen S.N. **2013**. Phytochemistry and biological properties of Glabridin. *Fitoterapia*, 90: 160-184.
240. Srinivasan M, Lahiri D.K. **2015**. Significance of NF- $\kappa$ B as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19: 471-487.
241. Strack D, Wray V. **1992**. Anthocyanins. In J.B. Harborne (ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 1-22.

242. Strack, D. **1997**. Phenolic metabolism. In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, p 387-416.
243. Sultana S, Haque A, Hamid K, Urmi K.F, Roy S. **2010**. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1: 957-960.
244. Sutar N, Garai R, Sharma U.S, Sharma U.K. **2010**. Anthelmintic activity of *Platyclusus orientalis* leaves extract. *International Journal of Parasitology Research*, 2: 1-3.
245. Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E, **2008**. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76: 899-905.
246. Tang W, Eisenbrand G. **1992**. Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, Berlin.
247. Taylor P, Camp S, Radić Z. **2009**. Acetylcholinesterase. In: Larry, R. S. ed. *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, Oxford, pp. 5-7.
248. Thakur D, Abhilasha, Jain A, Ghoshal G. **2016**. Evaluation of phytochemical, antioxidant and antimicrobial properties of Glycyrrhizin extracted from roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Scientific Research*, 75: 487-494.
249. Tiwari P, Kumar B, Kumar M, Kaur G, Kaur H. **2011**. Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 98-106.
250. Tomás-Barberán F.A, Iniesta-Sanmartin E, Ferreres F, Tomás-Lorente F. **1990**. High Performance Liquid Chromatography, thin layer chromatography and ultraviolet behavior of flavones aglycone with unsubstituted B rings. *Phytochemical Analysis*, 1: 44-47.
251. Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarikürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. **2007**. A new flavon from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816-822.
252. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **2002**. USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods. Nutrient Data Laboratory Web Site (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>).
253. Vaya J, Belinky P.A, Aviram M. **1997**. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 302-313.
254. Venugopal A, Dasani S, Rai S. **2009**. Antibacterial Effect of Herbs and Spices Extract on *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biology*, 5: 40-44.

255. Vermerius W, Nicholson R. **2006**. Isolation and identification of phenolic compounds biochemistry, published by Springer, Dordrecht, pp. 35-62-151-191.
256. Vidyadhar S, Saidulu M, Gopal T.K, Chamundeeswari D, Rao U, Banji D. *In vitro* anthelmintic activity of the whole plant of *Enicostemma littorale* by using various extracts. International journal of applied biology and pharmaceutical technology 2010; 1(3): 1119-1125.
257. Vinutha B, Prashanth D, Salma K, Sreeja S.L, Pratiti D, Padmaja R, Radhika S, Amit A, Venkateshwarlu K, Deepak M. **2007**. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 359-363.
258. Visavadiya N.P, Soni B, Dalwadi N. **2009**. Evaluation of antioxidant and anti-atherogenic properties of *Glycyrrhiza glabra* Linn root using *in vitro* models. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60: 135-149.
259. Vuolo M.M, Lima V.S, Maróstica Junior M.R. **2019**. Chapter 2 – Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications*, p 33-50.
260. Wang G.S, Han J, Zhao L.W, Jiang D.X, Liu Y.T, Liu X.L. **2010**. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. *Phytomedicine*, 17: 1102-1105.
261. Watanabe K, Kinjo J, Nohara H. **1993**. Three new isoflavonoid glycosides from *Lupinus leteus* and *L. polyphyllus*×*arboreus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41: 394-396.
262. Wichtl M, Anton R. **2003**. *Plantes thérapeutiques-Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. TEC & DOC 2<sup>ème</sup> édition, Paris.
263. Wilson A. **1987**. Flavonoid pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridon* Poda) and other lycaenid butterflies. *Journal of Chemical Ecology*, 13: 473-493.
264. Wink M, Witte L. **1993**. Quinolizidine alkaloids in *Genista acanthoclada* and its holoparasite, *Cuscuta palaestina*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 441-448.
265. Wojciechowski M.F, Lavin M, Sanderson M.J. **2004**. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 11: 1846-2004.
266. Wojciechowski M.F, Lavin M, Sanderson M.J. **2004**. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 11: 1846-2004.

267. Zablutowicz R.M, Hoagland R.E, Wagner S.C. **1996**. Effect of saponins on the growth and activity of rhizosphere bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 405: 83-95.
268. Zahalka J.P. **2005**. Les plantes en pharmacie: propriétés et utilisations. Paris: Editions du Dauphin, p 239.
269. Zapesochnaya G.G, Laman N.A. **1977**. Vses. Nawchn-Issled. INST. LEK. RAST Moscow ,USSR Khim .Prir. Soedin .(6), p. 862 -864.

## ملخص :

يركز هذا العمل على دراسة المكونات الكيميائية والأنشطة البيولوجية للمستخلصات المستخرجة من نباتين طبيئتين *Glycyrrhiza glabra* L. و *Genista saharae* (Cos. & Durr.) و اللتان تنتميان إلى عائلة البقوليات والمعروفتان بامتلاكهما لخصائص علاجية متعددة.

التركيبية الكيميائية لمستخلصات الجزء العلوي لنبات *G. saharae* و جذور نبات *G. glabra* تمت معاينتهما باستعمال الفصل الكروماتوغرافي عالي الإستبانة مع رسم البنية الكيميائية بأسلوب التصوير بالرنين المغناطيسي. لدراسة النشاط المضاد للأكسدة استخدمت طرق الأكسدة الإرجاعية بانتقال ذرة الهيدروجين أو/و الإلكترون المفرد. كما تطرقنا لتقييم النشاط المضاد للميكروبات حسب النحو الموصى به من قبل معهد المعايير العيادية و المخبرية. وتم اختبار انحلال الكريات الدموية الحمراء بقياس نسبة تسرب الهيموغلوبين. في حين قدر النشاط المثبط لأنزيم كولين الإستيراز باستخدام إنزيمي الأستيل كولين إستيراز AChE و البيبيرييل كولين إستيراز BChE.

معاينة الكروماتوغرافيا السائلة العالية الكفاءة (HPLC) أثبتت عن وجود أحماض الفينول، حمض الهيدروسيناميك و الفلافونويدات من فئة الفلافونول، إيزوفلافان و الفلافونون. كما أوضحت صور طيف الرنين المغناطيسي عن بنية الجنيستين المستخلصة من نبات *G. saharae* و الجلابريدين من نبات *G. glabra*. فيما يخص قدرة مستخلص الكلوروفورم و إيثيل الأستات للنباتين كمضادات الأكسدة تبين أنها ذات أهمية مع تراكيز مثبطة بنسبة 50% تساوي  $IC_{50ABTS} = 0.15 \pm 4.03$  و  $0.99 \pm 3.4$  مكغ/مل ومع  $A_{0.5CUPRAC} = 35.63 \pm 1.42$  و  $2.91 \pm 21.78$  مكغ/مل. وأوضحت الدراسة أن مستخلص الكلوروفورم للنباتين أثبت نجاعته اتجاه البكتيريا بتركيز أدنى مثبط يساوي  $MIC = 19.5$  مكغ/مل. علاوة على ذلك أظهر مستخلص الكلوروفورم لجذور *G. glabra* نشاطا مثبطا قويا لأنزيم البيبيرييل كولين إستيراز بتركيز مثبط يساوي  $IC_{50BChE} = 0.72 \pm 4.72$  مكغ/مل. أما بالنسبة لاختبار انحلال الدم عن طريق قياس نسبة تسرب الهيموغلوبين تبين أن المستخلصات المدروسة لا تملك أي تأثير سام ملحوظ على الكريات الدموية الحمراء.

**الكلمات المفتاحية:** البقوليات، الفصل الكروماتوغرافي عالي الإستبانة، التصوير بالرنين المغناطيسي، النشاط المضاد للأكسدة، التركيز الأدنى المثبط، البيبيرييل كولين إستيراز.

## Résumé

Ce travail porte sur l'étude des constituants phytochimiques et les activités biologiques *in-vitro* des extraits de ces deux plantes *Genista saharae* (Cos. & Durr.) et *Glycyrrhiza glabra* L. appartenant à la famille des *Fabacées*.

La composition chimique des extraits de la partie aérienne de la plante *G. saharae* et les racines de *G. glabra* a été analysée via une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA et une caractérisation par RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ . L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier. L'activité antimicrobienne des extraits a été testée vis-à-vis de différentes souches en utilisant la méthode de diffusion des disques et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). En outre, le test d'hémolyse a été réalisé par le suivi de la fuite d'hémoglobine. Tandis que, l'activité inhibitrice du cholinestérase a été estimée par deux enzymes l'acétylcholinestérase AChE et la butyrylcholinestérase BChE.

L'analyse chromatographique a mis en évidence la présence des acides phénoliques, des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes (les flavonols, les isoflavanes et les flavanones). Ce pendant, la caractérisation par RMN nous a permis d'élucider la structure de la génistéine à partir de la plante *G. saharae* et la glabridine de l'espèce *G. glabra*. Le potentiel antioxydant des extraits chloroformiques et acétates d'éthyles des deux plantes s'est révélé intéressant avec des  $CI_{50ABTS} = 4,03 \pm 0,15$  et  $3,45 \pm 0,99$   $\mu g/mL$  respectivement et avec une  $A_{0,5CUPRAC} = 35,63 \pm 1,42$  et  $21,78 \pm 2,91$   $\mu g/mL$ . Les extraits chloroformiques des deux plantes ont montré un pouvoir antibactérien important avec une CMI de l'ordre de 19,5  $\mu g/mL$ . En plus, l'extrait chloroformique de *G. glabra* a manifesté une puissante activité inhibitrice de BChE avec une  $IC_{50}$  de  $4,72 \pm 0,72$   $\mu g/mL$ , une valeur supérieure comparée à celle du standard galantamine. Enfin les tests d'hémolyse des extraits des deux plantes n'ont pas montré d'effet toxique vis-à-vis des globules rouges humains.

**Mots clés:** *Genista saharae* (Cos. & Durr.), *Glycyrrhiza glabra* L., RP-HPLC-PDA, RMN, ABTS, CUPRAC, CMI, BChE.

## Abstract:

This work is based on the study of phytoconstituents and *in-vitro* biological activities of two plants *Genista saharae* (Cos. & Durr.) and *Glycyrrhiza glabra* L. which belonging to the *Fabaceae* family.

The chemical compositions of aerial part of *G. saharae* and *G. glabra* roots extracts were analyzed by the high performance liquid chromatography and characterized with  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR. The antioxidant activities were evaluated using hydrogen atoms and single electron transfer. The antimicrobial activity of the extracts was realized against different strains using the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The hemolysis test was performed by following the hemoglobin leakage. When, the cholinesterase inhibitory activity was performed through the acetylcholinesterase and butyrylcholinestrerase enzymes.

The chemical analysis revealed the presence of phenolic acids, hydroxycinnamic acid and flavonoids illustrated by the presence of flavonol, isoflavane and flavanones. However, the NMR spectroscopy allowed the characterization of genistein from *G. saharae* plant and glabridin structure from *G. glabra* plant. The antioxidant assays revealed that chloroformic and ethyl acetate extracts are the best among the others extracts with a  $IC_{50ABTS} = 4.03 \pm 0.15$  and  $3.45 \pm 0.99$   $\mu g/mL$ , respectively and with an  $A_{0.5CUPRAC} = 35.63 \pm 1.42$  and  $21.78 \pm 2.91$   $\mu g/mL$ . The chloroformic extracts of both *Fabaceae* presented the effective antibacterial activity with MIC's = 19.5  $\mu g/mL$  against the most tested bacteria. Moreover, the same extract showed a potent butyrylcholinestrerase inhibitory activity with  $IC_{50BChE} = 4.72 \pm 0.72$   $\mu g/mL$ , which is too strong then the standard drug. When, the hemolysis tests of two plant extracts showed that the extracts didn't have a toxic effect against human blood cells.

**Keywords:** *Genista saharae* (Cos. & Durr.), *Glycyrrhiza glabra* L., RP-HPLC-PDA, NMR, ABTS, CUPRAC, MIC, BChE.