République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des substances naturelles et bioactives

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Option : **Molécules Bioactives : Synthèses et Applications**

Présenté Par : **M^me^ Allal Asma**

Etude phytochimique et activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen: *Psoralea bituminosa* L.

Soutenu le : 05/06/2016 **Devant le jury**

Président	Nabila AIN SEBAA	MC(A)	Université de Tlemcen
Examinateurs	Nassim DJABOU	MC(A)	Université de Tlemcen
	Nouria MERAD	MC(A)	Université de Tlemcen
Promoteur	Chaouki SELLES	MC(A)	Université de Tlemcen

Année universitaire: 2015-2016

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie Dieu pour m'avoir donné la santé, le courage et la volonté pour achever ce travail, qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives «LASNABIO » de la faculté des sciences, Université de Tlemcen.

Ce mémoire a été réalisé sous l'encadrement du **Dr. Chaouki SELLES**. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encadré et veillé au bon déroulement de ce travail. Merci d'avoir toujours été disponible et pour m'avoir guidé par vos conseils et orientations. Merci infiniment pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Le présent travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour cela je tiens à remercier son directeur **Pr. Saïd GHALEM.**

J'exprime mes sincères remerciements au **Pr. Amine DIB** de m'avoir aidé à réaliser les analyses chromatographiques au laboratoire de chimie organique, substances naturelles et Analyses (COSNA).

Que Mesdames et Messieurs les membres de jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes remerciements les plus sincères pour l'intérêt qu'ils portent pour juger ce modeste travail, en l'occurrence : M^{mes} **MERAD Nouria**, **AINSEBA Nabila** et M^{r} **DJABOU Nassim**.

Mes vifs remerciements vont à M^{lle} **Nassima Benmansour**, M^{lle} **Radia Lemouchi** pour leurs orientations et leurs aides.

Que Mademoiselle **Imen TERBECHE** Ingénieur de laboratoire, reçoive ma vive reconnaissance pour son aide technique si précieuse.

Un grand merci à tous mes amis de la promotion du Master MBSA, et plus particulièrement : **Nesrine** et **Sakina**. Je vous remercie tout simplement d'être vous-même et pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.

J’adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père, mon mari, mon grand-père et mes frères, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.

Merci à ceux et celles qui m’ont aidé d’une façon ou d’une autre, de près ou de loin dans mon travail, je les remercie du fond du cœur.

Dédicaces

A mes parents, que dieu les garde,

en témoignage de ma profonde affection.

Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien.

Mes remerciements s'adressent également à mon mari Lotfi,

qui est la personne la plus chère,

pour son soutien et sa patience durant cette année.

A mon fils Mohamed Abdenour

A mes frères : Oussama et Nadir

A mes grands-parents

Au soutien de mon amie Asma AGHA-MIR que j'ai perdue et qui n'a pas pu partager ma réussite. Qu'elle puisse reposer en paie dans sa tombe

A mes chères amies :

Ibtissem, Nassima, Batoul, Awatif

Sommaire

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des abbreviations

INTRODUCTION GENERALE 1

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Etude botanique

I. La famille des Fabaceae: 5

I.1. Caractères botaniques de la famille: 5

I.2. Présentation de l'espèce *Psoralea bituminosa* L.: 6

I.2.1. Etymologie: 6

I.2.2. Ecologie et habitat: 6

I.2.3. Classification systématique: 6

I.2.4. Description botanique: 7

I.2.5. Ethnopharmacologie: 7

I.2.6. Utilisations traditionnelles: 7

I.2.7. Autres usages: 8

I.2.8. Travaux scientifiques réalisés sur *Psoralia bituminosa* L.: 8

Chapitre II: Les métabolites secondaires

II. Les polyphénols: 13

II.1. Les flavonoïdes: 13

II.1.1. Structure et classification: 13

II.1.2. Localisation et distribution: 14

II.1.3. Les principales classes de flavonoïdes: 14

II.1.4. Activités anti oxydantes des flavonoïdes: 15

II.2. Les tanins: 16

II.2.1. Localisation et distribution: 16

II.2.2. Classification: 16

Chapitre III: Activité antioxydante

III. Antioxydants: 18

III.1. Définition: 18

III.2. Mécanisme d'action: 18

III.3. Radicaux libres: 18
III.3.1. Définition: 18
III.3.2. Origine des radicaux libres: 18

Partie II : Étude Expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1.Matériel végétal: 22
IV.2. Criblages phytochimiques: 22
IV.2.1.Préparation des extraits (aqueux et éthanolique): 22
IV.2.2.Tests de caractérisation: 22
IV.2.3.Réactifs de caractérisation: 24
IV.3. Extraction: 25
IV.3.1. Principe de l'extraction par soxhlet: 25
IV.3.2. Expérimentation: 25
IV.4.Extraction des composés phénoliques: 26
IV.4.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques: 26
IV.4.2. Extraction des flavonoïdes: 26
IV.4.3. Extraction des tanins: 27
IV.5.1. Extraction des insaponifiables: 28
IV.5.2.Extraction des acides gras: 29
IV.5.3. Calcul du rendement: 29
IV.6. Évaluation de l'activité antioxydante: 29
IV.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH: 29
IV.6.2. Test de la réduction du fer FRAP: 30
IV.6.3. Test de blanchissement ou de décoloration du bêtacarotène: 30

Chapitre V: Résultats et discussion

V.1. Criblage phytochimique: 33
V.2. Rendements des extraits par solvants de polarité croissante: 34
V.3. Rendements en extraits secs des composés phénoliques: 34
V.4. Extraction des acides gras et des insaponifiables: 35
V.5. Activité anti oxydante: 36
V.5.1.Introduction: 36
V.5.2. Test de piégeage du radical libre DPPH: 37
V.5.3. Test de réduction de fer FRAP: 40

V.5.4. Test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène: 43
Conclusion générale.....47
Références bibliographiques.....50
Annexe.

Liste des Figures

Figure 1 : Feuilles de *P.bituminosa*…….. 7

Figure 2 : Fleurs de *P.bituminosa*…….. 7

Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes……... 13

Figure 4 : Montage de l'extracteur Soxhlet……. 25

Figure 5 : Protocole d'obtention des extraits bruts……. 26

Figure 6 : Schéma d'extraction des flavonoïdes…….. 27

Figure 7 : Protocole d'extraction des tanins…… 28

Figure 8 : % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante..... 38

Figure 9 : % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante……... 38

Figure 10 : % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait méthanolique des différentes parties de la plante…….. 38

Figure 11 : % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante……. 38

Figure 12 : % d'inhibition du radical libre DPPH● des différents extraits des composés phénoliques…… 40

Figure 13 : Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante……. 41

Figure 14 : Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante ……. 41

Figure 15 : Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait méthanolique des différentes parties de la plante ……. 42

Figure 16 : Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante ……... 42

Figure 17 : Pouvoirs réducteurs du fer des différents extraits des composés phénoliques…….. 43

Figure 18 : % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante…… 44

Figure 19 : % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante…….. 44

Figure 20 : % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait méthanolique des différentes parties de la plante……... 45

Figure 21 : % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante……... 45

Liste des Tableaux:

Tableau 1	**:**	Composés majoritaires des HE des feuilles, des fleurs et des graines …….	9
Tableau 2	**:**	Composés majoritaires des HE des feuilles et des fleurs ……	10
Tableau 3	**:**	Criblage phytochimique de la partie aérienne de *Psoralea bituminosa* L……..	33
Tableau 4	**:**	Rendements des différents extraits de la plante……	34
Tableau 5	**:**	Rendements en extraits polyphénoliques de la partie aérienne ...	35
Tableau 6	**:**	Composition en acides gras (proportions m/m exprimées par rapport au total des acides gras)……...	36
Tableau 7	**:**	Capacité antioxydante (DPPH) des extraits des composés phénoliques……..	37
Tableau 8	**:**	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le système DPPH des quatre extraits des feuilles, tiges, racines de la plante	39
Tableau 9	**:**	Capacité antioxydante (DPPH) des extraits des composés phénoliques……..	39
Tableau 10	**:**	Valeurs des IC50 pour le système DPPH des extraits des composés phénoliques ……	40
Tableau 11	**:**	Capacité antioxydante (FRAP) des Quatre extraits des feuilles, des tiges et des racines de *P. bituminosa* L…….	41
Tableau 12	**:**	Capacité antioxydante (FRAP) des extraits des composés phénoliques……...	42
Tableau 13	**:**	Capacité antioxydante (β-carotène) des Quatre extraits des feuilles, des tiges et des racines de *P.bituminosa* L……	44
Tableau 14	**:**	Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le système β-carotène des quatre extraits des feuilles, tiges, racines de la plante……	45

Liste des abbreviations:

Abs	**:**	Absorbance.
BHT	**:**	Hydroxytoluène butylé.
BHA	**:**	(hydroxyanisol butylé).
C	**:**	Concentration.
cm	**:**	Centimètre.
Chl	**:**	Chloroforme
DO	**:**	Densité Optique.
DPPH	**:**	2, 2-Diphényl-1- Picrylhydrazyle.
DCM	**:**	Dichloromethane.
F	**:**	Feuille.
FRAP	**:**	Ferric Reducing Ability of Plasma.
GC	**:**	Chromatographie en Phase Gazeuse.
GC-MS	**:**	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.
g	**:**	gramme.
H_2O	**:**	Aqueux.
IC_{50}	**:**	Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres.
L	**:**	Litre.
M	**:**	molarité.
mg	**:**	milligramme.
ml	**:**	millilitre.
mm	**:**	millimètre.
min	**:**	Minute.
MeOH	**:**	Methanol.
nm	**:**	nanomètre.
N	**:**	Normalité.

pH	**:**	Potentiel hydrogène.
R	**:**	Racine.
rpm	**:**	rotation per minute.
Rdt	**:**	Rendement.
RMN	**:**	Résonance Magnétique Nucléaire.
T	**:**	Tige.
UV	**:**	Ultraviolet.
V	**:**	Volume.
µL	**:**	Microlitre.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Il existe des plantes presque partout sur la terre,dans le désert, sous l'eau, dans les forêts tropicales et même en arctique. Toutefois, leur répartition à la surface de la terre est fonction des conditions climatiques.

Les plantes sont à l'origine de nombreux médicaments et certains de leurs principes actifs entrent dans la composition de 70% des produits pharmaceutiques commercialisés dans les pays industrialisés. Le tiers restant est constitué de produits de synthèse **[1,2]**.

Les produits actuellement utilisés en phytothérapie sont testés et sélectionnés pour leur valeur thérapeutique et se présentent, pour la plupart, sous une forme galénique moderne, d'utilisation pratique, qui garantit l'intégrité de la bonne absorption de ses constituants par l'organisme **[1-3]**. Une plante médicinale contient un ensemble de principes actifs qui ont chacun un effet thérapeutique spécifique. L'action thérapeutique globale d'une plante ne se résume donc pas à un constituant isolé. Elle est la résultante de l'action de tous ses constituants et nous parlons d'action synergique **[4]**.

Dans le cadre du présent travail de recherche, nous nous sommes intéressés à l'investigation phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes, de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen: *Psoralea bituminosa* L.

Notre travail a été divisé en deux parties ; nous aborderons dans une première partie une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier concerne l'étude botanique de la plante étudiée, le deuxième chapitre est consacré aux métabolites secondaires, leurs classifications et leurs propriétés pharmacologiques. Nous donnerons dans le troisième chapitre l'évaluation de l'activité antioxydante.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail qui porte sur :

- Les tests phytochimiques de la partie aérienne de la plante ;
- L'obtention de quelques extraits par solvants de polarités différentes;
- L'extraction des flavonoïdes et des tanins ;
- L'extraction des acides gras et des insaponifiables et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse ;

- L’évaluation de l’activité antioxydante des divers extraits, par trois méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer et le blanchissement du β-carotène.

Enfin, nous présenterons les résultats obtenus et leur discussion. Une conclusion résumera l’ensemble du travail réalisé.

Partie I: Synthèse bibliographique

CHAPITRE I: Etude botanique

I. La famille des Fabaceae:

La grande famille des Fabaceae (de faba, la féve) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue. Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical **[5]**. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbaccées dans les régions tempérées **[6]**. Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genet à balais, réglisse) ou en chimie **[5]**.

I.1. Caractères botaniques de la famille:

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille 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 également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique.

Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaitre des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote **[6]**.

Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées.

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les Fabaceae les plus primitives (mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses.

Toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'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 grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale.

I.2. Présentation de l'espèce *Psoralea bituminosa* L.:

- Autre nom communs : Herbe au bitume, Trèfle bitumineux, Psoralée à odeur de goudron.
- Non scientifique : *Psoralea bituminosa, Bituminaria bituminosa*.
- Non vernaculaire : Adna, Mentina **[7-9]**.

I.2.1. Etymologie:

Dérivé du grec psora, singnifiant « GALE » il se peut que le nom générique fasse allusion à l'emploi de la plante contre cette affectation de la peau plutôt qu'à l'aspect de son calice comme il est parfois suggéré que l'odeur « bitumeuse » si caractéristique explique évidement le qualificatif **[7]**.

I.2.2. Ecologie et habitat:

Cette plante est largement distribuée dans toute l'Algérie mais surtout dans le Tell et sur le littoral **[7-9]**.

I.2.3. Classification systématique:

Règne	**plantae**
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae (légumineuses)
Genre	Bituminaria

I.2.4. Description botanique:

Plante vivace dressée, rameuse de 0.5 à 1.5 cm à feuilles composées de 3 folioles, les inferieurs à folioles ovales, les supérieures à folioles plus longues, bicolores, étroites et lancéolées toutes plus ou moins densément couvertes de poils blancs, et glanduleuses, fleurs 5-6 mm au plus groupées en têtes globuleuses, pourvues de bractées portées par de longs pédoncules naissant a l'aisselles des feuilles, périanthe a calice à 5 dents acuminées, velu et à corolle violacée au niveau de l'étendard dressé, blanc lilas sur les autre pièces, fruits en formes de petites gousses ovales, comprimées. Les feuilles écrasées répandent une odeur caractéristique de bitume, il fleurit entre Avril et Août **[7-10]**.

Figure 1: Feuilles de *P.bituminosa*

Figure 2: Fleurs de *P.bituminosa*

I.2.5. Ethnopharmacologie:

La décoction avec de l'alcool et de l'iode est appliqué extérieurement comme un complément capillaire pour les cheveux. L'infusion de feuilles fraîches est également utilisée pour le traitement de la fièvre et des infections urinaires **[10]**.

I.2.6. Utilisations traditionnelles:

La psoralée est une plante médicinale employée dans les différentes pharmacopées traditionnelles :

- L'herbe à bitume était utilisée en médicine populaire, contre les affections cutanées : gale, psoriasis (dépigmentation de la peau se traduisant par des taches

blanches), par une application renouvelée, elle finit par estomper les taches blanches **[7]**.

- Elle a des propriétés : anti-inflammatoire, anti microbienne, antiseptique externe, photo-sensibilisatrice.
- Pour ce faire dans leur pharmacopée, elle est utilisée pour tonifier les reins et fortifier le yang, elle préserve l'essence et elle réchauffe la rate et freine les diarrhées. Cela se traduit par une tonification du système rénal ainsi que de l'organisme en générale, elle est d'une grande efficacité pour aider à la guérison des fractures des os et elle permet de soulager les douleurs de la carie dentaire.
- Les feuilles fraîches sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme vulnéraire, cicatrisante et désinfectante **[11]**.
- Ainsi ses feuilles sentent le bitume, sont diurétique et très bonne contre le cancer l'huile de ses graines estimées comme anti paralytique **[12]**.
- Elle était et l'est encore préconisé pour traiter toutes sortes de bactéries et d'infections fongiques de l'organisme, de plus elle traite également les troubles de la constipation.

I.2.7. Autres usages:

Psoralia bituminosa L. est utilisé comme fourrage pour nourrir les chèvres et le bétail. En effet, c'est le foin à l'état frais qui est traditionnellement utilisé. **[10,13]**. La psoralée sert également en tant qu'additif alimentaire pour conserver des cornichons cuisinés comme ils font au japon par exemple, comme on peut en extraire aussi une huile parfumée pour s'en enduire les cheveux en cosmétologie.

I.2.8. Travaux scientifiques réalisés sur *Psoralia bituminosa* L.:

Les travaux antérieurs sur cette plante et qui seront exposés, sont le résultat d'une recherche bibliographique.

C'est en 1995 **[14]**, que l'intérêt s'est concentré sur *Psoralea bituminosa* L. comme plante xérophile ayant le potentiel déprotéger le sol contre l'érosion côtière.
P. bituminosa L. est connue pour contenir les composés anti bactériens non caractérisés et son utilisation comme complément capillaire pour les cheveux a été documenté **[15]**, jusqu'à 1997 **[16]**, excepté une étude sur la présence de furanocoumarines dans les échantillons de *B.*

bituminosa L. traités par hydrolyse, aucune investigation chimique n'avait été effectuée sur cette plante.

Le genre cosmopolite et polymorphe, *Psoralea L* .avec plus de 120 espèces est connu en phytochimie comme source de furanocoumarines, dont le composé archétype (furo [3.2-g] [1] benzopyran-7-one) a été appelé plus tard le psoralène. Paradoxalement, l'apparition de furano coumarines n'est pas une caractéristique principale du genre, qui est caractérisé par d'autre métabolites secondaire, en particulier les isoflavonoïdes shikimates et les monoterpenoides **[17]**.

En 2003 **[18]**, l'investigation des parties aériennes de *P.bituminosa*a révélé en plus des composés phénolique connus, les petrocarpanes prénylés bitucarpine A et B, dont les structures ont été élucidées par des techniques spectroscopiques. Un isoflavonoïde connu (8-prenyldaidzein) a également été obtenu pour la première fois.

Dans les travaux qui ont suivi **[19]**, les huiles essentielles obtenues par micro extraction en phase solide (SPME), de la partie aérienne (feuilles, fleurs et graines) de *Psoralea bituminosa* L. Elles ont été analysées par GC et GC-MS. La présence de monoterpène ou d'alcools aliphatiques glucosides a été également étudiée. Les huiles essentielles ont montré des différences qualitatives et quantitatives.

Composés majoritaires	Feuilles	Fleurs	Graines
Caryophyllene	23%	18%	/
β-farnesene	15%	6%	/
Germacrène	24%	18%	/
Tricyclène	/	/	11%
α-pinene	/	/	50%

Tableau 1 : Composés majoritaires des HE des feuilles, des fleurs, des graines.

D'un autre côté, il a été démonté que *Psoralea bituminosa* L. possède des propriétés antifongique, antivirales et antibactériennes **[20]**.

En 2006, Walker et al **[21]** ont découvert dans *P. bituminosa* L. une plante ornementale ayant la capacité de phytostabilisation des métaux lourds dans les sols contaminés ou dégradés.

Tava et son équipe **[22]** ont porté leurs études sur la fraction volatiles de la partie aérienne fraiche (feuille et fleur) de *P. bituminosa* L. qui a été isolée par entrainement à la vapeur et

analysée par GC et GC-MS. Le rendement en huile essentielle des feuilles et des fleurs était de 0.1-0.3% et 0.2% de la matière fraiche, respectivement. Une relation possible entre la composition chimique et l'odeur forte caractéristique de cette espèce, a été discutée.

Composés majoritaires	Feuilles	fleurs
Alcools	36.6-62.3%	53%
Sesquiterpènes	18.1-31.5%	13.7%
Hydrocarbures	4.3-9.1%	7.6%
Composésphénoliques	4.3-7.8%	2.6%
Furanocoumarines	3.0-4.7%	4.9%
Monoterpènes	1.4-2.9%	1.9%

Tableau 2: Composés majoritaires des HE des feuilles, des fleurs.

Les travaux qui ont suivi, ont montré que *P.bituminosa* L. est une source de furanocoumarines et pterocarpanes qui peut être utilisée pour le traitement du psoriasis et du vitiligo **[23]** et la protection contre les infections et les herbivores **[24]**.

Par ailleurs, la composition phytochimique de la partie aérienne de *P.bituminosa* L. ainsi que les activités anti oxydantes et anti bactériennes ont été investiguées.

Le résultat a abouti à deux composés dont les structures ont été déterminées par UV, RMN H et RMN C13. L'étude a révélé pour la première fois la présence dans cette espèce d'isoflavone (daizéine) et du flavone (isoorientine). Les activités antibactériennes des extraits au dichlorométhane, Acétate d'éthyle et n-BuOH) ont été déterminées en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Le potentiel antioxydant de l'extrait au n-BuOH a été évalué par deux méthodes. L'activité antibactérienne de la plante *Bituminaria bituminosa* est certainement liée à sa composition chimique. L'extrait de n-BuOH a montré une activité anti-oxydante importante **[25]**.

D'autre part, EulogioJ.Llorent-Martinez et al. **[10]** ont présenté pour la première fois la composition chimique des feuilles et des fleurs de *P.bituminosa* L.. Le criblage des composés phytochimiques été effectué en utilisant la chromatographie liquide à haute performance à ionisation par électropulvérisation couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-ESI-MS). Plus de 40 composés ont été identifiés provisoirement ou caractérisés. Un pourcentage élevé de composés détectés correspond aux flavonoïdes glycosylés, en particulier de l'apigénine, bien que les acides phénolique, les saponines ont également été identifiés.

Enfin, une étude récente évalue l'effet anti hyperglycémiant de l'extrait aqueux des feuilles. Des rats wistar ont été utilisés dans l'étude qui a montré que l'extrait est dépourvu de toxicité et possède une bonne activité contre le diabète **[26]**.

A la lecture de ces travaux, *Psoralea bituminosa* L. reste insuffisamment étudiée.

CHAPITRE II : Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes **[27,28]**.

II. Les polyphénols:

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside…etc. **[29 ,30]**. En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus **[30]**. Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines **[31, 32]**. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits **[33]**.

II.1. Les flavonoïdes:

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols **[34]**, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides **[35,29]**. Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées **[36]**.

II.1.1. Structure et classification:

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne **[37]**. Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C **[38]**.

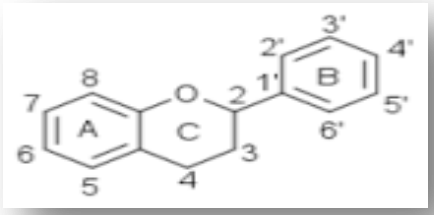


Figure 3: Structure de base des flavonoïdes **[39]**.

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères **[38]**. Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins **[40]**.

II.1.2. Localisation et distribution:

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes **[41]**. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques **[29]**.

II.1.3. Les principales classes de flavonoïdes:

a) Les flavones et les flavonols :

Les flavones et les flavonols représentent la majorité des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas. Chez ces molécules le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7.Ces hydroxyles peuvent être libres ou éthérifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou éthérifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C-4', peut être disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent être des methoxyles (OCH3). Les autres positions (C-2'et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées. Les principales flavones

sont l'apéginine et la lutéoline, alors que les principaux flavonols sont la quercétine, kaempférol, et la myricétine**[29]**.

b) Les flavanones et les dihydroflavonols:

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues insaturés rassemblant les flavones et flavonols. La principale flavanone est la naringénine, alors que la dihydroflavonols la plus rencontré est la catéchine **[29]**.

c) Les chalcones:

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α, β-insaturé. Si les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Pour ce type de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes. Les chalcones les plus importants sont: la butéine et la phlorétine.

d) Les anthocyanidines:

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylés en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. **[29]**.

II.1.4. Activités anti oxydantes des flavonoïdes:

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. **[42]**. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène **[43,44]**. À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyle et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fl-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable **[45]**.

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques **[38,46]** comme les ions du fer (Fe^{2+}).

II.2. Les tanins:

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da **[47]**.

II.2.1. Localisation et distribution:

Les tanins sont très répandu dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les rosacée **[35]**. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines **[48]**.

II.2.2. Classification:

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés **[29]**.

a) Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques **[47]**.

b) Tanins condensés :

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatéchine et catéchine **[48]**. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre **[47]**.

CHAPITRE III : Activité antioxydante

III. Antioxydants :

III.1. Définition :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose et non toxique, n'entraine ni coloration, n'a ni odeur, ni saveur indésirable est résistant aux processus technologiques **[49]**.

III.2. Mécanisme d'action:

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires **[49].**

III.3. Radicaux libres :

III.3.1. Définition :

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses **[50]**.

III.3.2. Origine des radicaux libres :

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions

cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome **[51**

PARTIE II: ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1.Matériel végétal:

Pour la réalisation des objectifs de notre travail, la plante a été récoltée en décembre 2015 dans la région de Ouchba (Tlemcen). Le matériel végétal est nettoyé (débarrassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'ombre, à l'abri de la poussière et de la lumière dans un endroit bien aéré. Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre. Après séchage, Les différentes parties de la plante (racines, feuilles et tiges) sont conditionnées dans des sachets en papier pour des utilisations ultérieures.

IV.2. Criblages phytochimiques:

IV.2.1.Préparation des extraits (aqueux et éthanolique):

25 g de matériel végétal (partie aérienne) sont mis en contact avec 200 mL de solvant dans un ballon surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant 7 heures. Le mélange est filtré et l'extrait est soumis aux différents tests.

IV.2.2.Tests de caractérisation:

- **Épuisement par l'éthanol :**

1. Alcaloïdes sels :

On évapore 20 mL de la solution éthanolique à sec. On ajoute 5 mL de HCl 2 N au résidu et on chauffe dans un bain-marie. On filtre le mélange, puis on divise le filtrat en deux parties égales. En fin, on traite la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : présence de turbidité ou précipitation
(+) Est enregistré si le réactif produit une légère opacité
(++) Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation
(+++) Est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd

2. Flavonoïdes :

On traite 5 mL d'extrait alcoolique avec quelques gouttes de HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3 min **[52]**.

3. Tanins:

A 1 mL de solution alcoolique, on ajoute 2 mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (tanins cathéchiques), bleu-verte (tanins galliques) **[53].**

4. Composés réducteurs :

On traite 1 mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique **[53].**

5. Coumarines :

On évapore 5 mL de la solution extractive éthérique. On dissout le résidu dans 1 à 2 mL d'eau chaude. On divise le volume en deux parties puis on Prend la moitié du volume comme témoin et on ajoute à l'autre moitié 0.5 mL de NH_4OH (10%). En fin on met deux taches sur un papier filtre et on les examine sous la lumière U.V., une fluorescence intense indique la présence des coumarines **[53].**

6. Stérols et stéroides:

On évapore 10 mL d'extrait alcoolique puis le résidu obtenu est traité avec 10 mL de chloroforme anhydre. Après filtration, on mélange 5 mL de la solution chloroformique avec 5 mL d'anhydre acétique puis on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On agite et on laisse reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité) en 30 min à 21 C°.

- **<u>Epuisement par l'eau</u> :**

1. Amidon:

Le test effectué consiste à traiter 5 mL de l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

2. Composés réducteurs:

Le teste consiste à ajouter 2 mL de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling, chauffer ensuite la solution résultante. Un précipite rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

3. Saponosides:

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse**.** Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif (-) ;

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+) ;

Mousse de 1-2cm = test positif (++) ;

Mousse plus de 2cm = test très positif (+++) **[53]**.

4. Les tanins:

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1mL de l'extrait aqueux, 1 mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de $FeCl_3$. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins.

IV.2.3.Réactifs de caractérisation:

1. Réactif de Mayer:

On dissout 1.358 g de $HgCl_2$ dans 60 mL d'eau et 5 g de KI dans 10 mL d'eau. On mélange**,** ensuite, les deux solutions et on ajuste le volume total à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

2. Réactif de Wagner:

On dissout 2 g de KI et 1.27 g de I_2 dans 75 mL d'eau, la solution ainsi obtenue est ajoutée à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

3. Liqueur de Fehling:

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions Fehling A et le Fehling B, les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique

4. Réactif d'Amidon:

Une solution de 1.2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium est chauffée pendant 5 min**,** puis diluée jusqu'à 500 mL. On chauffe 5mL de la solution à tester avec 10 mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition et on ajoute le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

IV.3. Extraction:

IV.3.1. Principe de l'extraction par soxhlet:

Le soxhlet est largement utilisé pour extraire les différents métabolites à partir de plantes en raison de sa commodité. La poudre de la plante est placée dans une cartouche en papier filtre mise dans le corps de l'extracteur. Quand le ballon contenant le solvant, est chauffé, les vapeurs se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps dans lequel est insérée la cartouche faisant ainsi, extraire la plante par solvant. Après l'accumulation du solvant condensé dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, le retour dans le ballon du liquide riche en substances extraites est provoqué. La continuité du processus constitue l'avantage majeur de cette méthode [**54,55]**.

Figure 4: Montage de l'extracteur Soxhlet.

IV.3.2. Expérimentation:

Environ 10 g de la poudre de chaque partie (feuilles, tiges, racines) ont été extraites par 100 mL de solvant. Pour ce faire, trois solvants organiques de polarités différentes ont été utilisés; il s'agit du chloroforme, du dichlorométhane et du méthanol. Par ailleurs, un extrait aqueux a été obtenu. Après 6 heures d'extraction par soxhlet et filtration, les solvants ont été

évaporés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est pesé et le rendement calculé.

Rdt(%)= (masse du résidu/masse initiale de la poudre) × 100

IV.4.Extraction des composés phénoliques:

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur la partie aérienne de la plante étudiée *Psoralea bituminosa* L. selon les méthodes suivantes.

IV.4.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques:

La poudre (1 g) est placée dans un erlenemeyer contenant 20 mL de méthanol pendant 24 heures. Après la filtration, la solution méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C. Le résidu sec pesé est repris par 3 mL de méthanol.

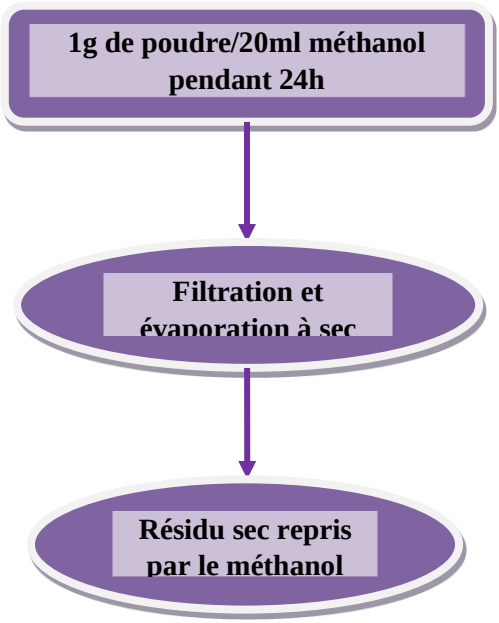


Figure 5 : Protocole d'obtention des extraits bruts.

IV.4.2. Extraction des flavonoïdes:

L'extraction des flavonoïdes de *Psoralea bituminosa* L. est réalisée par la méthode décrite par Bekkara*et al*, 1998 **[56]**.

Une masse de 1 g de poudre est mise en contact avec 20 mL de méthanol pendant 24 heures. L'extrait méthanolique récupéré est ensuite évaporé à sec (T=60°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu est partagé entre 10 mL d'acétate d'éthyle et 10 mL d'eau

distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 3 mL de méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 10 mL du 1-butanol. La phase butanolique est séchée à l'évaporateur rotatif à 60°C. Le résidu sec pesé, est repris par 3 mL de méthanol **(Figure 6).**

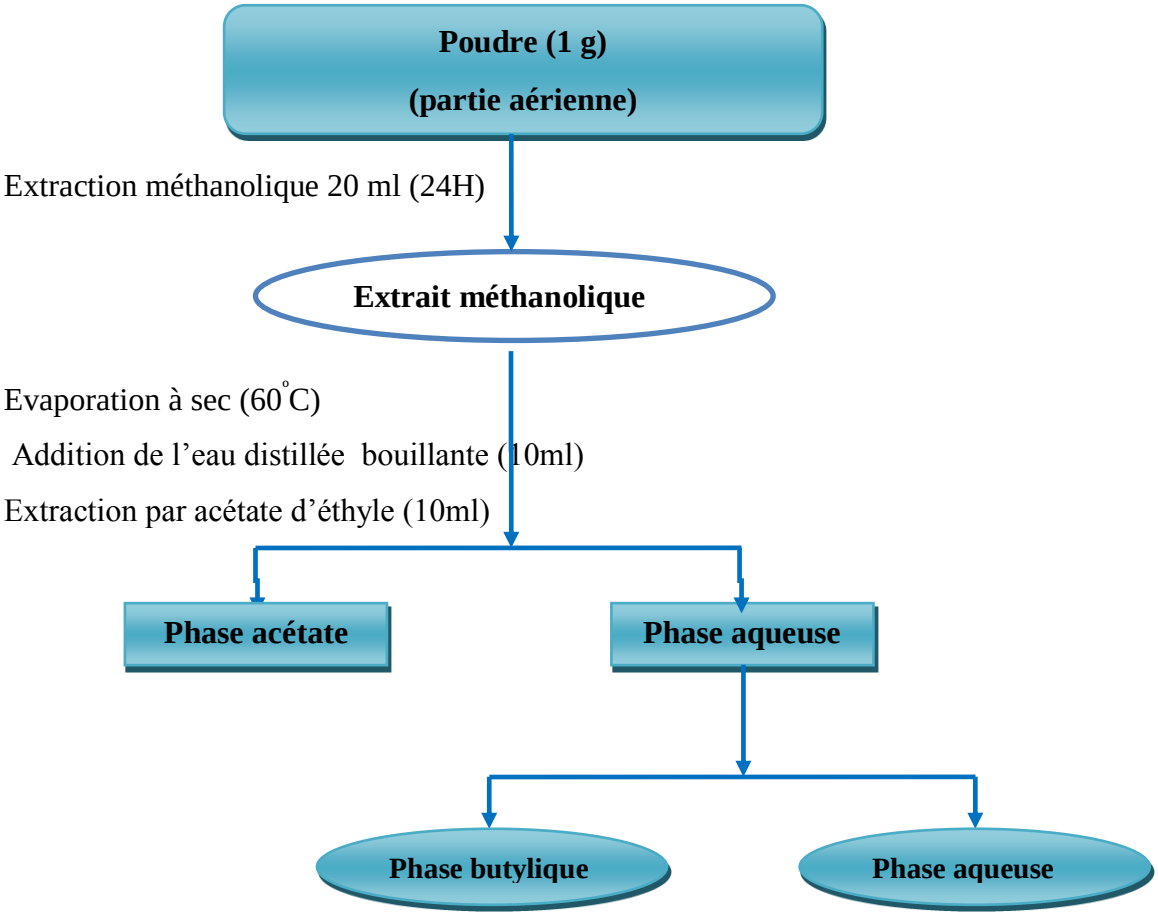


Figure 6: Schéma d'extraction des flavonoïdes **[56].**

IV.4.3. Extraction des tanins:

L'extraction des tanins est obtenue en suivant la méthode de Zhang *et al*. **[57]**. Le broyat (partie aérienne) correspondant à 2.5 g est extrait par 50 mL du mélange acétone/eau distillée (35/15 ; V/V) durant trois jours à la température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40 °C à l'aide d'un rota-vapeur pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 15 mL de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.

Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse est extraite deux fois avec 15 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi obtenue est évaporée à sec à 40 °C puis pesée et reprise par 3 mL de méthanol.

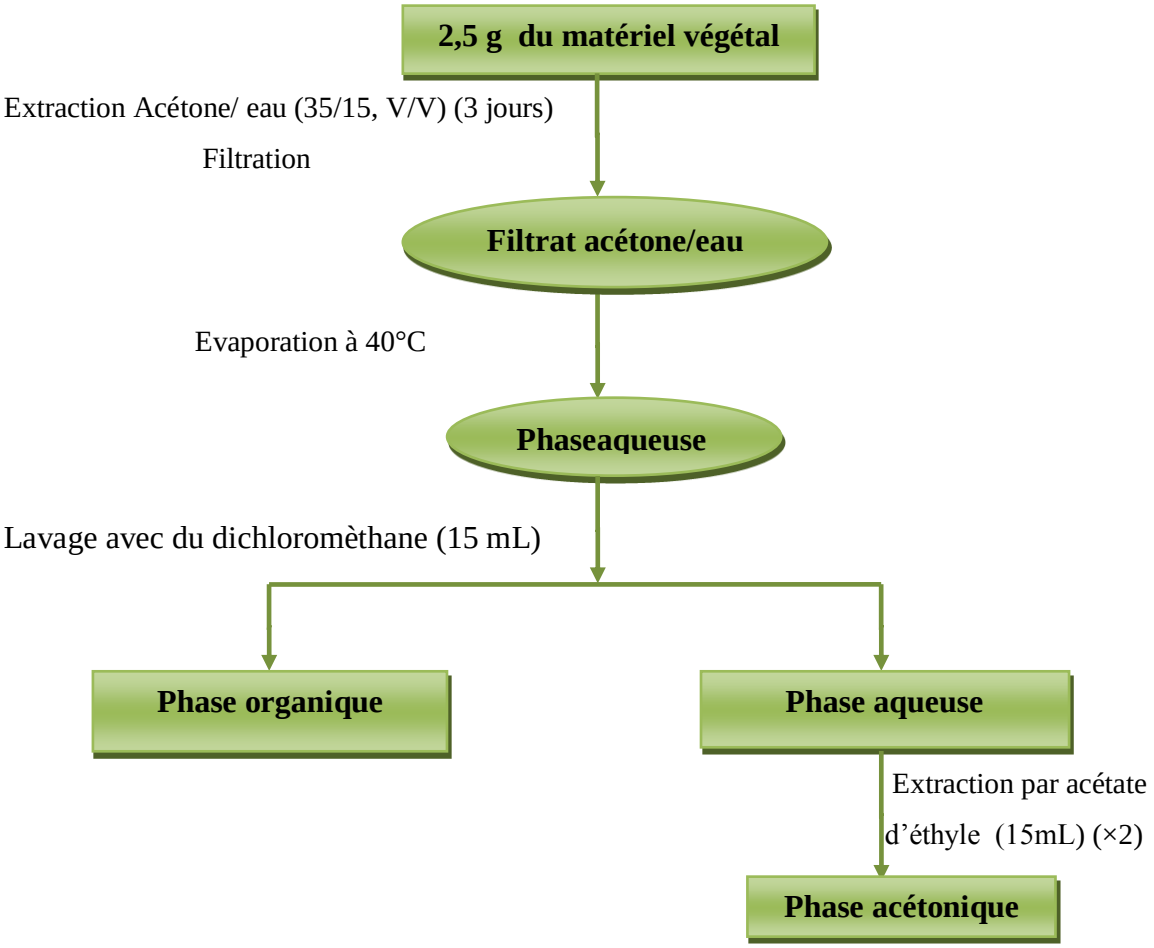


Figure 7: Protocole d'extraction des tanins.

IV.5.1. Extraction des insaponifiables:

1 g d'extrait hexanique est saponifié avec 50 mL de solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L), pendant 1 heure sous reflux. A la fin du reflux, le mélange est lavé avec 20 mL d'eau distillée. Les composants de l'insaponifiable sont ensuite extraits trois fois avec 3 x 20 mL d'éther. Les extraits sont rassemblés et lavés trois fois avec 50 mL d'eau déminéralisée. Le solvant est ensuite éliminé à 35 °C sous pression réduite avec un évaporateur rotatif, puis pesé **[58]**.

IV.5.2.Extraction des acides gras:

La solution savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec du HCl 1 N, jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6). Les acides gras libérés sont extraits à l'éther (3x 20 mL) et séchés sur $MgSO_4$ puis pesés. Les acides gras sont transformés en leurs dérivés esters méthyliques par l'ajout d'une solution méthanolique de BF_3 à 10% (1 mL de BF_3 dans 10 mL d'éthanol). Par la suite, les acides gras sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane à température ambiante. La couche organique est évaporée et séchée sur Na_2SO_4 [**58**].

IV.5.3. Calcul du rendement:

Le rendement est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage.

Rdt (%) = (P1 – P2)/ P3 x 100

P1 : poids du ballon après évaporation ;

P2 : poids du ballon avant évaporation (vide);

P3 : poids de la matière végétale de départ.

IV.6. Évaluation de l'activité antioxydante:

IV.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH:

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH [**59**]. 50 µL de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 1 à 10 mg/mL) sont ajoutés à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/L). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µL de méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

I%= [(Abs contrôle – Abs test)/ Abs contrôle] x 100

Calcul des IC50 : IC50 ou concentration inhibitrice de 50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°. Les IC50 sont calculées

graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

IV.6.2. Test de la réduction du fer FRAP:

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu [**60**]. Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 1 à 10 mg/mL) est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2.5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Une aliquote (2.5mL) de surnageant est combinée avec 2.5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0.1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés **[61]**.

IV.6.3. Test de blanchissement ou de décoloration du bêtacarotène: [62]

Dans ce test la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Koleva (2002).

Une quantité de 2 mg de β-carotène est dissous dans 20 mL de chloroforme, puis 4 mL de cette solution sont mises dans un ballon à fond plat avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation sous vide du chloroforme, le mélange est repris dans l'eau distillée aérée. Dans une microplaque à 96 puits, 150 µL de cette émulsion sont additionnés de 10 µL d'extrait végétal de concentration connue. Les microplaques sont alors mises en incubation à 50°C pendant 120 min (pour catalyser l'oxydation de l'acide linoléique) et la D.O est mesurée (à T = 0 et T = 120 min) à 470 nm. L'activité de l'extrait est calculée par rapport à celle du témoin négatif (sans extrait). Les résultats sont comparés à ceux des antioxydants de synthèse (BHT, BHA). Le pourcentage d'inhibition (PI) est obtenu comme suit :

$$\mathbf{PI = [(D.O_{E120} - D.O_{T120}) / (D.O_{T0} - D.O_{T120})] \times 100}$$

D.O $_{E120}$: absorbance de l'extrait à T = 120 min.

D.O $_{T120}$: absorbance du témoin négatif à T = 120 min.

D.O $_{T0}$: absorbance du témoin négatif à T = 0 min.

Cette activité est également exprimée en IC50 comme décrit pour le test au DPPH˙.

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Criblage phytochimique:

Les résultats du criblage phytochimique réalisé sur les extraits de la partie aérienne de *Psoralea bituminosa* L. sont consignés dans le Tableau 3. Au cours de ces tests, deux solvants de polarités différentes (eau, éthanol) ont été utilisés. Les différentes méthodes employées sont exposées dans la partie expérimentale.

Réactif	Famille	Eau	ethanol
Mayer	Alcaloides	/	+
Wagner		/	+
Mg, HCl	Flavonoïdes	/	+
Liqueur de Fehling	Composés réducteurs	+	+
$FeCl_3$	Tanins	+	+
NH_4OH 10%	Coumarines	/	+
Réactif d'amidon	Amidon	-	/
Anhydride acétique+H_2SO_4	Stéroides	/	+
Indice de mousse	Saponosides	+	/

-: absence + : présence / : non testé

Tableau 3: Criblage phytochimique de la partie aérienne de *Psoralea bituminosa* L.

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

D'après le tableau 3, nous avons observé que les extraits de solvant de la plante ont montré une réaction positive pour le test des tanins, alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines et les stéroïdes, ainsi les composés réducteurs, Pour les saponosides, la couche de mousse a été montrée avec une hauteur de 1.5 cm .Cependant, le test d'amidon produit une inférence négative.

Les résultats montrent que la plante est d'une grande importance, elles est riche en composés phénoliques tels que les tanins, les flavonoïdes et les saponosides qui sont reconnus pour leur propriétés antioxydantes **[63]** .Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes **[64].**

V.2. Rendements des extraits par solvants de polarité croissante:

La préparation des extraits à partir de chaque partie (feuille, tige, racine) a été effectuée par des solvants de polarité croissante ; il s'agit du chloroforme, du dichlorométhane, du méthanol et de l'eau. Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits bruts: chloroformique (Chl), au dichlorométhane (DCM), au méthanol (MeOH) et l'extrait aqueux (H_2O). Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de la masse du résidu d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Extrait	**Rendement %**		
	Feuilles	**Tiges**	**Racines**
Chl	8.5	2.4	1.5
DCM	6.25	2	1
MeOH	29.3	19.5	14.2
H_2O	14.4	12.9	3.1

Tableau 4: Rendements des différents extraits de la plante.

L'analyse des résultats obtenus montrent que, quel que soit le solvant utilisé, le rendement d'extraction des feuilles est le plus élevé alors que celui des racines est le plus faible. Par ailleurs, nous remarquons que pour les différentes parties de la plante, ce sont les solvants polaires (méthanol et eau) qui donnent les meilleurs rendements. En effet, c'est le méthanol qui permet d'extraire le maximum de familles de composés à partir des feuilles (29.3%) suivi des tiges (19,5%) puis des racines (14.2%).

V.3. Les rendements en extraits secs des composés phénoliques:

Les extractions des composés phénoliques de notre plante nous ont permis de calculer le rendement des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins. Le rendement qui a été déterminé par rapport au matériel végétal sec est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 5:

Extrait	Solvant Utilisé	Rendement %
Extrait brut	Méthanol	42.5
Flavonoïdes : fraction acetate d'éthyle	Acétate d'éthyle	15
Flavonoïdes : fraction Butanolique	1-butanol	36.5
Tanins	Acétone/Eau	12

Tableau 5: Rendements en extraits polyphénolique de la partie aérienne.

Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait brut méthanolique 42.5%, Cependant, nous avons remarqué que la fraction butanolique est plus riche en flavonoïdes que la fraction d'acétate d'éthyle. Par ailleurs, l'extraction des tanins présente un rendement plus faible que celui des flavonoïdes et qui est de 12%.

V.4. Extraction des acides gras et des insaponifiables:

L'idée consiste à extraire et à établir le profil chimique des acides gras présents dans la plante. A cet effet, l'analyse de la composition de l'extrait a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Les conditions opératoires ainsi que le chromatogramme obtenu sont représentés en Annexe. Le rendement des insaponifiables était de **23.8%**.

Acides	Temps de Rétention (min)	Proportions
Heptanoîque (C_7 : 0)	39.91	30.57
Laurique (dodécanoïque, (C_{12} : 0)	40.75	23.46
Myristique (tétradécanoïque,(C_{14} : 0)	41.06	9.20
(Z)-pentadécènoïque, (C_{15} : 1)	49.0	6.11
Palmitique (hexadécanoïque, (C_{16} : 0)	54.89	11.85
Linoléique (Octadécadienoique, (C_{18} :2)	56.25	11.74
Oléique ((Z)-octadécènoïque, (C_{18} : 1)	60.33	7.04

Tableau 6 : Composition en acides gras de la partie aérienne de *Psoralea bituminosa* L.

A la lecture du tableau 6, nous avons pu identifier 7 acides gras par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux d'un mélange étalon d'esters méthyliques. L'acide heptanoique (C_7:0) et l'acide laurique (C_{12} : 0) sont prépondérants avec des teneurs respectives de l'ordre de 30% et de 23%. Il s'agit de deux acides saturés dont le premier peut être utilisé sous forme d'esters dans les lubrifiants, dans l'industrie des arômes et parfums ainsi qu'en cosmétique, et sous forme de sels (sodium heptanoate) dans l'anticorrosion. Quant à l'acide laurique, bien qu'il présente de légères irritations pour les muqueuses, il reste très faiblement toxique et est par conséquent utilisé dans de nombreux savons et shampooings **[65]**.

Nous pouvons noter également la présence de trois acides gras insaturés dont les deux acides : oléique (C_{18} : 1) et linoléique (C_{18} : 2) sont les plus importants. En effet, si l'acide oléique contribuerait à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires, l'acide linoléique est appelé acide gras essentiel indispensable à la croissance et à l'activité physiologique de tous les tissus.**[66,67]**.

V.5. Activité anti oxydante:

V.5.1.Introduction:

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de *Psoralea bituminosa* L. a été réalisée par trois techniques chimiques (le test de piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le blanchissement de β-carotène).

V.5.2. Test de piégeage du radical libre DPPH:

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2 -diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée **[68]**.

L'activité antioxydante des extraits de *Psoralea bituminosa* L. et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires **[69]**.

a. Les extraits de polarité croissante :

	Effet du balayage sur le DPPH (%)											
C mg/ml	Chl			DCM			MeOH			H_2O		
	F	T	R	F	T	R	F	T	R	F	T	R
10	85.66	62.98	86.66	84.97	69.26	88.94	89.85	90	94	88.45	72.10	62.48
9	81.52	59.15	81.97	81.83	65.85	85.57	82.44	84.16	88.4	78.68	63.85	59.25
7	75.64	52.01	72.27	74.64	59.05	70.89	70.01	68.11	74.05	64.1	54.8	49.22
2	52.05	26.64	34.7	48.91	36.48	33.06	30.92	23.56	39.4	32.19	22.22	23.67
1	45.36	22.40	27.76	41.80	27	21.36	20.13	16.87	29.62	23.66	16.14	16.14

Tableau 7 : Capacité antioxydante (DPPH) des quatre extraits des feuilles, des tiges et des racines de *P. bituminosa* L.

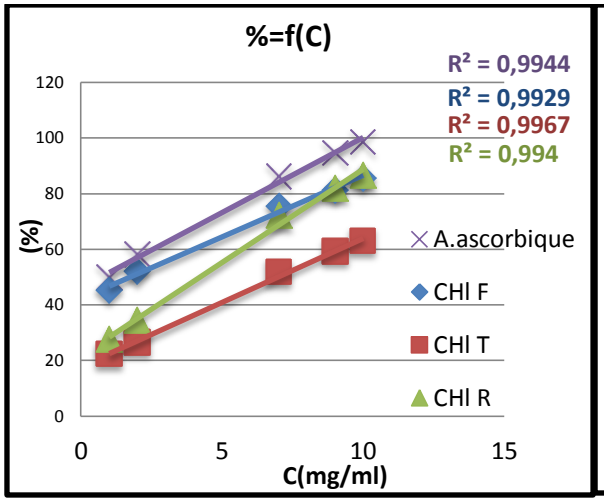


Figure 8: % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante.

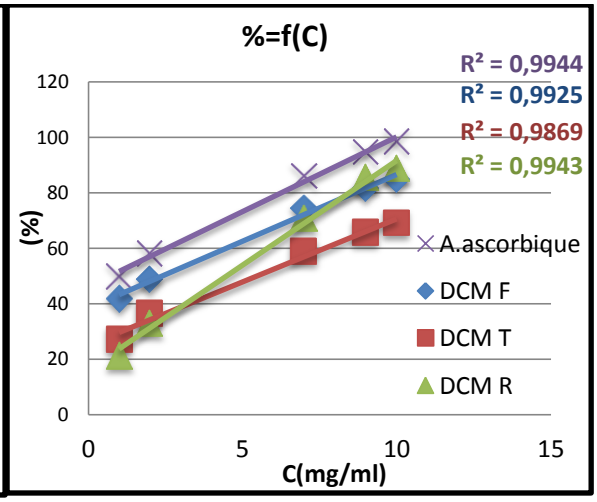


Figure 9: % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante.

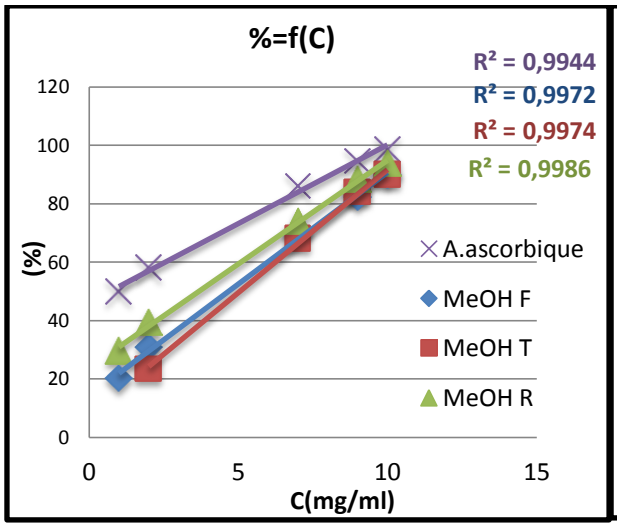


Figure 10: % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait méthanolique des différentes parties de la plante.

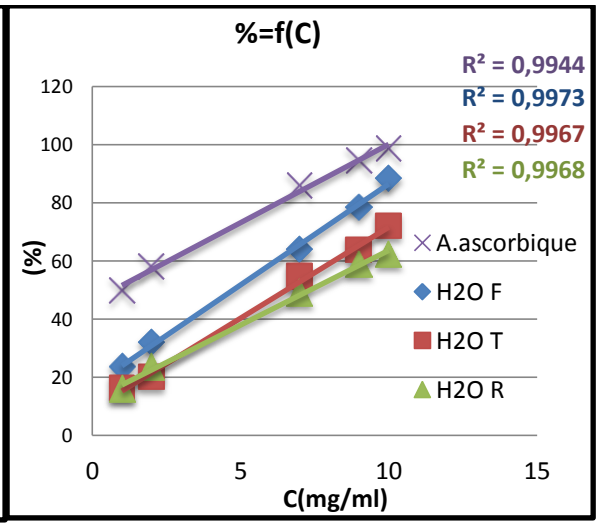


Figure 11: % d'inhibition du radical libre DPPH● de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante.

	IC50 exprimées en mg/ml			
Les parties étudiées de la plante	**Chl**	**DCM**	**MeOH**	**H_2O**
Feuilles	1.72	2.38	4.50	4.73
Tiges	6.96	5.46	4.87	6.49
Racines	4.20	4.48	3.23	7.26
Acide ascorbique	1.42			

Tableau 8 : Activité antioxydante exprimée en valeurs IC_{50} par le système DPPH des quatre extraits des feuilles, tiges, racines de la plante.

b. Les extraits des composés phénoliques :

	Effet du balayage sur le DPPH (%)			
C(mg/mL)	**Polyphénols**	**Tanins**	**Fraction acetate d'éthyle**	**Fraction 1-butanol**
0.25	4	28	10	5
0.5	8	35	21	13
1	16	39	31	46
1.5	20	52	43	74
2	23	55	48	80

Tableau 9 : Capacité antioxydante (DPPH) des extraits des composés phénoliques.

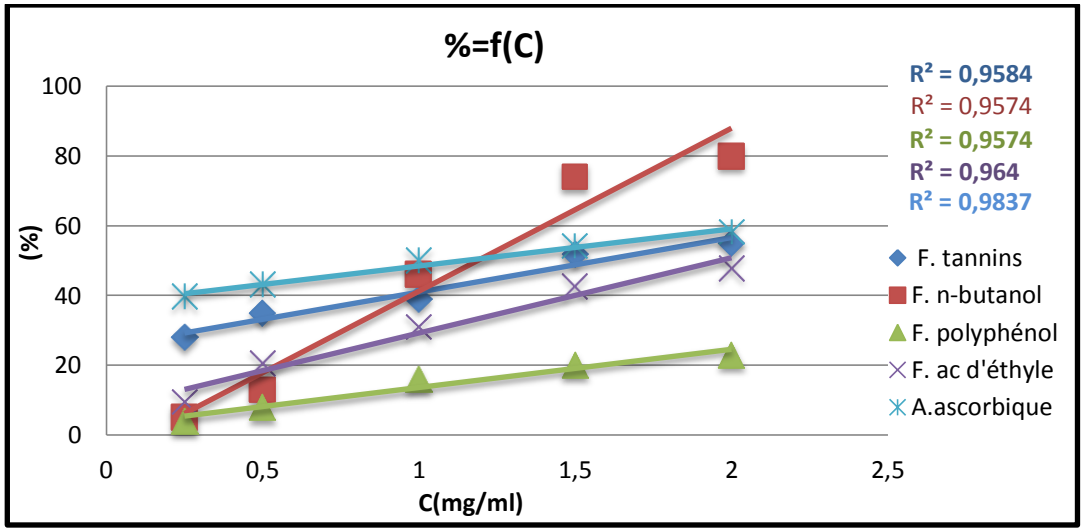


Figure 12: % d'inhibition du radical libre DPPH● des différents extraits des composés phénoliques.

	IC50 exprimées en mg/ml
Tanins	1.57
Fraction 1-butanol	0.95

Tableau 10: Valeurs des IC50 pour le système DPPH des extraits des composés phénoliques.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus des différents extraits de la plante sont étudiés afin de localiser la fraction la plus active. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que les valeurs des IC50 de nos extraits bruts. Effectivement, le test au DPPH révèle que l'extrait chloroformique et à un degré moindre, l'extrait au dichlorométhane des feuilles sont les deux extraits les plus actifs comme piégeurs du radical DPPH. Par ailleurs, pour les composés phénoliques, les flavonoïdes contenus dans la fraction butanolique de la partie aérienne de la plante manifestent une activité antioxydante très importante avec un IC50 de 0.95, En effet, les flavonoïdes est une vaste famille de composés phénoliques qui protègent contre les rayons UV et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation.

V.5.3. Test de réduction de fer FRAP:

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+}/ complexe ferricyanide à la forme du fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en

mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm **[60]**.

a. Les extraits de polarité croissante :

	Absorbance à 700 nm											
C mg/ml	Chl			DCM			MeOH			H_2O		
	F	T	R	F	T	R	F	T	R	F	T	R
9	2.090	2.317	2.711	2.012	2.302	2.983	2.314	2.229	2.220	0 .790	1.250	0.683
8	1.737	2.169	2.478	1.737	2.025	2.836	2.034	1.846	1.813	0.666	1.143	0.635
7	1.595	1.973	2.237	1.579	1.927	2.642	1.684	1.603	1.574	0.588	1.080	0.544
4	1.008	1.343	1.676	1.066	1.198	1.813	0.837	0.990	0.999	0.381	0.581	0.315
2	0.685	0.722	1.079	0.726	0.830	1.080	0.328	0.345	0.556	0.272	0.293	0.112
1	0.353	0.482	0.653	0.386	0.331	0.836	0.139	0.198	0.262	0.108	0.118	0.069

Tableau 11: Capacité antioxydante (FRAP) des quatre extraits des feuilles, des tiges et des racines de *P. bituminosa.*

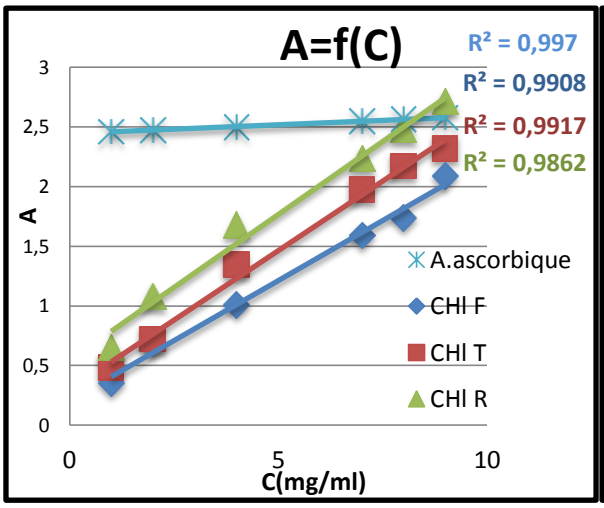


Figure 13: Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante.

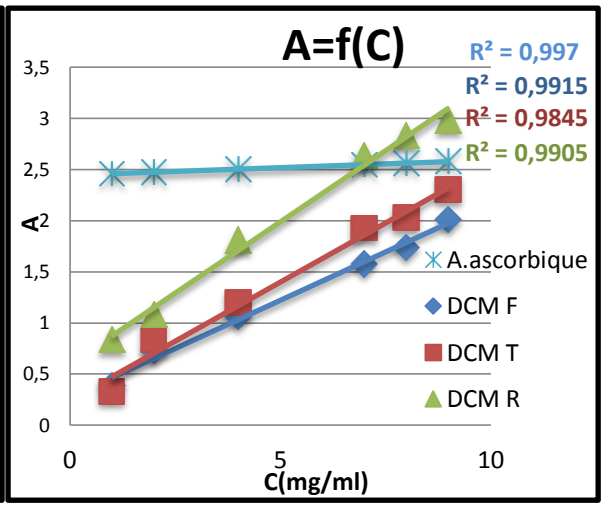


Figure 14: Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante.

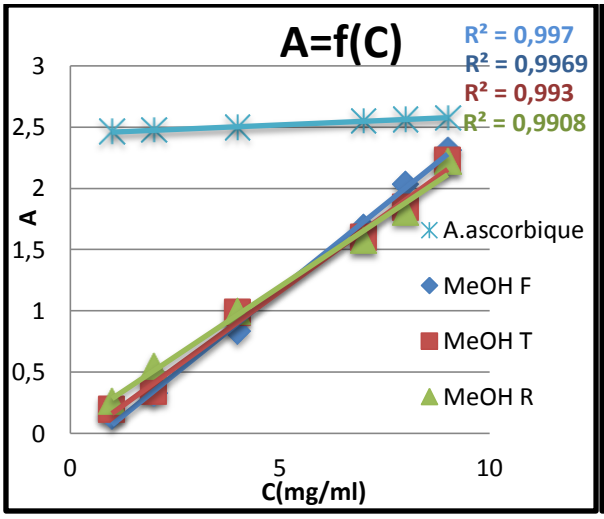


Figure 15: Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait methanolique des différentes parties de la plante.

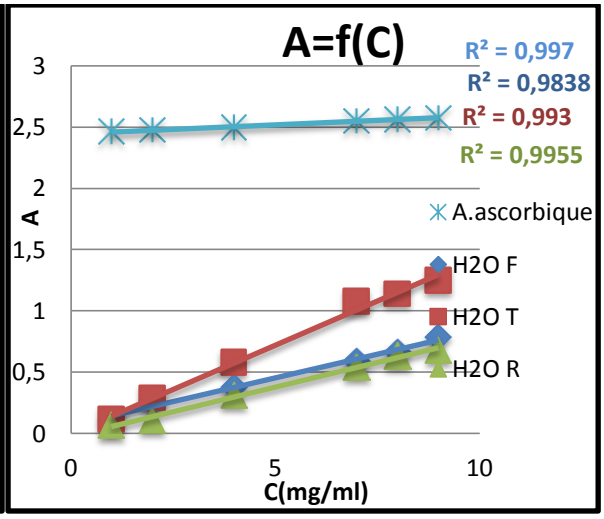


Figure 16: Pouvoirs réducteurs du fer de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante.

a. Les extraits des composés phénoliques :

	Absorbance à 700 nm			
C (mg/ml)	**Polyphénols**	**tanins**	**Fraction ac d'éthyle**	**Fraction n-butanol**
0.5	0,131	0,058	0,105	0,699
0.75	0,175	0,082	0,134	1,183
1	0,208	0,077	0,236	1,408
1.5	0,445	0,128	0,344	1,761
2	0 ,572	0,234	0,532	1,990

Tableau 12: Capacité antioxydante (FRAP) des extraits des composés phénoliques.

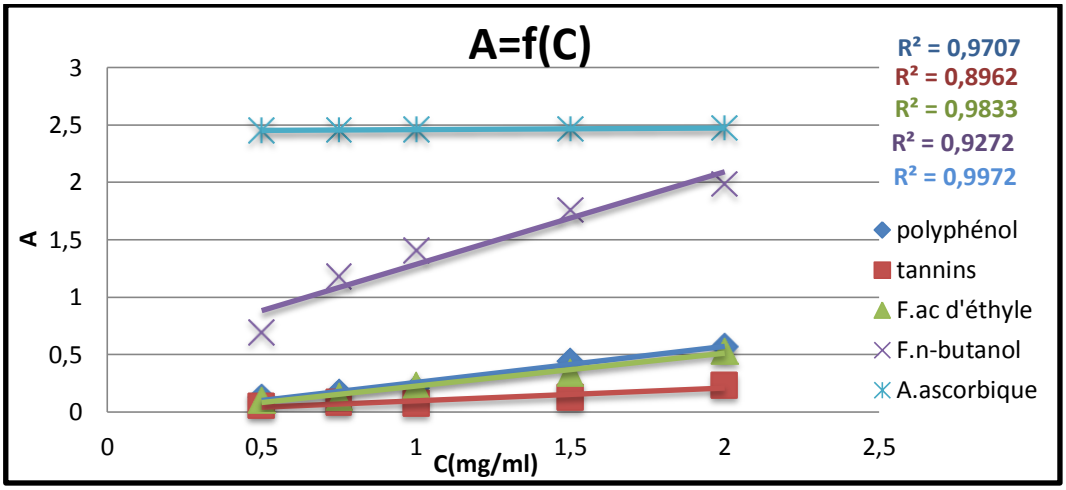


Figure 17: Pouvoirs réducteurs du fer des différents extraits des composés phénoliques.

Des résultats du pouvoir antioxydant de réduction ferrique (FRAP) appliqué aux différents extraits, il a été constaté que pour les extraits bruts (chloroformique et au dichlororométhane), les racines ont une capacité à réduire le fer supérieure à celle de la partie aérienne de la plante. Pour les deux autres extraits (méthanolique et aqueux), les trois parties de la plante ont pratiquement le même pouvoir de réduire le fer. En revanche, la fraction butanolique de la partie aérienne a montré une capacité à réduire le fer très proche de celle de l'acide ascorbique et nettement plus importante que celles des autres extraits.

V.5.4. Test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène:

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β-carotène, ce qui entraine une décoloration de ce dernier mesuré spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β-carotène **[70]**.

C mg/ml	% d'inhibition du blanchiment du β-carotène											
	Chl			DCM			MeOH			H_2O		
	F	T	R	F	T	R	F	T	R	F	T	R
10	94	84	63	93	63	55	87	49	19	73	33	39
7	62	53	43	74	48	49	59	36	9	52	23	26
4	34	26	23	52	19	25	36	26	8	24	20	19
2	15	19	13	38	14	10	20	15	5	11	16	13
1	7	9	6	18	8	4	9	3	1	1	7	6

Tableau 13: Capacité antioxydante (β-carotène) des quatre extraits des feuilles, des tiges et des racines de *P.bituminosa* L.

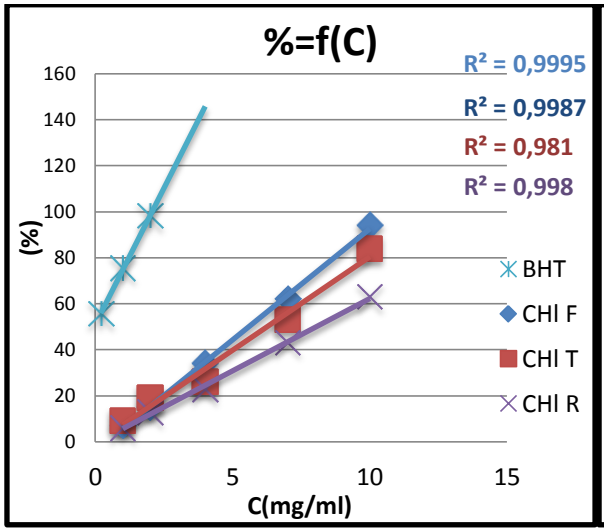


Figure 18: % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait chloroformique des différentes parties de la plante.

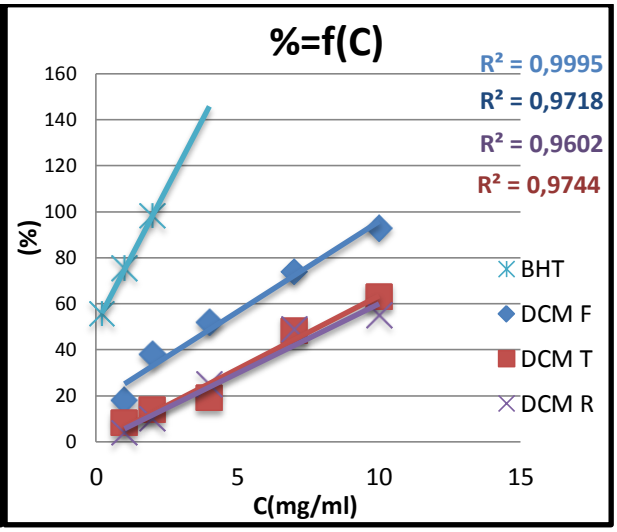


Figure 19: % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait au dichlorométhane des différentes parties de la plante.

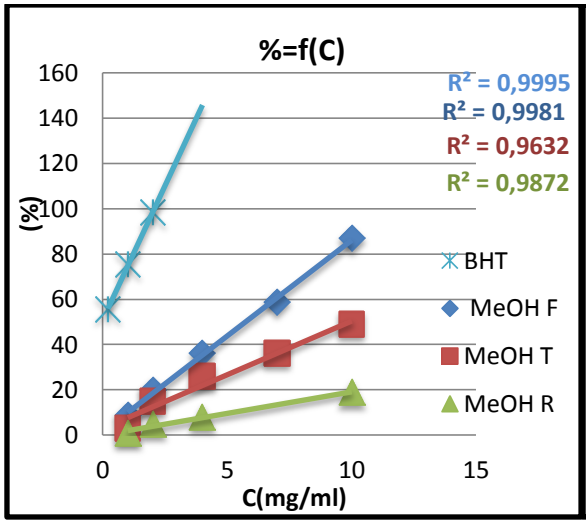


Figure 20: % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait méthanolique des différentes parties de la plante.

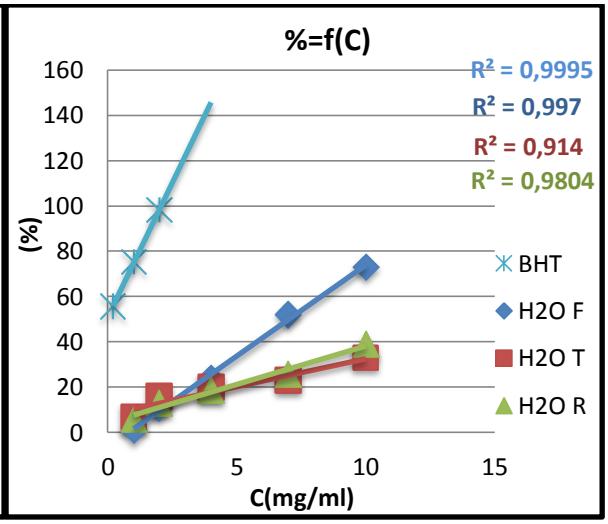


Figure 21 : % d'inhibition de blanchiment du β-carotène de l'extrait aqueux des différentes parties de la plante.

	IC50 exprimées en mg/ml			
Les parties étudiées de la plante	**Chl**	**DCM**	**MeOH**	**H_2O**
Feuilles	4.76	4.16	5.72	5.43
Tiges	6.05	7.84	/	/
Racines	7.85	8.22	/	/
BHT	0.140			

Tableau 14: Activité antioxydante exprimée en valeurs IC50 par le système β-carotène des quatre extraits des feuilles, tiges, racines de la plante.

Le test de blanchissement de la ß-carotène nous a permis de déterminer les valeurs des IC50 relatives à nos extraits que nous avons comparées à celle de la BHT (contrôle positif). Aucun des extraits bruts testés n'a donné une bonne activité.

Pour la détermination des activités antioxydantes des extraits, les différentes approches méthodologiques appliquées précédemment mènent à des résultats dispersés, qui ne sont pas toujours comparables, Cela pourrait s'expliquer par la sensibilité propre à chaque test.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les plantes médicinales sont une source importante de beaucoup d'antioxydants naturels. La présence de ces derniers dans notre alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Cependant, les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur remplacement par des agents naturels. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude des activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen (Ouchba) ; *Psoralea bituminosa* L .

La présente étude a consisté dans un premier temps, à réaliser un criblage phytochimique de *Psoralea bituminosa* L ; une plante appartenant à la famille des fabacées et qui n'a pas été bien étudiée sur le plan chimique.

Lors de l'examen phytochimique du matériel végétal par des réactions colorées et de précipitation, les métabolites secondaires qui y sont contenus notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, les saponines, les composés réducteurs et les stéroïdes ont été identifiés. L'amidon n'est pas présent.

Les flavonoïdes et les tanins (substances naturelles antioxydantes à intérêt considérable en pharmacologie) mis en évidence par les tests phytochimiques pourraient présager que *Psoralea bituminosa* L est douée d'activité antioxydante.

Pour la détermination des activités antioxydantes, il existe plusieurs méthodes. La complexité chimique des extraits, souvent un mélange de plusieurs dizaines de composés avec des groupes fonctionnels différents, pourrait conduire à des résultats épars, en fonction du test utilisé. Par conséquent, une approche avec de multiples essais pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire. Dans cette étude, trois méthodes ont été utilisées : l'activité de piégeage du radical DPPH, la méthode de blanchiment du β-carotène et la réduction du fer FRAP.

Le calcul des IC50 a permis de localiser le pouvoir piégeur du radical DPPH le plus important de nos extraits bruts. Effectivement, le test au DPPH révèle que l'extrait chloroformique et à un degré moindre, l'extrait au dichlorométhane des feuilles sont les deux extraits les plus actifs comme piégeurs du radical DPPH. Par ailleurs, pour les composés phénoliques, les flavonoïdes contenus dans la fraction butanolique de la partie aérienne de la plante manifestent une activité antioxydante très importante avec un IC50 de 0.95. En effet,

les flavonoïdes est une vaste famille de composés phénoliques qui protègent contre les rayons UV et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation **[71]**.

Quant au pouvoir antioxydant de réduction ferrique (FRAP) appliqué aux différents extraits, il a été constaté que les extraits bruts chloroformique et au dichlororométhane, les racines ont une capacité à réduire le fer supérieure à celle de la partie aérienne de la plante. Pour les deux autres extraits (méthanolique et aqueux) les différentes parties de la plante ont pratiquement le même pouvoir de réduire le fer. En revanche, la fraction butanolique de la partie aérienne a montré une capacité à réduire le fer très proche de celle de l'acide ascorbique et nettement plus importante que celles des autres extraits.

Le test de blanchissement de la ß-carotène nous a permis de déterminer les valeurs des IC50 relatives à nos extraits que nous avons comparées à celle de la BHT (contrôle positif). Aucun des extraits bruts testés n'a donné une bonne activité.

Pour la détermination des activités antioxydantes des extraits, ces approches méthodologiques différentes mènent à des résultats dispersés, qui ne sont pas toujours comparables. Cela pourrait s'expliquer par la sensibilité propre à chaque test. L'utilisation de trois tests différents nous a permis d'avoir une meilleure lecture de l'activité antioxydante de nos extraits.

Par ailleurs, sept (07) acides gras ont pu être identifiés dans la partie aérienne de *Psoralea bituminosa* L. dont deux acides gras insaturés importants : l'acide oléique (C_{18} : 1) et l'acide linoléique (C_{18} : 2).

En fin, des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier les composés présents dans les extraits que nous avons investigués.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Lamassiaude-Peyramaure S., Actualités pharmaceutiques, N° 476, 2008, p. 41.

[2] Colegate S. M., Molyneux R. J., Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, 2ème Ed. CRC press, cop., 2008, p. 1-605.

[3] Zhu Y.-Z., Natural products: essential resources for human survival, Ed. World Scientific, cop., 2007, p. 1-454.

[4] Kassel D., Des hommes et des plantes, Juillet 1996, p. 1.

[5] Wojciechowski M.F., Lavin M., Sanderson M.J., 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, 2004, 11: 1846-2004.

[6] Dupont F., Guignard J.L., Abrégé de Botanique, 14ème Ed. Masson, Paris, 2007, p. 285.

[7] Beniston W. S., Fleurs d'Algerie, Ed. Ise Nationale du livre Alger, 1984, p. 223.

[8] Baba Aissa F., Encyclopédie des plantes utiles-flore d'Algerie et du Maghreb, Ed. Libraire moderne, Rouiba, 1999, p. 230.

[9] Quezel P., Santa S., Nouvelle flora de l'Algerie et des régions désertiques méridianales, Tome I, Ed. CNRS, Paris, 1962, p. 502.

[10] Llorent-Martinez E. J., Spinola V., Gouveia S., Castilho P. C., HPLC-ESI-MS characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa,* Industrial Crops and Products, 2015, 69: 80-90.

[11] Noccioli C., Bertoli A., Agus E., De Logu A.,Pestelli L., Chemistry of Naural compounds, HPLC-DAD-MS Analysis and antiviral activity of different extracts and isolated constituents from *Bituminaria bituminosa*, 2014, 50(4): 726-729.

[12] Histoire naturelle des médicamens, des aliments et des poisons, tires des trois règnes de la nature 1820 p 280. Par Julien Joseph Virey.

[13] Ventura M. R., Castanon J. I. R., Mendez P., Effect of season on tedera (*Bituminaria bituminosa)* intake by goats, Animal Feed Science and Technology, 2009, 153: 314-319.

[14] Andreu V., Rubio J. L., Cerni R., Effect of Mediterranean shrub on water erosion control, Environmental Monitoring and Assessment, 1995, 37(1): 5-15.

[15] Rivera D., Obon C., The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review, Journal of Ethnopharmacology, 1995, 46(2): 73-93.

[16] Innocenti G., piovan A., Filippin R., Caniato R., Cappelletti E.M., Quantitative Recovery of Furanocoumarins from *Psoralea bituminosa*, Phytochemical Analysis, 1997, 8(2): 84-86.

[17] Gordaliza M., del Corral J. M. M., Castro M. A., Gorritti C., San Feliciano A., Composition and biological activities of the genus *Psoralea*, Current Topics in Phytochemistry, 1999, 2: 151-161.

[18] Pistelli L., Noccioli C., Appendino G., Bianchi F., Sterner O., Ballero M., Pterocarpans from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*, phytochemistry, Special Issue in Memory of. Professor Jeffrey B. Harborne, 2003, 64(2): 595-598.

[19] Bertoli A., Menichini F., Noccioli C., Morelli I., Pistelli L., Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa* L., Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19(2) : 166-171.

[20] Maurich T., Iorio M., Chimenti D., Turchi G., Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpans purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient-and deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion, Chemico-Biological Interactions, 2006, 159(2): 104-116.

[21] Walker D. J., Moñino I., Correal E., Genome size in *Bituminaria bituminosa* (L.) C. H. Stirton (Fabaceae) population: separation of 'true' differences from environmental effects on DNA determination, Environmental and Experimental Botany, 2006, 55(3): 258-265.

[22] Tava A., Pecetti L., Ricci M., Pagnotta M. A., Russi L., Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy, Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22(5): 363-370.

[23] Martinez S., Correal E., Real D., Ortuño A., Rio J. A. D., *Bituminaria bituminosa*: a source of furanocoumarins of pharmaceutical interest, 2010, 27: 307-322.

[24] Walker D. J., Martinez-Fernández D., Correal E., Romero-Espinar P., Antonio del Rio J., Accumulation of furanocoumarins by *Bituminaria bituminosa* in relation to plant development and environmental stress, Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 54: 133-139.

[25] Azzouzi S., Zaabat N., Medjroubi K., Akkal S., Benlabed K., Smati F., Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae), Asian Pacific journal Tropical Medicine, 2014, 7(1): S481-S484.

[26] Lemouchi R., Selles C., Medjdoub H., Tabti B., Assessment of possible efficacy of aqueous leaves extract of *Psoralea bituminosa* L. for anti-hyperglycaemic activity, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015, 5(7): 575-578.

[27] Lutge U., Kluge M., Bauer G., Botanique, 3ème Ed. Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 2002, p. 211.

[28] Abderrazak M., Joël R., La botanique de A à Z, Ed. Dunod, Paris, 2007, p. 177.

[29] Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales –, 3ème Ed. Techniques et documentations, Paris, 1999, p. 227-310-312-313-314, 494.

[30] Lugasi A., Hovari J., Sagi K., Biro L., The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.J.Acta.biologica, Szegediensis, 2003, 47(1-4): 119-125.

[31] King A., Young G., characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, Jof the American dietetic association, 1999, 99: 213-218.

[32] Tapiero H., Tew K. D., Nguyen B. G., Mathé G., Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies?, Biomed pharmac other, 2002, 56: 200-207.

[33] Boizot N., Charpentier J.P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier, Le cahier des techniques de l'Inra, 2006, p. 79-82.

[34] Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K., Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids, Phytochemistry, 2006, 67: 2058-2070.

[35] Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A. M., Le préparateur en pharmacie dossier, 2éme Ed. TEC&DOC, Paris, 2001, p. 275.

[36] Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 2000, 55: 481-504.

[37] Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Knez Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, Food chemistry, 2005, 89(2): 191-198.

[38] Dacosta Y., Les phytonutriments bioactifs, Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317.

[39] Di Carlo G., Mascolo N., lzzo A.A., Capasso F., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sciences, 1999, 65(4): 337-53.

[40] Effendi L., Yajun Y., Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in Escherichia coli, Metabolic Engineering, 2008, 8(2): 172-181.

[41] Medic-Saric M., Jasprica I., Smolcic-Bubalo A., Mornar A., Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids, Croatica Chemica Acta, 2003, 77(1-2): 361-366.

[42] Fuhrman B., Lavy A., Aviram M., Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation, The American Journal of CLINICAL NUTRITION, 1995, 61: 549-554.

[43] Halliwell B., Free radicals and antioxidants, Nutrition Reviews, 1994, 52: 253-265.

[44] Cotelle N., Role of flavonoids in oxidative stress, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1: 569-590.

[45] Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G., Flavonoids as antioxidants, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1994, 116(11): 4846-4851.

[46] Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C., Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties, BIOCHEMICAL JOURNAL, 1998, 330(3): 1173-1178.

[47] Paris M., Hurabielle M., Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome 1, Ed. Masson, Paris, 1981, p. 102-103-104-107.

[48] Khanbabae K., Ree T. R., Tannins: Classification and Defenition, Journal of Royal Society of Chemistry, Journal of Royal Society of Chemistry, 2001, 18: 641-649.

[49] Hellal Z., Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus), Mémoire de Magister, 2011, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

[50] Bouhajra K., étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, 2011, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

[51] Mohammedi Z., Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère, 2005, Université-Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.

[52] Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R., Travaux et documents de l'orstom, Paris, 1971.

[53] Trease E., Evans W. C., Pharmacognosie, Billiaire Tindall,13 th Ed., London, 1987, p. 61-62.

[54] Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D., Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plant, Ed. ICS-UNIDO, 2008, p.23-24, 40-41.

[55] Sarker D. S., Latif Z., Gray I. A., Natural Products Isolation, Ed. Humana Press, 2006, p.33-34, 251.

[56] Bekkara F., Jay M., Viricel M. R., Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two Viciafabacvs differing in their seed tannin content and study of their seed and root phenolic exudations, Plant and Soil, 1998, 203: 27-36.

[57] Zhang S. Y., Zheng C. G., Yan X. Y., Tian W. X., Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 371: 654-658.

[58] Bendiabdellah A. Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus (D. crinitus, D. muricatus et D. carota* ssp *hispanicus)* de la région de Tlemcen, Thèse de Doctorat d'état, 2014, Université de Tlemcen.

[59] Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-calixto F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, Journal Science Technology International, 1998, 8: 121-137.

[60] Oyaizu M., Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.

[61] Singleton V. L., Rossi J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Technology and Viticulture, 1965, 16 :144-153.

[62] Chaouche T. M., Contribution à l'étude des activités antimicrobiennes des extraits de de quelques plantes médicinales, Thèse de Doctorat d'état, 2014, Université de Tlemcen.

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

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

[65] Ruzin A., Novick R. P., Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*, Journal of Bacteriol, 2000, 182(9): 2668–2671.

[66] De Caterina R., n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease, The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, 2011, 364: 2439-2450.

[67] Anderson B. M., Ma D. W. L., Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?, Lipids in Health Disease, 2009, 8: 8-33.

[68] Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Sokmen A., Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey, Food Chemistry, 2006, 95: 200-204.

[69] Majhenic L., Kerget M. S., Knez Z., Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts, Food Chemistry, 2007, 104: 1258-1268.

[70] Kubola J.,Siriamornpum S., Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordicacharantia*L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*, Food Chemistry, 2008, 110(4): 881-890.

[71] Bruneton J., Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, revue et augmentée, Tec & Doc – Ed. médicales internationales, Paris, 2009, p.1288.

Annexe

Annexe

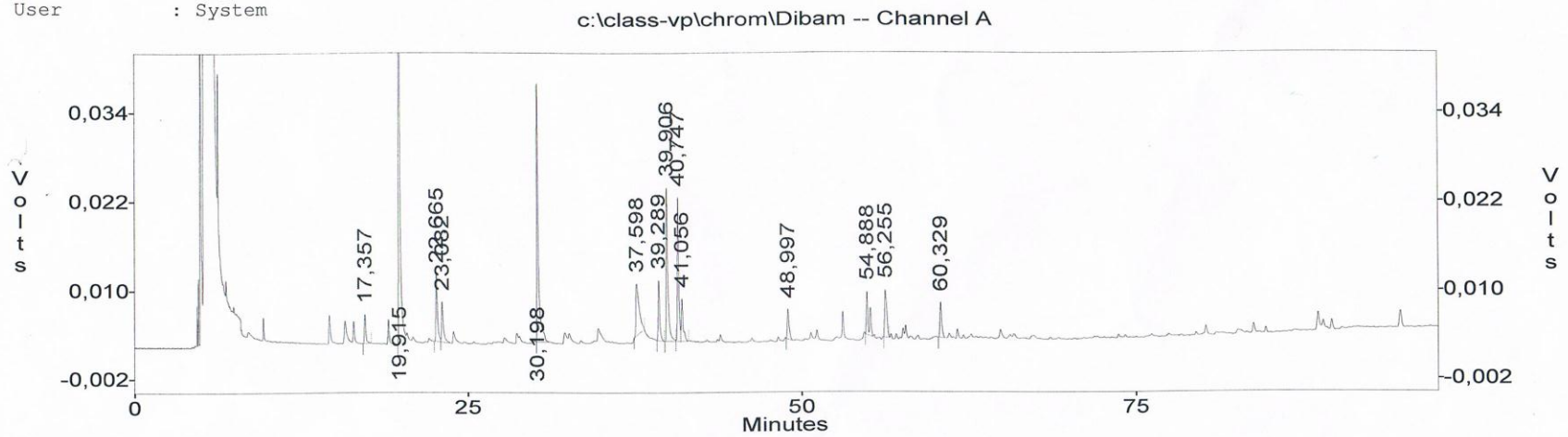
Chromatographie en phase gazeuse :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées en utilisant un appareil CPG Perkin Elmer Clarus 600 (Walhton, MA, USA) équipé d'un injecteur unique et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil a été utilisé pour l'échantillonnage simultané de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mx 0,22 mm, épaisseur film de 0,25 um) avec différentes phases stationnaires: Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et RTX cire (polyéthylène glycol). Le programme de température est:
de 60 à 230 ° C par pat de 2 ° C/min, puis la température est maintenu stable à 230 ° C pendant 30 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène (0,7 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenus à 280 ° C. Le mode d'injection a été mené avec un rapport de 1:80. Volume injecté: 0,1 µl.

Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse :

L'huile essentielle a été analysée en utilisant un analyseur quadripôle Perkin Elmer TurboMass, directement couplé à un Perkin Elmer Autosystem XL équipé de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mm 0,22 mm, Epaisseur 0,25 um), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Pour la CPG les mêmes conditions décrit ci-dessus ont été conservé. Pour la SM, la température de la source d'ions: 150 ° C; l'énergie d'ionisation: 70 eV; Les spectres de masse à ionisation électronique ont été acquises avec un intervalle de masse de 35 à 350 Da; balayage de masse: 1s. Volume d'huile injectée: 0,1 µl.

File : c:\class-vp\chrom\Dibam
Method : c:\class-vp\methods\Djabou.met
Sample ID :
Inj. Vial : 000
Acquired : May 8, 2016 13:09:19
Printed : May 8, 2016 14:48:44
User : System



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	17,36	28668	1,606
2	19,92	549202	30,768
3	22,67	73331	4,108
4	23,08	51160	2,866
5	30,20	289733	16,232
6	37,60	125299	7,020
7	39,29	64956	3,639
8	39,91	184239	10,322
9	40,75	141402	7,922
10	41,06	55453	3,107
11	49,00	36883	2,066
12	54,89	71418	4,001
13	56,25	70784	3,966
14	60,33	42436	2,377
Totals :		1784964	100,000