



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

THÈSE

En vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat en Sciences

Présentée et Soutenu par :
Mr BELMOKHTAR Zoubir

Intitulé
**Identification et caractérisation des molécules du métabolisme
secondaire de *Retama monosperma. L* Boiss,
intérêt pharmaceutique.**

Spécialité : Biotechnologie

Option : Biotechnologie Végétale

Le jury est composé de :

<i>Grade, Nom & Prénom</i>	<i>Statut</i>	<i>Domiciliation</i>
Pr. DJABEUR Abderezak	Président :	USTOMB Oran
Pr. KAID-HARCHE Meriem	Rapporteur	USTOMB Oran
Pr. CHERITI Abdelkrim	Examineur	U Tahri Mohamed (Bechar)
Pr. BELKHODJA Moulay	Examineur	U Ahmed Ben Bella (Oran 1)
Pr. DJAHED Benyounes	Examineur	UDL (Sidi Bel Abbes)
MCA. BENAHMED BOUHAFSOUN Aicha	Examinatrice	USTOMB Oran

Année Universitaire 2014 / 2015

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire production et valorisation végétale et microbienne (LP2VM), de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Oran, Mohamed Boudiaf (USTO-MB), sous la direction du Professeur **KAID-HARCHE Meriem** que je tiens à remercier pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'encadrement et le soutien moral qu'elle a su m'apporter tout au long des années de formation (graduation et post graduation).

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **DJABEUR A**, Professeur à l'université de l'USTO-MB, ses conseils précieux et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'exprime également mes sincères remerciements à Monsieur **CHERITI A** Professeur à l'université Tahri Mohamed de Bechar d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse

Mes vifs remerciements s'adressent également à Monsieur **BELKHODJA M** Professeur à l'université Ahmed Ben Bella (Oran 1), d'avoir accepté d'examiner ce travail et de me faire bénéficier de leur expérience.

J'exprime également mes sincères remerciements à Monsieur **DJAHED B** Professeur à l'université de Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail. J'ai toujours apprécié leurs remarques avisées.

Ma spéciale gratitude et mes grands remerciements sont adressés à Mme **BENAHMED-BOUHAFSOUNE A** maître de conférences A à l'université de l'USTO-MB en acceptant de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Mes remerciements s'adressent aussi à nos ingénieurs de laboratoire **MEZMEZ R**, **GUERRAR A**, **ACHOURI H** et **MOHAMED** pour l'accueil chaleureux et pour leur aide pour la fourniture des réactifs manquants.

A

mes parents

ma femme

mes petites filles adorables.



الملخص

في هذا الجزء من أطروحة قمنا بتقييم نشاط مضادات الاكسدة في ريتاما والجزئيات ربط هذا النشاط. البذور والزهور والسيقان من ريتاما تعرض لأول مرة إلى "الفرز" الكيميائية، وفقا لأساليب مجربة بسيطة لفترة طويلة من قبل مؤلفين مختلفين، ومن ثم دراسة والأولية، والمواد الكيميائية الأنشطة البيولوجية التي لم يكن لدينا أي معلومات ببليوغرافية.

خضعت مقتطفات المائة الميثانول من أجهزة مختلفة تجزئة السائل السائل مع المذيبات زيادة قطبية (الهكسان والتولوين، والكلوروفورم، خلات الإيثيل، وأخيرا بيوتانول) إلى الأداء الأمثل ونشاط كل جزء

تحليل مقتطفات مختلفة وجزئياتها باستخدام أنظمة الهجرة والوحي المذيبات المختلفة (UV 336، و 254: فانيليا الكبريتيك و DPPH) لتأكيد غياب أو وجود جزئيات الأيض الثانوية. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة من كل عينة والكسور من قبل اثنين من الاختبارات الكيميائية: طريقة استخدام جذرية (DPPH •) وطريقة PPM. وبالإضافة إلى ذلك، مجموع التقديرات المحتوى المركبات الفينولية عن طريق اختبار اللونية فولين- في فلافونيدات من) والعفص مكثف (فانيليا، حمض الهيدروكلوريك)، وأجريت أيضا

وأظهرت النتائج أن نسبة إيثيل أسيتات من البذور هو الأكثر غنية في مادة البوليفينول جزء الإجمالي (524.81 ملغ / ز) وفلافونيدات (300.2 ملغ م / ز) هذا نفس جزء لديها أعلى نشاط مضاد للأكسدة مع DPPH $IC_{50} = 0.15$ (ملغ / مل)، وإجمالي نشاط مضادات الأكسدة من 197.95 ملغ / غ EAA إنشاء منحنيات العلاقة يبين أن مركبات الفلافونويد هي المكونات الرئيسية المشاركة في النشاط المضادة للأكسدة مع معامل الارتباط $r = 0.91$ مع اختبار PPM و $r = -0.79$ مع اختبار DPPH. في مقابل معامل ارتباط منخفض جدا بين العفص مكثف هذا النشاط.

كلمات البحث: ريتاما monosperma، البوليفينول والعفص المختصرة، الفلافونويد، والنشاط المضادة للأكسدة، والارتباط

ABSTRACT

In this study we characterized the main classes of secondary metabolism and evaluated the antioxidant activity of *Retama monosperma* and the molecules bind to this activity.

Seeds, flowers and stems of *Retama monosperma* of Cape Falcon station (Oran) were the subject of all, a "screening" chemical, to characterized the main chemical classes of these three bodies, to then study and priority as substances and biological activities on which we did not have any bibliographic data.

The hydro-methanol extracts of different organs have undergone liquid-liquid fractionation with solvents of increasing polarity (hexane, toluene, chloroform, ethyl acetate and finally butanol) to optimized performance and activity of each fraction.

TLC analysis of different extracts and their fractions using different solvent migration and revelation systems (UV 336, and 254: sulfuric vanillin and DPPH) to confirm the absence or presence of the molecules of secondary metabolism.

The antioxidant capacity of each extract and the fractions were evaluated by two chemical tests: the method using the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) and the PPM method (phosphomolybdate). In addition, content estimates total phenolic compounds via the Folin-Ciocalteu colorimetric test in flavonoids (aluminum chloride) and condensed tannins (vanillin-HCl), were also performed.

The results show that flavonoids, tannins, saponins, alkaloids and reducing sugars are present in the three oranges. While cyanogenic compounds, anthocyanins, quinones and anthraquinones are absent. When the leuco anthocyanins and terpenoids they are detected only in flowers and seeds. These results support the adaptation of *Retama monosperma* mechanism against strong insolation "UV radiation" and its own protection against attacks by herbivores

Three well separated spots majority which their R_f 0.12, 0.21 and 0.46 is using the migration solvent AcOEt-MeOH-H₂O (100: 13.5: 10). Their revelation by the DPPH indicates that they had an interesting antioxidant activity. The ethyl acetate fraction of the seeds is the richest in total polyphenol fraction (524.81 mg GAE / g) and flavonoids (300.2 mg CE / g). This same fraction has the highest antioxidant activity with DPPH $IC_{50} = 0.15$ (mg / ml) and total antioxidant activity of 197.95 mg / g EAA. The butanol fractions were poorest in phenolic compounds and have the lowest antioxidant activities.

The establishment of the correlation of curves shows that the flavonoids are the major components involved in the antioxidant activity with a correlation coefficient $r = 0.91$ with the PPM test and $r = - 0.79$ with DPPH test. As against the correlation coefficient is very low between condensed tannins and antioxidant capacity.

The results obtained suggest that *Retama monosperma* can be valued in the pharmaceutical field.

key words: *Retama monosperma*, secondary metabolism, phenolic compounds, antioxidant activity, correlation, pharmaceutical.

RÉSUMÉ :

Dans cette étude nous avons caractérisé les principales classes du métabolisme secondaire et évalué de l'activité antioxydante de *Retama monosperma*, ainsi les molécules liées à cette activité.

Les graines, les fleurs et les tiges de *Retama monosperma* de la station de Cap Falcon (Oran) ont fait l'objet d'abord, d'un "screening" chimique, afin de caractériser les principales classes chimiques de ces trois organes, pour étudier ensuite et en priorité, que les substances et les activités biologiques sur lesquelles on ne possédait aucune donnée bibliographique.

Les extraits hydro-méthanoliques de différents organes ont subi des fractionnements liquide-liquide par des solvants de polarité croissante (hexane, toluène, chloroforme, acétate d'éthyle et enfin le butanol) afin d'optimiser le rendement et l'activité de chaque fraction.

Des analyses sur CCM de différents extraits et de leurs fractions en utilisant différents solvants de migration et des systèmes de révélation (UV 336, et 254 : vanilline sulfurique et DPPH) afin de confirmer l'absence ou la présence des molécules du métabolisme secondaire.

La capacité antioxydante de chaque extrait et de ces fractions ont été évalués par deux tests chimiques : la méthode utilisant le radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH•) et la méthode PPM (PhosPhoMolybdate). En complément, des estimations du contenu en composés phénoliques totaux via le test colorimétrique Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes (chlorure d'aluminium) et en tannins condensés (vanilline-HCl), ont également été réalisées.

Les résultats montrent que les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les sucres réducteurs sont présents dans les trois oranges. Alors que les composés cyanogéniques, les anthocyanes, les quinones et les anthraquinones sont absentes. Quant aux leuco-anthocyanes et les terpénoïdes elles sont détectées uniquement dans les fleurs et les graines. Ces résultats justifient le mécanisme d'adaptation de *Retama monosperma* contre les forts ensoleillements « radiations U.V » et sa propre protection contre les attaques des herbivores.

Trois spots majoritaires bien séparés dont leurs R_f est 0.12, 0.21 et 0.46 à l'aide du solvant de migration ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10). Leur révélation par le DPPH indique qu'elles possédaient une activité antioxydante intéressante. La fraction acétate d'éthyle des graines est la fraction la plus riche en polyphénols totaux (524.81 mg GAE/g) et en flavonoïdes (300.2 mg CE/g). Cette même fraction présente l'activité antioxydante la plus élevée avec un IC_{50} DPPH = 0.15 (mg/ml) et une activité antioxydante totale de 197.95 mg/g EAA. Les fractions butanoliques sont les plus pauvres en composés phénoliques et présentent les activités antioxydantes les plus faibles.

L'établissement des courbes de corrélation montre que les flavonoïdes sont les composés majeurs impliqués dans l'activité antioxydante avec un coefficient de corrélation $r = 0.91$ avec le test PPM et $r = -0.79$ avec le test DPPH. Par contre le coefficient de corrélation est très faible entre les tannins condensés et la capacité antioxydante.

Les résultats obtenus suggèrent que *Retama monosperma* peut être valorisé dans le domaine pharmaceutique.

Mots clés : *Retama monosperma*, métabolisme secondaire, composés phénoliques, activités antioxydantes, corrélation, pharmaceutique.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie d'un pied de <i>Retama monosperma</i> poussant dans les conditions naturelles.....	11
Figure 2: Photographie d'une fleur de <i>Retamamonosperma</i>	11
Figure 3: Photographie d'un fruits du <i>Retama monosperma</i> ,.....	11
Figure 4 : Origines des principaux métabolites secondaires par rapport aux voies métaboliques de base.....	16
Figure. 5 : La vois de biosynthèse des terpenoides à partir de acetyl-CoA.....	18
Figure 6 : Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP).....	20
Figure 7: Quelques exemples de l'implication des composés phenoliques dans le développement de la plante et dans les interactions avec l'environnement.....	24
Figure 8 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.	26
Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes.....	27
Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes issues du règne végétal.....	28
Figure 11 : Principaux acides phénoliques issus du règne végétal.....	28
Figure 12 : Structure du trans-resvératrol.....	29
Figure 13 : Structure et numérotation des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison 8,8').....	29
Figure. 14 : Intermédiaires réduits de l'oxygène.	32
Figure 15 : Les enzymes antioxydantes et leurs mécanismes d'action.....	35
Figure 16 : Structure de la glutathion.....	36
Figure 17 : Structure chimique des tocophérols.....	37
Figure 18 : Mécanisme de régénération potentiel entre l' α tocophérol (α -TOH), l'ascorbate (AscO^-) et les flavonoïdes (Fl) dans les systèmes membranaires.....	38
Figure 19 : Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C).....	38
Figure 20 : Principaux caroténoïdes antioxydants.....	39
Figure 21 : Carte géographique montrant la position de la station de prélèvement Cap Falcon (Oran) par rapport au bassin méditerranéen.....	31
Figure 22: Schéma regroupant les étapes de fractionnement liquide-liquide des polyphenols	

de <i>Retama monosperma</i>	46
Figure 23 :Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de <i>Retama monosperma</i> , pulvérisé par la vanilline sulfurique.....	53
Figure 24 :Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de <i>Retama monosperma</i> , observé sous UV. Solvant de migration : AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11: 20).....	54
Figure 25 :Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de <i>Retama monosperma</i> , observé sous UV. Solvant de migration : ACOET-MeOH-H ₂ O (100:13.5:10)....	55
Figure 26 :Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de <i>Retama monosperma</i> , pulvérisé par le DPPH 0.2 %.....	56
Figure 27 :Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les graines de <i>Retama monosperma</i>	58
Figure 28 : Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les fleurs de <i>Retama monosperma</i>	58
Figure. 29 : Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les fleurs de <i>Retama monosperma</i>	59
Figure. 30 : La capacité antioxydante totale des différents extrait des graines, tiges et fleurs de <i>Retama monosperma</i>	60
Figure 31 : Activité antioxydante des différents extraits et leurs fractions de <i>Retama monosperma</i> . A : graines, B : tiges, C : fleurs.....	62
Figure 32 : Relation entre la capacité antioxydante totale (AAT) et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B) et les tannins condensés (C).....	63
Figure 33 : Corrélation entre la réduction du DPPH exprimée en valeur IC ₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B) et les tannins (C).....	64
Figure 34 : La Reaction de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical avec des capteurs de radicaux (RH).....	68
Figure 35 : Les relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des paramètres de distinction entre les trois espèces du genre <i>Retam</i>	8
Tableau 2 : Formule et structure chimique des alcaloïdes majoritaires et communs entre les trois espèces du genre <i>Retama</i>	13
Tableau 3 : Classification des terpenoides.....	17
Tableau 4 : Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé.....	22
Tableau 5 : Principales classes des composés phénoliques.....	23
Tableau 6 : Les espèces chimiques réactives.....	32
Tableau. 7 : Tableau récapitulatif des classes phytochimiques présentes dans les tiges, les fleurs et les graines de <i>Retama monosperma</i>	51
Tableau 8 : Pourcentages massiques des fractions obtenues à partir des extraits bruts.....	52
Tableau 9: Résultats de la quantification spectrophotométrique des phénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés.....	57
Tableau 10 : Résultats des activités antioxydantes.....	60

LISTE DES ABREVIATIONS

APG : Angiosperm Phylogeny Group

Abs: Absorbance.

ACOET-MeOH-H₂O: Acétate d'éthyle-méthanol-eau

ACOET-HCOOH-AcOH-H₂O: Acétate d'éthyle-Acide formique-Acide acétique-eau.

BSA: Bovin Sérum Albumine.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CG/MS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

DMAPP : Diméthylallyl pyrophosphate.

D.O : Densité optique.

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

GPx: glutathion peroxydase

GS• : Thiyle radicale

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène

HMG : β-hydroxy β-méthylglutaryl

HNO₂ : L'acide nitreux

HO₂': Hydroperoxyl

HOBr : l'acide hypobromeux

HOCl : l'acide hypochloreux

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

IPP : Isopentenyl pyrophosphate

mg EAA/gES : milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait sec

mg E GA/g ES : milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec

mg E Ct/g ES : milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec

mg RE/g : milligrammes équivalent à la rutine par gramme

mg TAE/g : mg d'acide tannique équivalents par gramme

MVA : Acide mévalonique.

NO[•] : Le monoxyde d'azote

NO₂[•] : Le dioxyde d'azote

NO⁺ : Le cation nitrosyle

NO⁻ : L'anion nitroxyle

nm : nanomètre.

O₂^{-•} : Superoxide

¹O₂ : l'oxygène singulet

O₃ : Ozone

OH[•] : Hydroxyl radical

ONOO⁻ : Peroxynitrite

ONOOH : l'acide peroxynitreux

PPM : PhosPhoMolybdate

RO₂[•] : Peroxyl radical

ROO[•] : Peroxyl radical

RO[•] : Alkoxy

ROONO : Peroxynitrites alkyle

R_f : le facteur de rétention

r : Coefficients de corrélation de Pearson

SOD : Superoxydes dismutases

UV : Ultra-violet.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction:	1
Partie bibliographique	
Chapitre I: <i>Retama monosperma</i> .L	5
1. Position taxonomique de <i>Retama monosperma</i>	5
2. Les paramètres de distinction entre les trois espèces du genre <i>Retama</i>	8
3. Description morphologique de <i>Retama monosperma</i>	10
3. Répartition géographique :.....	10
4. Utilisation en phytothérapie.....	12
5. Composition chimiques et activités biologiques.....	12
Chapitre I:Le métabolisme secondaire	15
1. introduction :	15
2. Les terpènes :	17
2.1. Définition :	17
2.2. La biosynthèse des tetrpénoïdes dans le règne végétal par la voie du mévalonate.....	17
2.3. Sites de biosynthèse :.....	19
3. Les alcaloïdes :	21
3.1. Définition :	21
3.2. Sites de biosynthèse :	21
4. Les polyphénols :	23
4.1. Biosynthèse des polyphénols :	25
4.1.1. Voie de l'acide shikimique :.....	25
4.1.2. Voie de l'acide malonique :.....	25
4.2. Quelques classe polyphenoliques :	27
4.2.1. Les flavonoïdes :	27
4.2.2. Les acides phénoliques :	28
4.2.3. Les stilbènes :.....	29
4.2.4. Les lignanes :	29
4.2.5. Les tanins :	30

4.2.5.1. Les tanins hydrolysables :	30
4.2.5.2. Les tanins condensés :	30
Chapitre III : Radicaux libres et molécules antioxydantes	31
1. Les radicaux libres	31
2. Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène <i>in vivo</i>	32
3. Les antioxydants :	34
3.1. Les antioxydants enzymatiques	34
3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	34
3.1.2. Les catalases	35
3.1.3. La glutathion peroxydase (GPx)	35
3.2. Les antioxydants non enzymatiques	36
3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques endogènes :	36
3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques exogènes :	37
3.2.2.1. La vitamine E (tocophérol)	37
3.2.2.2. La vitamine C (acide ascorbique)	38
3.2.2.3. Les caroténoïdes :	39
3.2.2.4. Les composés phénoliques :	40

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes	42
1. Présentation de la station d'étude :	42
2. Matériel végétale :	42
3. Séchage et broyage :	42
4. Caractérisation phytochimique	43
4.1. Flavonoïdes (Réaction à la cyanidine) :	43
4.2. Leucoanthocyane :	43
4.3. Les anthocyanes :	44
4.4. Tanins :	44
4.5. Alcaloïdes :	44
4.6. Saponosides :	44
4.7. Tterpénoides :	44

4.8. Quinones :.....	45
4.9. Anthraquinones.....	45
4.10. Composés cyanogénétiques :.....	45
4.11. Recherche des sucres réducteurs:.....	45
5. Extraction et fractionnement des extraits bruts:.....	45
6. Screening chimique préliminaire par CCM :.....	47
6. Dosage des composés phenoliques :.....	48
6.1. Dosage des polyphénols :.....	48
6.2. Dosage des flavonoides :.....	48
6.3. Dosage des tanins condensés:.....	49
7. Evaluation de la capacité antioxydante :.....	49
7.1. Activité antioxydante totale:.....	49
7.2. Etude de l'activité antioxydative par DPPH :.....	50
8. Analyses statistiques.....	50
Chapitre II : Résultats et discussion.....	51
1) Résultats :	51
1.1. Caractérisation phytochimique	51
1.2. Rendement des extraits et des fractions :.....	52
1.3. Screening chimique préliminaire par CCM.....	52
1.4. Rendement du dosage des composés phenoliques.....	57
1.5. Activités antioxydatives :.....	62
1.6. Relation entre composés phénoliques et activité antioxydante :.....	64
2. Discussion :.....	67
Conclusion.....	78
Références bibliographiques.....	82
Annexe :.....	91

Introduction

L'organisme subit des phénomènes d'oxydation, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations par des systèmes de défense mis en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes non enzymatiques. Mais ce système de défense est parfois débordé. Surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil, d'un effort physique intense, etc.

Plusieurs cas peuvent engendrer des déséquilibres ; soit dans des conditions de stress et alors l'oxydation augmente au point de ne pas pouvoir être régulée, soit dans des conditions de mauvaise alimentation et alors les quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre. Ce dysfonctionnement est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont il est impliqué dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontré. **(Rahman, 2005)**

Actuellement, les composés phénoliques d'origine végétale, font l'objet de nombreuses études scientifiques en raison de leur capacité antioxydante et leurs impacts dans la santé humaine, en matière de prévention des maladies liées aux oxydations. **(Bravo, 1998)**.

Dans le cadre de la valorisation des espèces endémiques du Nord-africain ou Méditerranéen, notre laboratoire s'intéresse aux espèces très peu connues, parmi ces espèces *Retama monosperma*.

Retama monosperma communément appelé R'tem, appartient à la famille des Fabacées, endémique du Nord-Ouest africain (Algérie et Maroc) **(Quezel et Santa, 1962)** et le sud-est européen (Espagne et Portugal) **(Munoz-Vallés et al., 2013)**.

Parmi les travaux déjà réalisés par notre laboratoire sur cette espèce, **(Djabeur et al., 2007)** sur son aspect écologique, **(Benmiloud-Mahieddine et al., 2011 ; Belmokhtar et Kaid-Harche, 2012)** sur leur diversité génétique et biochimique, **(Selami et al., 2014 ; Hannane et al., 2014)** sur leur association symbiotique.

Retama monosperma est une plante toxique, utilisé à petites doses comme purgatif, antihelminthique, vermifuge, désinfectante et abortive **(Bellakhdar, 1997 ; Benrahmoune, 2003 ; Ouarghidi et al., 2013)**.

Toutefois, des études sur les activités biologiques montrent in vitro une activité anticancéreuse potentielle contre des lignées cellulaires du cancer cervical (**Merghoub et al., 2011; Benbacer et al., 2012**) anti-inflammatoire in vivo (**Gonzalez-Mauraza et al., 2013**) et anti-leucémique (**Belayachi et al., 2014**). Néanmoins, leur capacité antioxydante n'est pas encore connue, ce qui nous a motivés à étudier les propriétés antioxydantes de cette espèce.

Ce travail de recherche, réalisé au sein de laboratoire des productions et valorisations végétales et microbiennes s'inscrit dans les nouvelles thématiques de ce laboratoire, portant sur l'extraction et l'analyse de molécules bioactives incorporables dans des formulations cosmétiques et/ou thérapeutiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité antioxydante in vitro des graines, des fleurs et des tiges de *Retama monosperma* et de quantifier les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et les tannins condensés afin d'évaluer les coefficients de corrélation entre l'activité anti-oxydante et les trois types de composés.

La première partie de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique de *Retama monosperma*, sa description botanique avec une présentation des diverses molécules qu'elle contient. Le métabolisme secondaire. Les radicaux libres et les molécules antioxydantes.

La deuxième partie décrit la partie pratique, et elle est répartie en deux chapitres ;

- Chapitre matériel et méthodes qui présente les méthodes de caractérisation phytochimique, la technique d'extraction, les dosages spectrophotométriques, les tests antioxydants, et la technique d'analyse par chromatographie sur couche mince.

- Chapitre résultats et discussion qui commence par une présentation des résultats suivie par une discussion générale.

.

Partie bibliographique :

Chapitre I : *Retama monosperma*.

Chapitre II : Le métabolisme secondaire.

Chapitre III : Radicaux libres et molécules antioxydantes.

Chapitre I :

Retama monosperma

1. Position taxonomique de *Retama monosperma*

La famille des Fabacées ou Légumineuses, appartient à l'ordre des Fabales, doit son nom à l'ancien genre *Faba*, donné à la fève. Ce sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou des lianes. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont et Guignard, 2012).

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 (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), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois et leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Les espèces de la famille des Fabacées possèdent des feuilles généralement alternes, trifoliolées et stipulées. Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées avec des fleurs hermaphrodites et zygomorphes. L'androcée compte dix étamines, et 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 est appelé gousse ou légume qui s'ouvre à maturité. C'est une famille cosmopolite. Comptant 620 genres et 19500 espèces, répandues dans le monde entier, regroupées en 3 sous-familles : *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Faboideae*. (Dupont et Guignard, 2012 ; Botineau, 2010)

Les *Faboideae* ou Papilionacées avec les 429 genres et 12615 espèces, classées en 31 tribus, est considéré comme la plus grande des trois sous-familles appartenant aux *Fabaceae* (Botineau, 2010). Très reconnaissable à l'aspect de ses fleurs, à corolles dites " en papillon " (Dupont et Guignard, 2012) c'est à dire qu'elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon. Le pétale dorsal (appelé aussi vexillum ou plus couramment étendard),

recouvre les deux pétales latéraux ou ailes. Ces derniers recouvrent à leur tour, les deux pétales inférieurs, libres ou unis par leur bord interne sur une certaine longueur. Ces deux pièces inférieures constituent ensemble la carène qui renferme l'androcée et le gynécée.

L'androcée compte dix étamines qui peuvent être libres ou soudées. Elles s'unissent le plus souvent par leurs filets, formant un tube autour du carpelle (genre *Sophora*). Elles peuvent aussi être soudées entre elles et l'androcée est alors monadelphé (genre *Cytisus*). L'androcée est diadelphé quand neuf étamines sont unies en un tube ouvert en arrière et que l'étamine postérieure reste libre (genre *Vicia* et genre *Derris*).

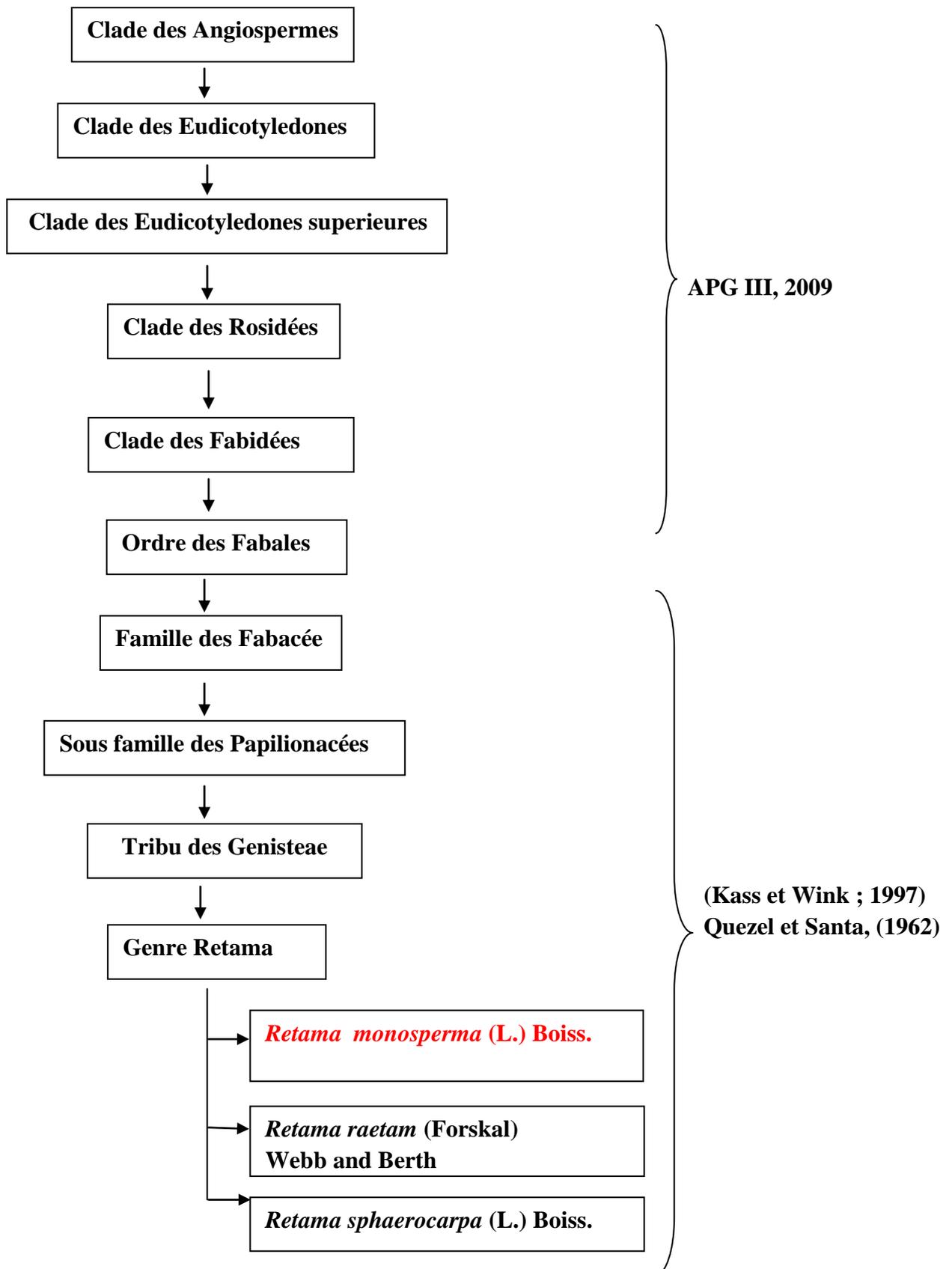
Du point de vue phylogénétique les Papilionacées peuvent être divisées en 7 clades selon les relations phylogénétiques établies à partir du gène plastidique *matK*. Parmi ces clades existe le clade des Génistoïdes, dans lequel on retrouve des plantes contenant des alcaloïdes quinolizidiniques, composés de défense contre les herbivores, comme les genêts (*Genista*) et les lupins (*Lupinus*) (Wojciechowski *et al.*, 2004)

La tribu des Genisteeae comprend 25 genres avec 619 espèces (Cardoso *et al.*, 2013), et sa diversité est centrée dans la région méditerranéenne et dans les Îles Canaries, elle possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées et de dominer de nombreuses communautés végétales (Cristofolini, 1997).

Le genre *Retama* appelé communément R'tem, appartient à la tribu des Genisteeae, endémique des régions du bassin méditerranéen, représenté en Algérie par trois espèces ligneuses : *R. monosperma* qui pousse sur le littoral et stabilise les dunes côtières, représentée par la sous espèce Bovei (Spach.) Maire ; *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* qui s'étendent sur les aires arides et sahariennes où elles fixent les sables dunaires grâce à leur système racinaire à la fois horizontal et vertical, de ce fait elles jouent un rôle dans la lutte contre la désertification (Quezel et Santa, 1962).

Une quatrième espèce *Retama dasycarpa* (Coss) signalée uniquement au Maroc caractérisé par sa gousse laineuse et tomenteuse (Maire, 1987).

Le genre *Retama* et leurs espèces suivent le taxon suivant :



Nom vernaculaire : R'tem

2. Les paramètres de distinction entre les trois espèces du genre *Retama*

Au stade végétatif, ces trois espèces ne présentent pas de différence morphologique importante.

Au stade reproducteur, elles se distinguent aux moments de floraison et de fructification. Les principaux paramètres de distinction entre les trois espèces sont récapitulés dans le tableau 1 (Belmokhtar, 2005)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des paramètres de distinction entre les trois espèces du genre *Retama* (*R. monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa*).

	<i>R. monosperma</i>	<i>R. raetam</i>	<i>R. sphaerocarpa</i>
Tige	Arbuste de 2 à 4 m de haut, à port retombant et des rameaux flexibles qui s'abaissent avec des tiges grises vertes, au reflet argenté.	Arbre ou arbuste de 1 à 3,5 m de haut avec des rameaux dressés et des tiges grises vertes, au reflet argenté.	Arbuste de 1 à 2 m de haut à rameaux flexibles avec des tiges toujours vertes.
	Rameaux et tiges fortement sillonnés. Portent des feuilles très réduites durant toute l'année.	Rameaux et tiges peu sillonnés. Aphylle presque durant toute l'année.	Rameaux et tiges non creusés de sillons. Aphylle presque durant toute l'année.
Fleur	Couleur blanche de 14 à 15mm. Etendard légèrement veiné de pourpre, plus court que la carène. Très odorante. Floraison de janvier Jusqu'a mai.	Couleur blanche de 8 à 10 mm. Etendard légèrement veiné de pourpre, égalant la carène ou légèrement plus long. Peu odorante. Floraison entre avril et mai.	Couleur jaune Très petite de 5 à 6 mm. Peu odorante. Début de floraison en mi-juin. Perd facilement leurs fleurs.

Tableau 1 (suite) : Tableau récapitulatif des paramètres de distinction entre les trois espèces du genre *Retama* (*R. monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa*).

	<i>R. monosperma</i>	<i>R. raetam</i>	<i>R. sphaerocarpa</i>
Gousse	Couleur jaune paille, ovoïde avec une extrémité aigue, structure ventrale Dilatée. 12 à 15mm de long	Couleur jaune paille de forme ovoïde aigue non dilatée sur structure ventrale. 8mm à 15mm de long	De couleur jaune brun, Globuleuse. 7 à 8 mm de long
Graine	Couleur marron ou vert olive. 5mm de long. 1 à 4 graines par gousse.	Couleur marron, jaune. 3 à 6 mm de long. 1 à 3 graines par gousse.	Couleur noire, verte olive. 4 à 5mm de long. graines par gousse.
Répartition	Dunes littorales. Oran (Cap falcon , Genet, Kristel et Bousfer). Mostaganem (Sidi khatab, El-mactââ) Ain timouchent (Terga)	Haut plateaux et Atlas saharien. Ain es-safra. (sfessefa, tiout). Bayadh.(chellala, Bougtob et khaiter). Djelfa. Naâma. Ghardaia (Metlili) et Laghouat (Aflou).	Haut plateaux et Atlas saharien. Uniquement dans les lits des oueds. Ain es-safra (Oued benhandjir, Oued chellala, Sidi bendhan). Laghouat (Aflou), Djelfa, Bayedh(Oued es-sefi), et une population qui s'étend de Bouira jusqu'à Borj bouriridj en passant par les village de Beni mensour, Biban elhadid et Elmahri.
Rôle	Fixation des dunes littorales.	Fixation des dunes sahariennes.	Fixation des dunes sahariennes.

3. Description morphologique de *Retama monosperma* L :

C'est un arbuste de 2 à 4 m de haut (Figure. 1), pourvu de nombreux rameaux jonciformes et soyeux, souples, d'un vert argenté à gris argenté. Les feuilles sont très caduques, les inférieures sont trifoliolées, les supérieures sont simples, linéaires-lancéolées qui ne demeurent que quelques jours.

L'inflorescence est une grappe qui porte de 3 à 15 fleurs blanches de 14 - 15 mm (Figure. 2) dont chacune contient dix étamines monadelphes, elle présente un calice bilabié, petit, à lèvre supérieure profondément bidentée, pétales à onglets plus ou moins soudés au tube staminal.

Le fruit est une gousse indéhiscente (Figure. 3) acuminée et velue à suture ventrale dilatée contenant, une graine lisse réniforme, de couleur ocre jaune (Quezel et Santa, 1962). Elle peut produire de 335 à 2800 de fruits par m² et par pied, de mai à septembre (Munoz-Vallés et al., 2013). L'expansion rapide de l'espèce a été améliorée principalement par une amélioration du taux de germination des semences de 13% à 24% qui se produit après le passage de graines dans l'intestin de lapin sauvage (*Oryctolagus cuniculus*) (Dellafiore et al., 2010).

Le système racinaire est bien développé, peut dépasser 25m de profondeur en direction des eaux profondes (Haase et al., 1996).

Retama monosperma est une espèce nodulante, capable de produire des associations symbiotiques avec des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Ces nodosités sont de type indéterminé (Selami et al., 2014).

4. Répartition géographique :

Retama monosperma affectionne les sols pauvres, sablonneux à forte salinité, elle est considérée comme native en Algérie (Djabeur et al., 2007), au Maroc, et en Espagne (Munoz-Vallés et al., 2013) en Égypte et au Portugal (ElShazly et al., 1996). En outre, l'espèce est actuellement considérée comme une plante introduite et envahissante dans d'autres pays à travers le monde comme les USA en Californie (Rejmanek et Randall, 1994 ; Randall, 1997) et en Australie (Randall, 2007).

En Algérie elle occupe les dunes côtières.



Figure 1 : Photographie d'un pied de *Retama monosperma* en pleine inflorescence poussant dans les conditions naturelles, Station du Cap falcon (Oran), 2015.



Figure 3: Photographie de fruits du *Retama monosperma*,
Gr : Graine, **Go:** Gousse.

Remarquer que le fruit de *R. monosperma* porte deux graines.

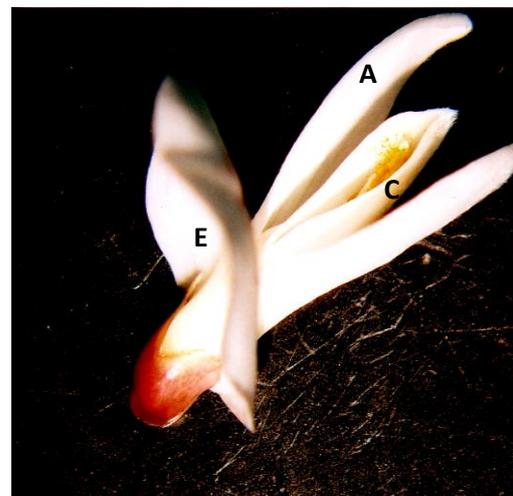


Figure 2: Photographie d'une Fleur de *Retama monosperma* 1.70 mm

E : Etendard, **A :** Ailes, **C :** Carène.

5. Utilisation en phytothérapie traditionnelle :

En médecine traditionnelle, *Retama monosperma* (L.) Boiss est utilisée comme vomitif, purgatif, vermifuge, cicatrisant, vulnéraire, sédatif (**Bellakhdar, 1997**), antihelminthique et antiseptique (**Benrahmoune, 2003**).

La toxicité des espèces du genre *Retama* est également connue depuis longtemps. Des intoxications humaines ont été observées lors de l'emploi de *Retama monosperma* par voie interne, comme abortif (**Bellakhdar, 1997**). Chez les animaux, la toxicité se manifeste, suite à une ingestion excessive, par une rétention urinaire grave et par des avortements ; ces propriétés sont principalement attribuées aux alcaloïdes quinolizidiniques qui caractérisent la famille des Fabacées en général et le genre *Retama* en particulier (**Bellakhdar, 1997**).

6. composition chimique et activités biologiques

De nombreux travaux ont pu démontrer la richesse de *Retama monosperma* en alcaloïdes ; **Nauroy (1954)** signale qu'elle est utilisée comme abortive. Cet auteur a pu constater qu'elle contenait en abondance des alcaloïdes, principalement la rétamine. Ensuite, **Vazquez et Ribas, (1955)** ont isolé un certain nombre d'alcaloïdes : rétamine, anagyryne, cytosine, lupanine et sphérocarpine.

Plusieurs alcaloïdes de *R. monosperma* ont été identifiés par **Touati et al., (1996)** ; 15 quinolizidines et 03 dipiperidines, en particulier la présence de la sparteine, l'isosparteine, l'oxosparteine, la lupanine, 5,6-dehydrolupanine, l'anagyryne, la cytosine, le N-méthylcytosine, et l'ammodendrine,

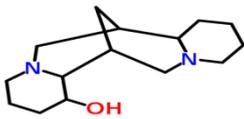
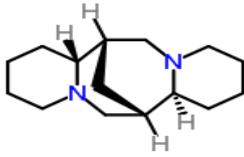
L'analyse comparée des alcaloïdes des tiges, feuilles, et graines de *R. monosperma* du Maroc par CG/MS montre que le contenu en alcaloïdes varie d'un organe à un autre, dont la cytosine, la sparteine, l'ammodendrine et l'anagyryne sont les composés majoritaires. (**Fdil et al., 2012**).

La rétamine, la cytosine et la sparteine sont aussi déterminées et en quantité considérable dans les graines et les tiges de *Retama sphaerocarpa* de la station de Bejai (Algérie) (**Touati et al., 2015**).

Une étude comparative sur les alcaloïdes des trois espèces *R.monosperma* (Portugal), *R raetam* (Égypte) et *R. sphaerocarpa* (Portugal), montre une spécificité très élevée en matière de stockage des alcaloïdes. Les tiges contiennent principalement de la sparteine et la retamine, tandis que dans les fleurs et les gousses c'est la lupanine, la retamine le N-methylcytesine et la cytisine qui sont très abondantes, alors que les graines renferment principalement la cytisine (ElShazly *et al.*, 1996).

Les trois alcaloïdes majoritaires et communs entre les trois espèces du genre *Retama* sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Formule et structure chimique des alcaloïdes majoritaires et communs entre les trois espèces du genre *Retama*.

Nom de la molécule	Formule chimique	Structure chimique
Cytisine	$C_{11}H_{14}N_2O$	
Retamine	$C_{15}H_{26}N_2O$	
Sparteine	$C_{15}H_{26}N_2$	

Récemment, *Retama monosperma* commence à trouver sa place dans les laboratoires de recherche en vue d'étudier ces activités biologiques. (Merghoub *et al.*, 2011) montrent que *Retama monosperma* L du Maroc, présente une activité in vitro anticancéreuse potentielle contre deux lignées cellulaires du cancer cervical (SiHa et HeLa) par l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose. Ainsi, l'analyse de cet extrait par CG / SM a révélé la présence de cinq alcaloïdes de quinolizidine connus : la sparteine (10,97%), la cytisine de méthyle L (9.11%), 17- oxosparteine (3,49%), lupanine (0,93%) et anagryrine (39,63%).

L'expérience réalisée sur les intestins des rats males de la lignée Wistars montre que l'extrait de *Retama monosperma L.* de l'Espagne, présente des activités anti-inflammatoires très intéressantes (**González-Mauraza *et al* 2014**).

L'extrait hexanique des feuilles de *Retama monosperma* du Maroc (Rabat), présente des effets antileucémiques importants par un arrêt du cycle cellulaire, l'analyse de cet extrait par CG/MS permet l'identification de 43 molécules, dont les composés bioactifs dominants étaient : l'acide α -linoléique (13,97%), le Stigmastérol (10,34%), le β -sitosteryl (7,92%) et le campestérol (11,09%) (**Belayachi *et al* 2014**).

Chapitre II : Le métabolisme secondaire

1. introduction :

Les plantes sont continuellement sujettes à des interactions environnementales, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. En ce qui concerne les interactions abiotiques, le plus souvent elles ont des causes climatiques (températures, stress hydriques, photopériodes...), mais elles peuvent également être liées aux conditions physico-chimiques du sol sur lequel les plantes s'établissent. Pour y faire face, les plantes ont dû s'adapter aux diverses contraintes du milieu et, elles doivent développer un système de réponse. Ce système est à la base de la survie de la plante et fait intervenir notamment les métabolites secondaires. Ces métabolites sont décrits comme étant des composés présents de façon limitée dans les groupes taxonomiques. Ils ne sont pas nécessaires à la vie de la cellule (ou de l'organisme), mais jouent un rôle dans l'interaction de la cellule avec son environnement en assurant sa survie. Les plantes non seulement synthétisent les composés de la défense, mais aussi elles les stockent avec des concentrations élevées dans la vacuole (dans le cas des composés hydrophiles), et dans des canaux, trichomes, laticifères ou cuticule (pour les composés lipophiles) (**Wink , 2003**).

Cette gamme de composés est très répandue chez les végétaux et constitue, entre autres, des moyens de lutte contre des concurrents écologiques (compétition végétale pour la lumière, les ressources ou l'espace, allélopathie), contre les micro-organismes (champignons ou bactéries) des prédateurs (production de substances toxiques ou inappétantes contre les herbivores). Le règne végétal compte près de 100 000 métabolites secondaires, décrits jusqu'à présent, pratiquement tous synthétisés en réponse à des contraintes environnementales (**Kliebenstein, 2004**). Les métabolites secondaires sont synthétisés à partir d'intermédiaires du métabolisme primaire (Figure. 4) et il existe principalement trois grandes familles de métabolites secondaires qui sont représentées par les terpènes, les alcaloïdes et les molécules dérivées de composés phénoliques.

Les molécules phytochimiques provenant des voies biosynthétiques des métabolites secondaires comprennent, non seulement les composés ayant une activité antibiotique de large spectre, mais aussi des antioxydants puissants capables de lutter contre le stress oxydatif (**Iriti et Faoro, 2004**)

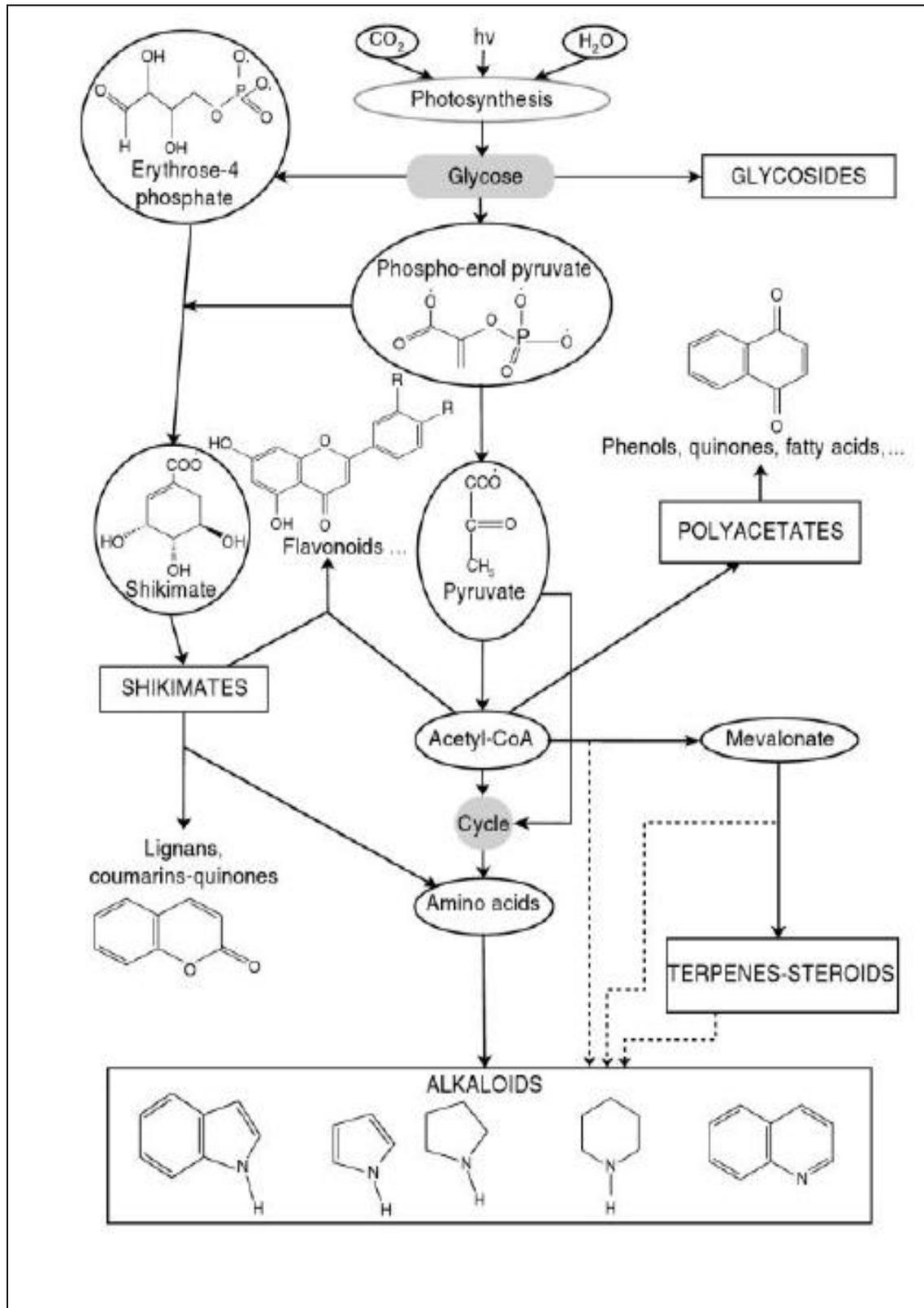


Figure. 4 : Origines des principaux métabolites secondaires par rapport aux voies métaboliques de base (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

2) Les terpènes

2.1) Définition :

La famille des terpènes comprend des hormones (gibbérellines, acide abscissique), des pigments photosynthétiques (carotènes, xanthophylles), des constituants membranaires (stéroïdes), des vitamines (A, D, E et K), et des huiles essentielles. (Iriti et Faoro, 2004)

Les terpènes sont des substances généralement lipophiles, dérivées d'unités isopréniques avec une formule brute générale $(C_5H_8)_n$. La condensation de ces unités aboutit à la formation de terpènes de tailles différentes. Selon le nombre d'unités, on distingue les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40}) et les polyterpènes ($C_{>40}$). (Tableau. 3) (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008)

Tableau. 3 : Classification des terpenoïdes. (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008)

Unité isoprénique	C_n	Classe
1	5	Hemiterpenes
2	10	Monoterpenes
3	15	Sesquiterpenes
4	20	Diterpenes
5	25	Sesterterpenes
6	30	Triterpenes
8	40	Tetraterpenes
> 8	> 40	Polyterpenes

2.2) La biosynthèse des tetrépénoïdes dans le règne végétal par la voie du mévalonate :

L'Acétyl-coenzyme A (CoA) représente le précurseur pour la biosynthèse des isoprénoides.

Deux molécules d'acétyl-CoA réagissent ensemble en donnant la naissance à l'acétoacétyl-CoA, lequel en fixant une troisième molécule d'acétyl-CoA forme le β -hydroxy β -méthylglutaryl-CoA (HMG)-CoA. La même enzyme, la HMG-CoA synthase, catalyse les deux réactions. Ensuite, la réduction en alcool du carboxyle combiné au CoA conduit à la formation de MVA (acide mévalonique) par l'intermédiaire de l'HMG-CoA réductase. En éliminant une molécule de CO_2 par une mévalonate diphosphate décarboxylase, le MVA est converti en isopentenyl pyrophosphate (IPP) ou isoprène actif. C'est le IPP qui constitue l'unité isoprénique d'enchaînement, et il s'isomérisé en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Chappell, 1995), voir figure 5.

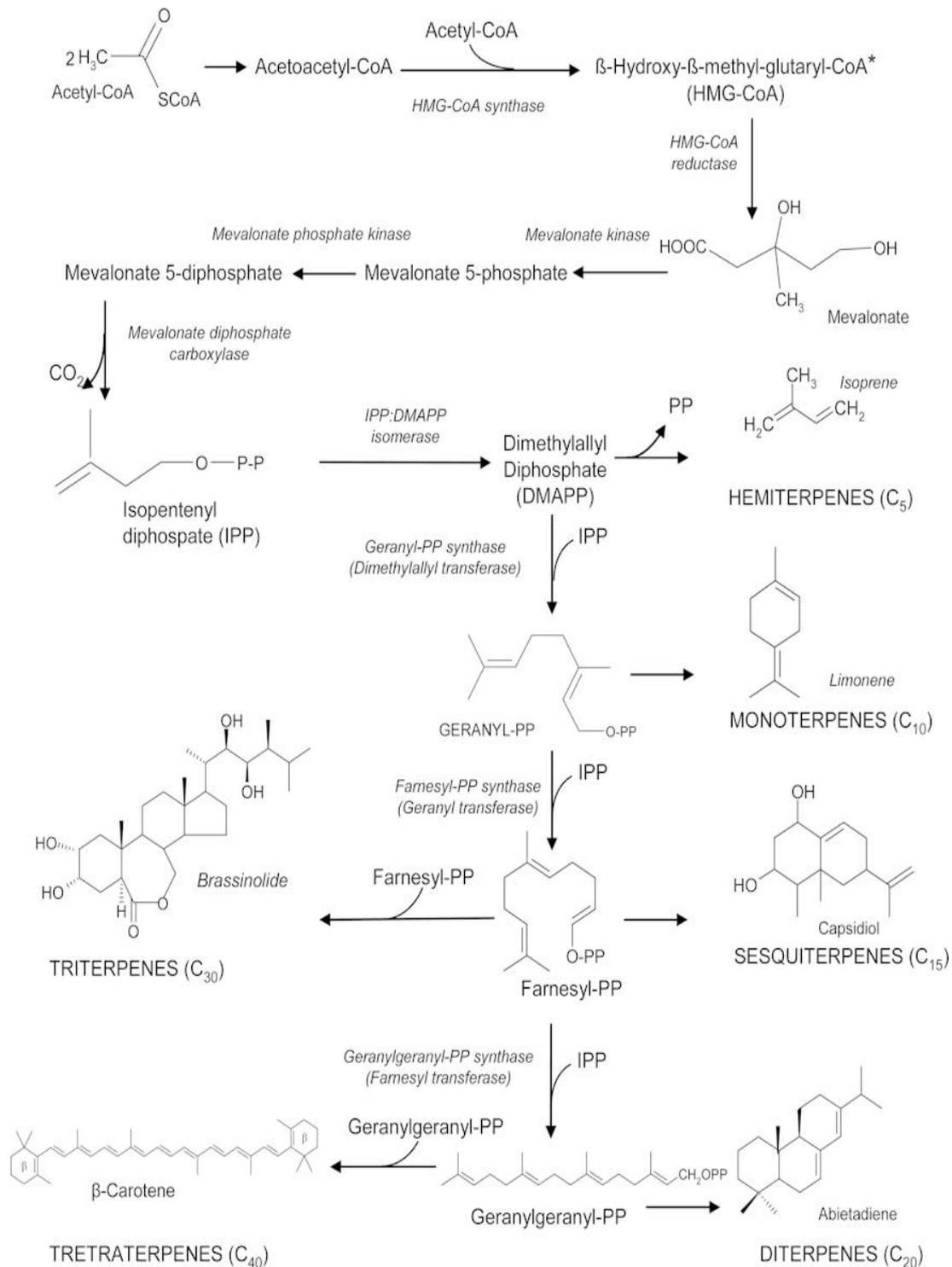


Figure. 5 : La voie de biosynthèse des terpénoïdes à partir de acetyl-CoA

(Iriti et Faoro, 2009)

Les terpènes sont des produits d'un enchaînement de leur unité de base (IPP = isopentényl pyrophosphate et son isomère le diméthylalyl-diphosphate) Ces deux composés sont associés en géranyl-diphosphate (précurseur des monoterpènes), en farnésyl diphosphate (précurseur

des sesquiterpènes et des triterpènes) et en geranyl-geranyl diphosphate (précurseur des diterpènes et des tetraterpènes) par des isoprényltransférases. (Figure 6) (**Wendt et Schulz, 1998**).

2.3) Sites de biosynthèse :

Les principales structures cellulaires produisant les tetrpénoïdes sont soit des poils sécréteurs stipités (Pelargonium) ou sessiles (Labiées), soit des poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées), soit des canaux sécréteurs (Térébinthacées, Ombellifères) soit des idioblastes, des trichomes, des laticifères...., etc. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (**Fahn, 1988**).

Les systèmes sécréteurs en phase d'activité appartiennent à des tissus jeunes (**Charon et al., 1990**). Leur formation est toujours extrêmement précoce, transitoire (**Bernard-Dagan et al., 1979**), leur existence parfois fugace (trichomes caducs). Le plus souvent, ils sont rapidement l'objet d'un processus de dégénérescence non réversible (**Carde, 1976**).

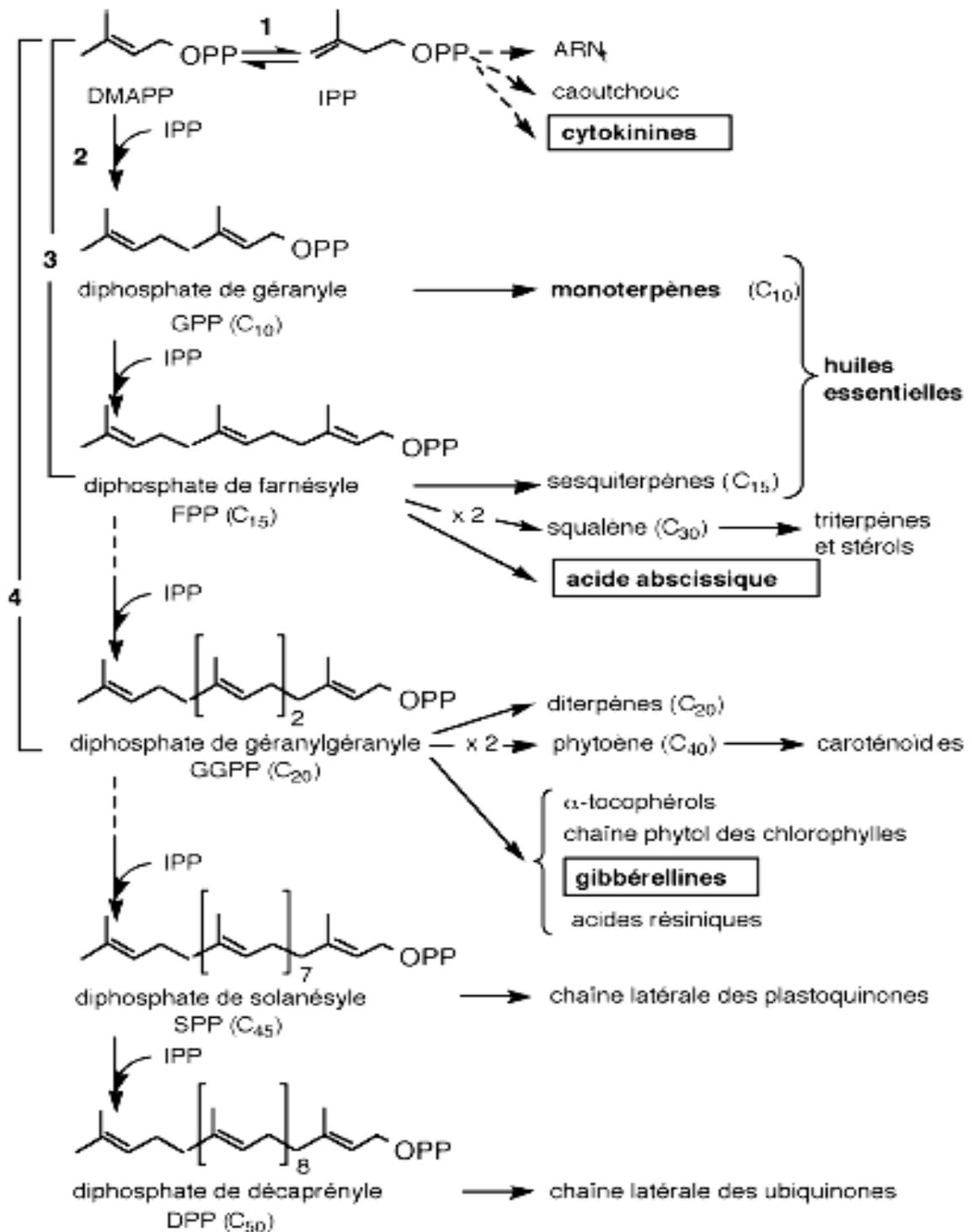


Figure 6 : Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP) (Lamarti *et al.*, 1994).

1 : isopentényl diphosphate isomérase ; **2** : géranyl diphosphate synthétase

3 : farnésyl diphosphate synthétase ; **4** : géranylgéranyl diphosphate synthétase

3) Les alcaloïdes :

3.1) Définition :

Le terme alcaloïde, de *Alkali-like*, a été proposé par le pharmacien W. Meissner en 1806 en raison du caractère alcalin plus ou moins prononcé des membres de cette famille de composés. Le terme alcaloïde comprend maintenant toutes les molécules naturelles alcalines extraites de plantes dont la structure contient au moins un atome d'azote (**Harborne et Herbert, 1995**)

Sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (**Bhat et al., 2005**).

Les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique, car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicament ou comme poisons.

La classification des alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale.

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique (Tableau.4) (**Neves-Muniz, 2006**).

Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes.

La nicotine empêche la croissance des larves du tabac. Le composé pur est également appliqué comme insecticide efficace dans des serres. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Par ailleurs, un trait quasi caractéristique des alcaloïdes est la présence d'activités biologiques au niveau du système nerveux.

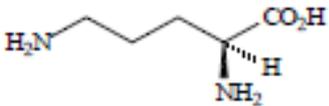
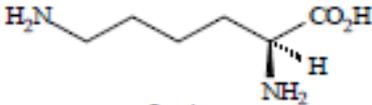
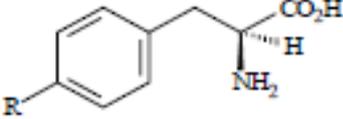
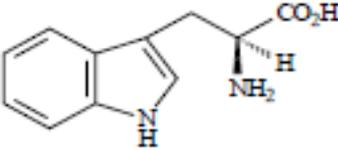
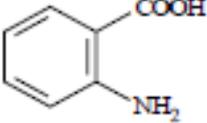
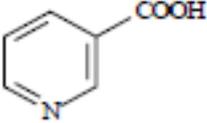
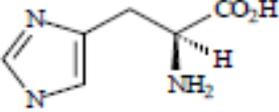
3.2) Sites de biosynthèse

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon les espèces, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits. Dans la pomme de terre, les tubercules comestibles ne contiennent pas d'alcaloïdes, tandis que les parties vertes contiennent la solanine toxique. La partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils sont synthétisés. Dans le tabac par

exemple, la nicotine est produite dans les racines mais transférée ensuite vers les feuilles où elle est stockée (Harborne et Herbert, 1995)

Tableau 4 : Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé.

(Neves-Muniz, 2006).

Acide aminé	Type d'alcaloïde
 <p>Ornithine</p>	Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes
 <p>Lysine</p>	Pipéridines, quinolizidines, indolizidines
 <p>R = H, Phénylalanine R = OH, Tyrosine</p>	Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines
 <p>Tryptophane</p>	Indoles
 <p>Acide anthranilique</p>	Quinoléines, quinazolines, acridines
 <p>Acide nicotinique</p>	Pyridines
 <p>Histidine</p>	Imidazoles
Via aminations	Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens

4) Les polyphénols :

Sous la désignation de composés phénoliques, on désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont largement distribués dans le règne végétal et sont des métabolites secondaires les plus abondants, avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connues, peuvent être une molécule simple, tels que des acides phénoliques ou des substances hautement polymérisées comme les tanins. (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**).

Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes. Les premiers critères de distinction entre ces classes concernent le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carboné, voir tableau 5.

Tableau 5 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

Nombre d'atome decarbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Catéchol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoïques	Acide gallique, acide salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Acide coumarique, acide caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthonés	Bellidifoline, mangocétine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangéol, Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3) ₂	Lignanés	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
N	(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

Les composés phénoliques végétaux sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou d'agression par des agents pathogènes, parasites et prédateurs, ainsi que de contribuer aux couleurs de plantes. Dans tous les cas, différents facteurs externes et internes sont fortement impliqués dans la régulation spatio-temporelle de l'expression du métabolisme phénolique (**Dixon et Paiva, 1995**), se traduisant par des différences qualitatives

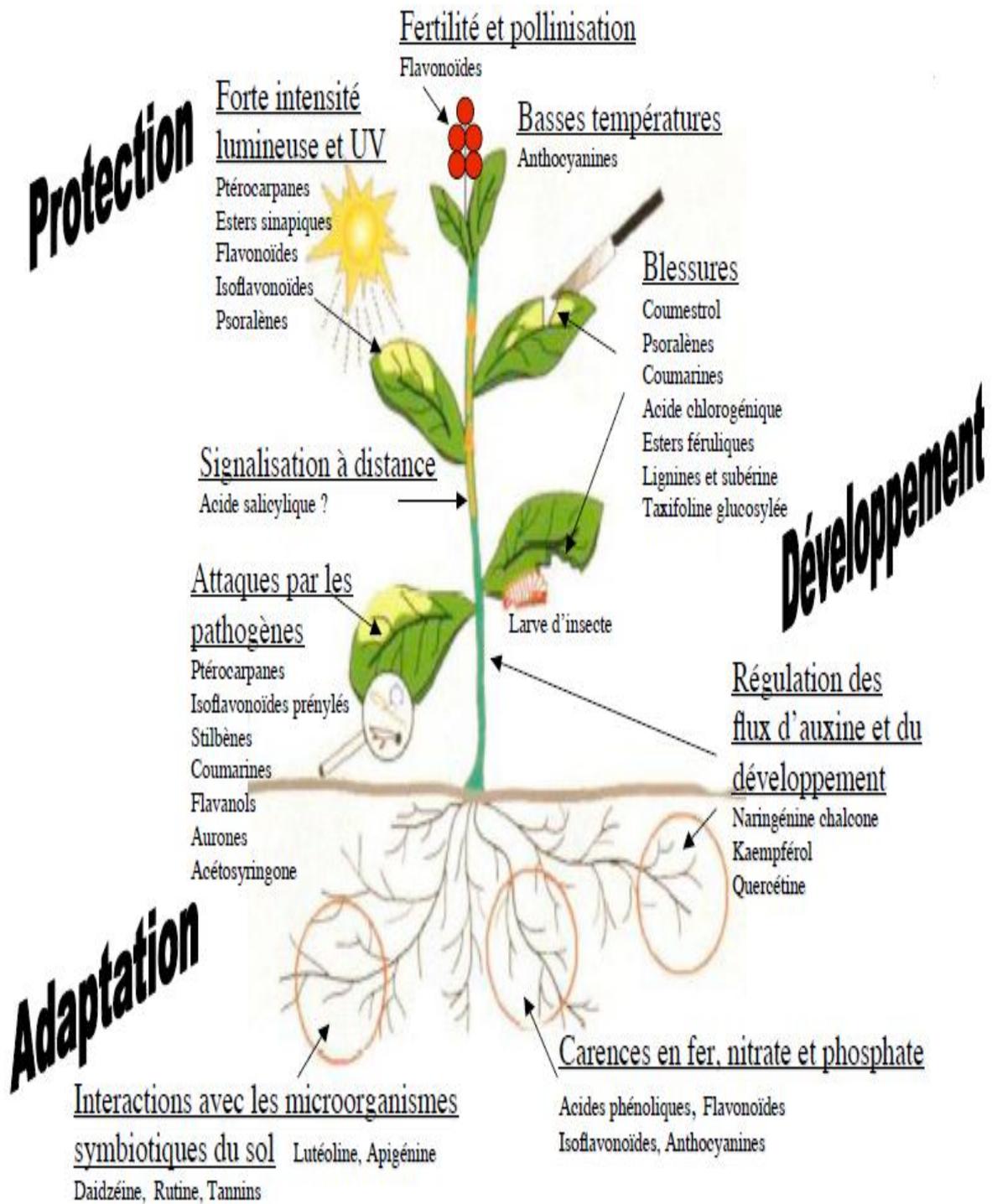


Figure 7: Quelques exemples de l'implication des composés phénoliques dans le développement de la plante et dans les interactions avec l'environnement

(Macheix *et al.*, 2005).

et quantitatives considérables entre les variétés, les tissus et les organes et selon les stades physiologiques. (Figure 7).

4.1) Biosynthèse des polyphénols :

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir de la voie de l'acide shikimique (**Macheix *et al.*, 2005**). La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont: la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique, voir figure 8.

4.1.1) Voie de l'acide shikimique :

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (**Dewick, 1995**). Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

4.1.2) Voie de l'acide malonique :

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Richter, 1993**).

Les catégories de polyphénols les plus courants sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans notre alimentation.

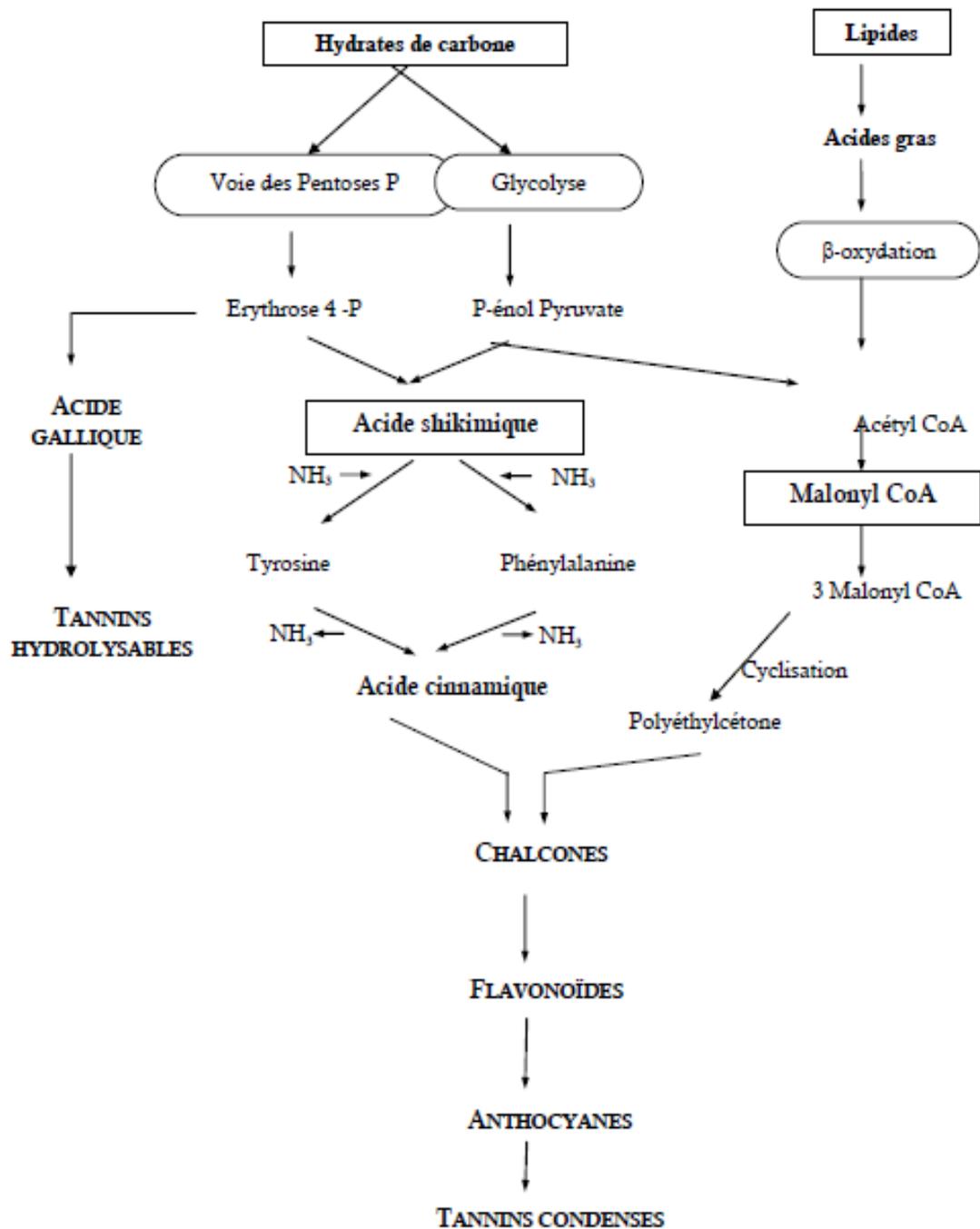


Figure 8 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.

(Macheix *et al.*, 2005)

4.2) Quelques classe polyphénoliques :

Les catégories de polyphénols les plus courants sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans notre alimentation.

4.2.1) Les flavonoïdes :

Flavonoïde (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui a son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. (De Rijke *et al.*, 2006) (Figure 9).

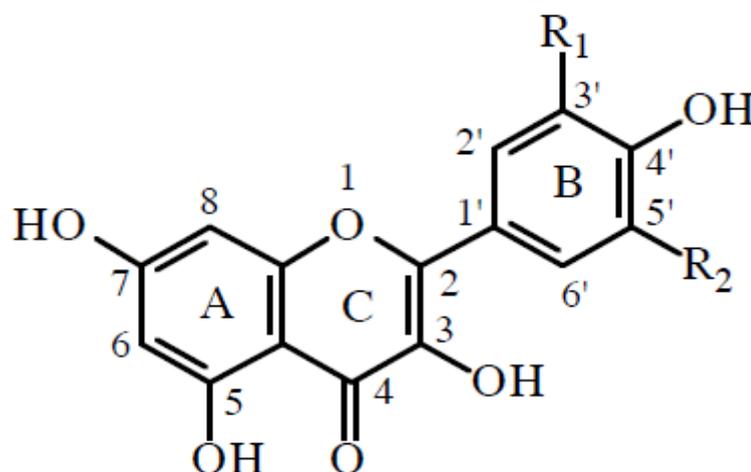


Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques). Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées, nous citerons les principales : flavones, flavonols, flavanones, flavanonol, flavane, flavanols, isoflavones et anthocyanes (Harborne, 1988). La figure 10 représente les structures chimiques de quelques flavonoïdes.

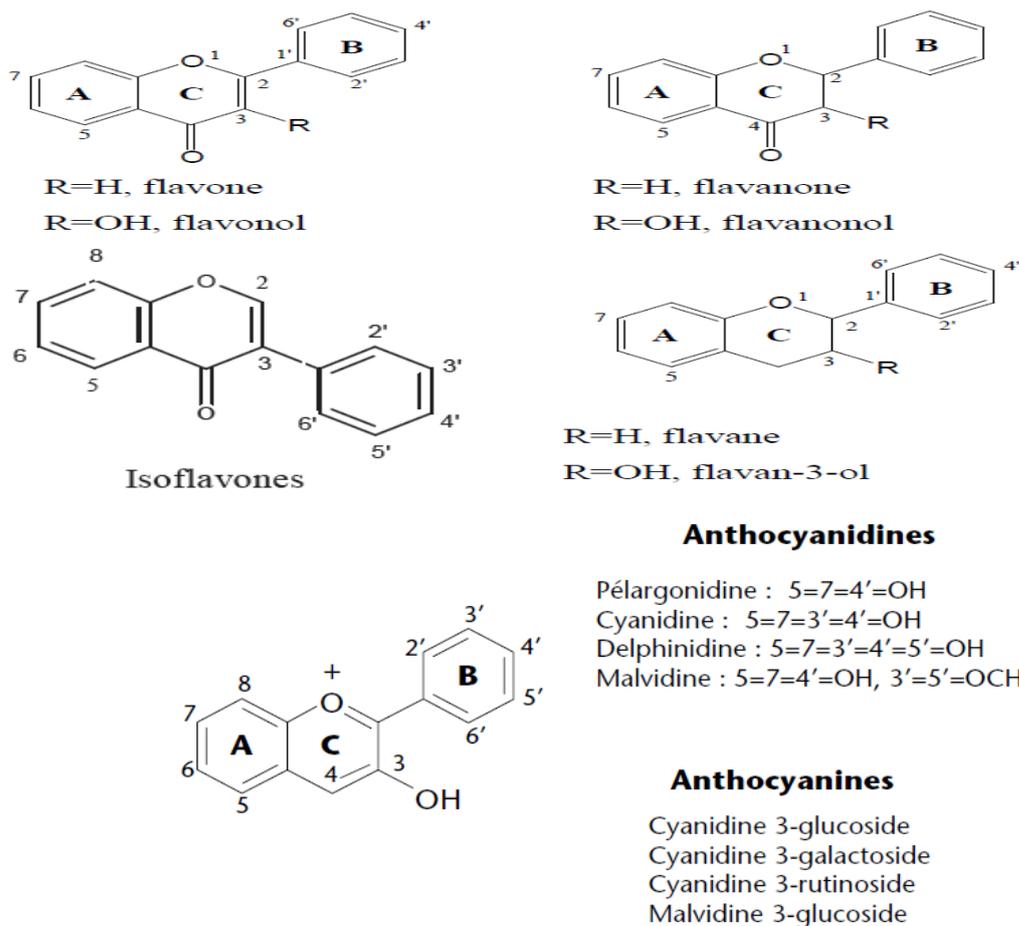
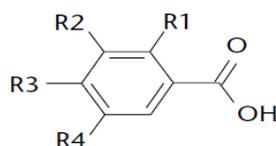


Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes issues du règne végétal (Laguerre *et al.*, 2007)

4.2.2) Les acides phénoliques :

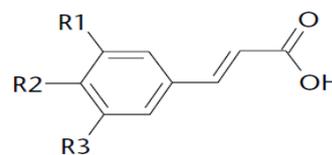
Peuvent être divisés en deux catégories (voir figure 11): les dérivés de l'acide benzoïque tel que l'acide gallique, et les dérivés de l'acide cinnamique tel que l'acide coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (Laguerre *et al.*, 2007).

Acides hydroxybenzoïques



R1=R2=R3=R4=H Acide benzoïque
R1=R4=H, R2=R3=OH Acide protocatéchique
R1=H, R2=R3=R4=OH Acide gallique
R1=OH, R2=R3=R4=H Acide salicylique
R1=R4=OH, R2=R3=H Acide gentisique

Acides hydroxycinnamiques



R1=R2=R3=H Acide cinnamique
R1=R3=H, R2=OH Acide *p*-coumarique
R1=R2=OH, R3=H Acide caféique
R1=OCH₃, R2=OH, R3=H Acide férulique
R1=R3=OCH₃, R2=OH Acide sinapique

Figure 11. Principaux acides phénoliques issus du règne végétal. (Laguerre *et al.*, 2007)

4.2.5) Les tanins :

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire fortement hydroxylés. On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

4.2.5.1) Les tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude. Ils libèrent ainsi une partie non phénolique (souvent du glucose ou l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit l'acide gallique (cas des gallotannins) soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (cas des tannins ellagiques) (Macheix *et al.*, 2005).

4.2.5.2) Les tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation des unités de flavan-3,4-diol. Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées proanthocyanidines. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C t soit par des ramifications grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (Macheix *et al.*, 2005).

Chapitre III :

Radicaux libres et molécules antioxydantes

1. Les radicaux libres

Dans la structure des atomes et des molécules, les électrons sont associés par paires, chaque paire se déplace dans une région définie de l'espace « une orbitale atomique ou moléculaire ».

Un radical libre est une espèce chimique qui contient un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend instable et très réactif; par conséquent, il peut réagir rapidement avec un autre composé, en essayant de capturer l'électron nécessaire pour gagner sa stabilité. Le plus simple des radicaux libres est un atome d'hydrogène, avec un proton et un électron unique (**Halliwell et Whiteman, 2004**).

Si l'instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne (**Rahman et Adcock, 2006**).

Les conditions mises en jeu pour donner des radicaux sont souvent drastiques : hautes températures, radiations ionisantes, ultraviolets. Ces substances peuvent peroxyder les lipides insaturés qui composent les structures membranaires et peuvent alors tuer la cellule. Le remplacement de la cellule oblige l'organisme à activer ses cellules-souches, ce qui augmente le risque de cancérisation. Ceci contribue aussi à un vieillissement accéléré de l'organisme, les cellules-souches ne pouvant éternellement se multiplier « limite de Hayflick ».

Les radicaux libres les plus importants dans le système biologique sont les espèces réactives de l'oxygène, ces derniers incluent non seulement les radicaux centrés sur l'oxygène comme le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) mais aussi certains dérivés de l'oxygène non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) tel que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux ($HOCl$), qui sont des agents oxydants et / ou sont facilement convertis en radicaux libres (Tableau 6). Un terme similaire, les espèces de l'azote réactif, devient également largement utilisé (**Halliwell, 2001**).

Tableau 6 : Les espèces chimiques réactives (Halliwell, 2001).

Les espèces réactives de l'oxygène	
Radicaux libres	Non radicalaires
Superoxide ($O_2^{\bullet-}$) Hydroxyl (OH^{\bullet}) Peroxyl (RO_2^{\bullet}) Alkoxy (RO^{\bullet}) Hydroperoxyl (HO_2^{\bullet})	le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) l'oxygène singulet (1O_2) l'acide hypochloreux ($HOCl$) Ozone (O_3) l'acide hypobromeux ($HOBr$)
Les espèces réactives de l'azote	
Radicaux	Non radicalaires
le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) Le dioxyde d'azote (NO_2^{\bullet})	L'acide nitreux (HNO_2) Le cation nitrosyle (NO^+) L'anion nitroxyle (NO^-) Peroxynitrite ($ONOO^-$) l'acide peroxynitreux ($ONOOH$) Peroxynitrites alkyle ($ROONO$)

2. Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène *in vivo* :

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau. (Figure. 14)



Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose. Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques. En effet, les cellules convertissent 2 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène. (Ferradini, 1986).

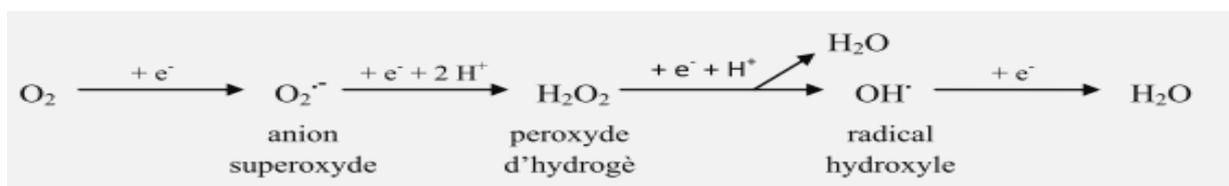


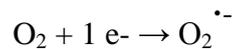
Figure 14 : Intermédiaires réduits de l'oxygène.

Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène. La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur

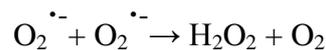
O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et OH^{\bullet} .

Cette réaction (réduction tétravalente) est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale. (**Han et al., 2003**).

Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser "fuir" une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subissent une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron), conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$, au niveau de l'ubiquinone ou coenzyme Q (**Turrens et al, 1985**).



Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation :

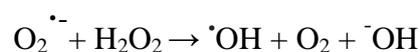


Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi formé n'est pas lui-même un radical libre mais une molécule ayant tous ses électrons périphériques appariés. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathions peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol).

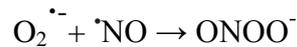
La majeure partie de la toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} " réaction de Fenton " ou Cu^+ (**Wardman et Candeias, 1996**). Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques.



En réalité, la toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte. En effet, en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, les radicaux $O_2^{\bullet -}$ peuvent donner naissance à des radicaux $\cdot OH$ selon la réaction de Haber Weiss :



Ou bien encore, en réagissant avec des radicaux $\cdot\text{NO}$ (monoxyde d'azote), conduire à l'apparition de peroxytrinites :



Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs des espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

3. Les antioxydants :

Une molécule antioxydante est définie, comme une substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative (**Halliwell, 1991**).

Pour réguler ces réactions d'oxydation, l'organisme a ses propres systèmes de défense antioxydante. Parmi eux, les systèmes enzymatiques, notamment les superoxydes dismutases, les catalases et les glutathions peroxydases, sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques regroupent quant à eux le glutathion, l'acide urique, le coenzyme Q10 et l'acide lipoïque. En outre, plusieurs études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes apportée par l'alimentation, dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant (**Frankel et al., 1993 ; Hertog et al., 1993**). Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de composés phénoliques, des vitamines (tel l'acide ascorbique et l' α -tocophérol) et des caroténoïdes.

3.1. Les antioxydants enzymatiques

Les trois systèmes principaux de défense enzymatique impliquent les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathions peroxydases.

3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

C'est une métalloprotéine, ubiquitaire chez les eucaryotes, elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, neutres et moins toxiques (voir la figure.15) (**Jiang, 2002**).

Il existe deux types de SOD selon la nature métallique de leur cofacteur : une SOD cytoplasmatique Cu et Zn dépendante et la SOD mitochondriale Mn dépendante. C'est la découverte de ces deux enzymes dans les cellules qui a permis de démontrer pour la première fois l'existence de radicaux libres dans les organismes vivants, phénomène supposé totalement impossible par les chimistes du fait de leur danger potentiel. Ainsi, c'est en démontrant la réalité de puissants systèmes antioxydants enzymatiques endogènes que McCord et Fridovitch ont mis en évidence pour la première fois l'importance du concept du stress oxydant (McCord et Fridovitch, 1970).

3.1.2. Les catalases

Ce sont des enzymes présentes dans les peroxysomes des cellules végétales et animales. Catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (voir la figure.15) (Valko ; 2006)

3.1.3. La glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (voir figure.15) (Halliwell, 2001).

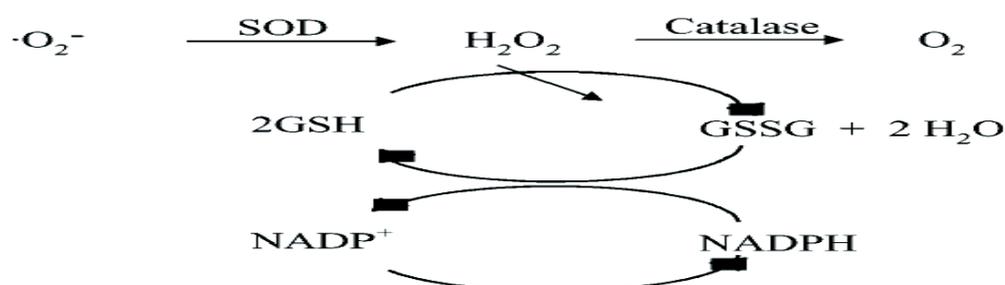
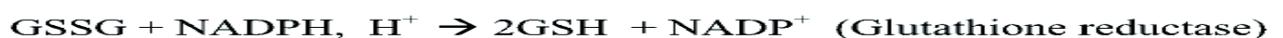


Figure 15 : Les enzymes antioxydantes et leurs mécanismes d'action.

3.2. Les antioxydants non enzymatiques

3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques endogènes:

Parmi ces antioxydants, on peut citer le glutathion (GSH) qui est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine (Figure.16). Le glutathion est très abondant dans le cytosol, dans les noyaux et dans les mitochondries, sa forme oxydée est GSSG, glutathion disulfure. (Masella *et al.*, 2005)

La forme réduite représentant environ 98 % du glutathion total. Le GSH participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaires grâce à sa fonction sulfhydryle (-SH) à l'origine d'une grande réactivité et d'un puissant pouvoir réducteur. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji *et al.*, 1992).

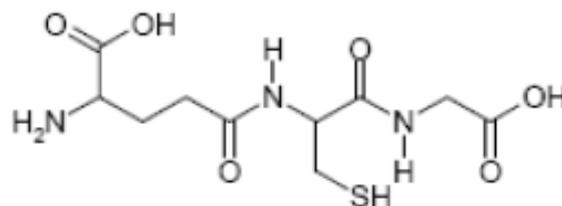
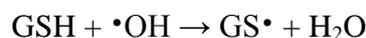


Figure.16 : Structure de la glutathion.

La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H) qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles (Karoui *et al.*, 1996).



Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone $\text{R}\cdot$:

$$\text{GSH} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{GS}\cdot + \text{RH}$$

Les Thiyles radicaux générés peuvent se dimériser pour former le produit non radicalaire, le glutathion oxydé (GSSG) (Hwang *et al.*, 1992):



D'autres antioxydants non enzymatiques endogènes dont leur rôle est aussi important, notamment la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q10 et l'acide lipoïque.

3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques exogènes

Un certain nombre de substances d'origine alimentaire s'opposent à la propagation des radicaux libres, très souvent en formant à partir d'un radical très réactif un autre radical beaucoup moins réactif. Elles sont capables de neutraliser un seul radical libre par molécule : on les appelle pour cela des piègeurs stoechiométriques. Ils n'agissent qu'à des concentrations élevées et ne jouent qu'un rôle négligeable par rapport aux enzymes précédentes. Certains protecteurs stoechiométriques sont régénérables et se comportent comme des agents presque catalytiques, capables d'éliminer de nombreux radicaux nocifs.

3.2.2.1. La vitamine E (tocophérol)

Terme générique désignant une famille de substances (tocophérols α , β , γ , δ et tocotriénols α , β , γ , δ) (Figure.17), la vitamine E est le plus puissant des antioxydants de l'organisme. Seule la forme (α) de la vitamine E est retenue par l'organisme car elle est plus active biologiquement (Laguerre *et al.*, 2007).

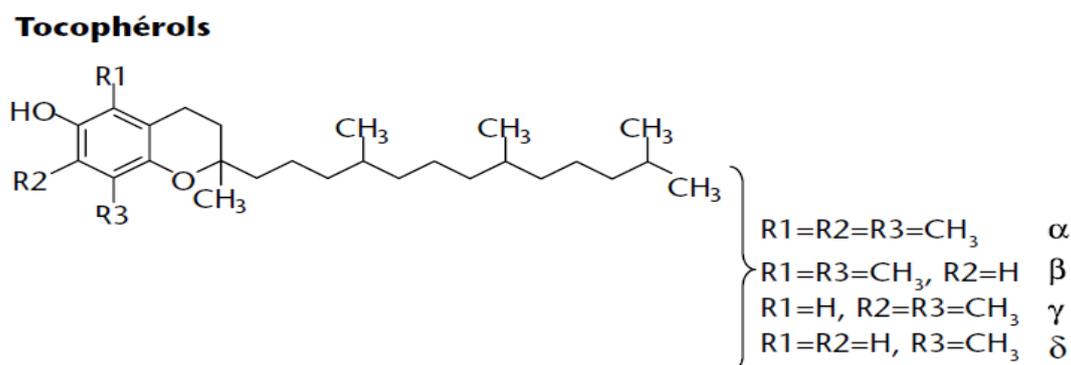


Figure. 17 : Structure chimique des tocophérols (Laguerre *et al.*, 2007)

Elle est liposoluble et s'incorpore facilement dans les membranes cellulaires qui, étant riches en acides gras polyinsaturés facilement oxydables et qui sont très exposées aux dommages induits par les radicaux libres. Elle réagit avec les radicaux peroxydes (RO_2^{\bullet}) qui, sont fabriqués dans les membranes pour former un radical α -tocophéryl ($\alpha-T^{\bullet}$) plus stable protégeant ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines : $RO_2^{\bullet} + \alpha\text{-TH} \rightarrow RO_2H + \alpha\text{-T}^{\bullet}$ (α -tocophérol : $\alpha\text{-TH}$). De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO_2^{\bullet}), les radicaux hydroxyles OH^{\bullet} , ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 . (Gardès-Albert *et al.*, 2003)

Bien que la concentration d' α -tocophérol soit relativement faible *in vivo* (2.10^{-5} mol.L⁻¹ dans le sang), le recyclage de ce dernier est assuré par une consommation optimale de vitamine C.

Car la vitamine E oxydée est régénérée, c'est-à-dire réduite in situ, sous sa forme antioxydante active, par la vitamine C, ceci lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises, de telle manière que la surveillance de la menace oxydante est maintenue, voir les Figures 18 et 19 (Leger, 2006).

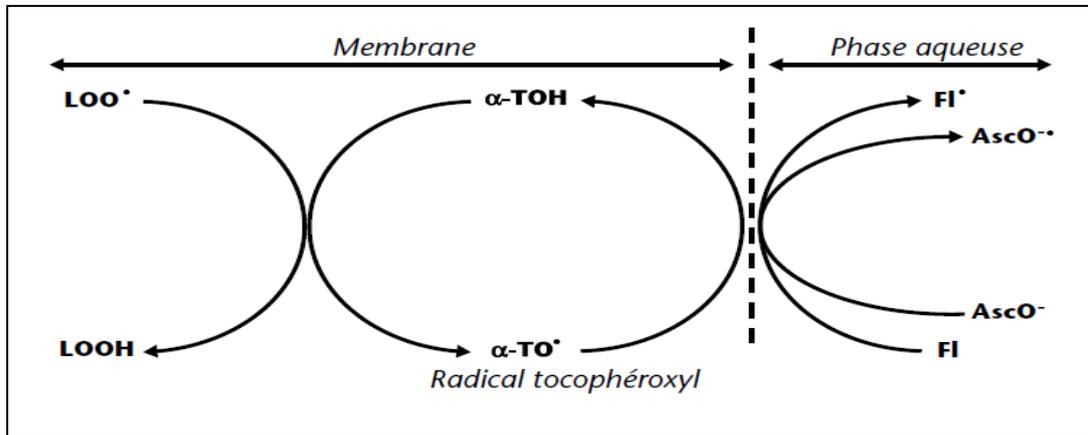


Figure 18 : Mécanisme de régénération potentiel entre l' α -tocophérol (α -TOH), l'ascorbate ($AscO^{\bullet-}$) et les flavonoïdes (FI) dans les systèmes membranaires (Leger, 2006).

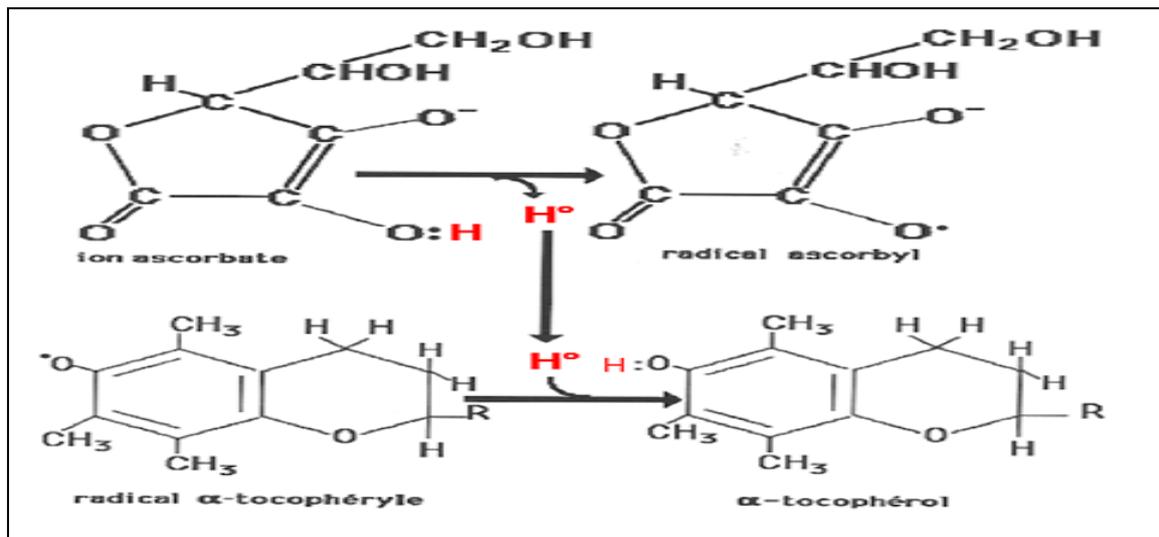


Figure 19 : Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C).

3.2.2.2. La vitamine C (acide ascorbique) :

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrosoluble (Wickens, 2001). C'est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $^{\bullet}OH$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ (et leur forme

protonée $\text{HO}_2\cdot$). En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$ en réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate (AscH^-) est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}^{\cdot-}$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Elle réagit également avec le radical tocophéryl, en régénérant la vitamine E (Figure 18 et 19), en devenant le radical ascorbyle A^- , également très stable :

La vitamine C est régénérée par d'autres molécules comme le glutathion, et des enzymes, la glutathion peroxydase ou les superoxydes dismutases. (Gardès-Albert *et al.*, 2003)

3.2.2.3. Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet. Les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) (Figure 20) (Laguerre, 2007).

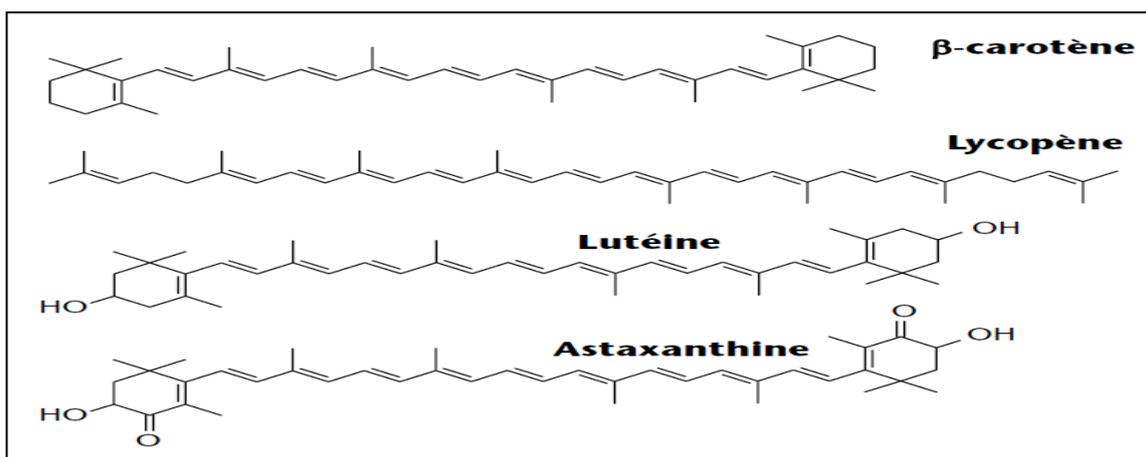
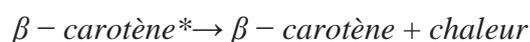
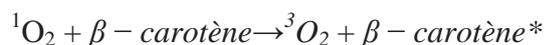


Figure 20 : Principaux caroténoïdes antioxydants. (Laguerre, 2007)

Les caroténoïdes développent diverses activités biologiques, dont des activités antioxydantes et antiradicalaires, par lesquelles ils protègent les LDL de la peroxydation: leurs nombreuses doubles liaisons conjuguées font d'eux de bons piègeurs des radicaux libres.

Grâce au long système polyénique conjugué de ces molécules, l'excès d'énergie de leur état excité (β -carotène*) est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou leur environnement (Palozza et Krinsky, 1992).



Par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le β -carotène régénéré peut commencer un nouveau cycle de piégeage de l' $^1\text{O}_2$ et constitue par conséquent un piègeur non stœchiométrique. Il est estimé que chaque molécule de caroténoïde pourrait piéger environ 1 000 molécules d' $^1\text{O}_2$, avant de réagir chimiquement et de former un produit.

3.2.2.4) Les composés phénoliques:

Les polyphénols sont généralement de puissants antioxydants; Ils ont ainsi la capacité de protéger les végétaux contre les effets néfastes des radicaux libres générés en réponse aux polluants, infections, rayonnements UV etc. D'autres sont également de bons inhibiteurs d'enzymes ou sont reconnus pour leurs propriétés antiseptiques ou anti-inflammatoires.

Les flavonoïdes sont susceptibles de neutraliser les radicaux libres, d'exercer un rôle de protection cardio-vasculaire et de favoriser l'élimination de substances toxiques.

En raison de leur abondance dans les plantes consommées par l'homme et de leurs bénéfiques potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes font l'objet d'une attention croissante. Que ce soit pour l'étude des relations structure-activité, le contrôle de la qualité alimentaire ou le suivi de l'absorption et de la métabolisation de ces composés phénoliques naturels. (**Perron et Brumaghim, 2009**)

Partie expérimentale :

Chapitre I : Matériel et méthodes.

Chapitre II : Résultats et discussion.

Chapitre I :

Matériel et méthodes

1. Présentation de la station d'étude

Le site de Cap Falcon est situé à environ 15 Km à l'ouest de la ville d'Oran, la moyenne des températures du mois le plus chaud est de 31°C, la moyenne des températures du mois le plus froid est de 5,1°C. Les précipitations moyennes annuelles sont de 322 mm, le sol est sableux formé essentiellement des dunes de sable. La position géographique est : 35° 46' 23" Nord et 0° 47' 29" Ouest à 63 m d'altitude.

Ces données montrent une ambiance bioclimatique nettement aride, quoique tempérée par la proximité de la mer (température, humidité relative, précipitations occultes). A cette aridité climatique s'ajoutent les effets de vents violents qui accentuent le déficit hydrique de la végétation.

Le sol peu évolué enrichi en matière organique et en éléments fins. On peut noter l'existence d'accumulations calcaires sous forme de nodules et de tubules. Ces conditions climatiques sont responsables d'une certaine fragilité du couvert végétal.

Deux directions de vent présentent une fréquence élevée cette station : Ouest— Sud-Ouest et Nord— Nord-Est. Les premiers, souvent les plus violents, présentent une fréquence élevée durant toute l'année, tandis que les seconds n'acquièrent une fréquence relativement dominante que durant la période estivale. La morphologie dunaire et les morphoses imposées aux espèces végétales montrent que les vents du secteur ouest sont les plus efficaces. (**Aimé et Marie-Josée, 1982**)

2. Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté d'une population de la station de Cap Falcon (Oran). Les fleurs et les tiges de *Retama monosperma* ont été collectées au mois de mars, période où la plante est en pleine floraison, alors que les fruits ont été prélevés après sa maturation complète au mois d'août, où les graines sont sèches et dures. Les prélèvements ont été effectués de manière aléatoire simple et représentative.

3. Séchage et broyage

Le séchage est réalisé à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante. Ensuite le matériel végétal est réduit en poudre fine à l'aide d'un broyeur à couteaux de type RETCH, muni d'un filtre de 0.75mm, puis conservé dans des sachets en papier kraft.

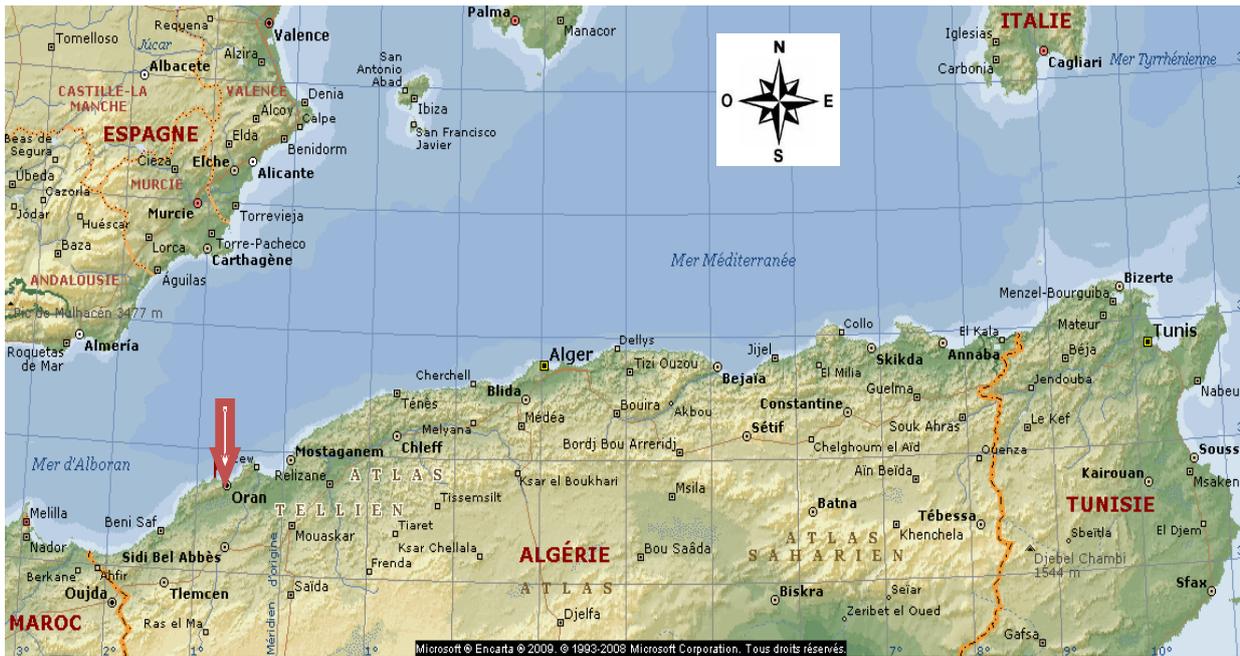


Figure 21 : Carte géographique montrant la position de la station de prélèvement Cap Falcon (Oran) par rapport au bassin méditerranéen. (Encyclopédie Encarta ; 2008)

4. Caractérisation phytochimique :

Le screening phytochimique sur une plante représente toujours la première étape de son étude chimique. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

Elles n'ont évidemment qu'une valeur indicative mais elles permettent d'orienter les recherches ultérieures.

Bien que les procédés aient déjà été décrits pour la plupart par (Harborne, 1998), il nous a semblé utile de rappeler succinctement ici ceux que nous avons utilisés.

4.1. Flavonoïdes (Réaction à la cyanidine) :

5 à 10 g d'échantillon frais coupé en morceaux sont mis à bouillir pendant 5 minutes dans 100 ml d'eau. Après refroidissement et filtration, à 5 ml du filtrat on ajoute 5 ml d'alcool chlorhydrique, 0,50 g environ de copeaux de magnésium et quelques gouttes d'alcool isoamylique qui rassemble la coloration rose, orangée ou rouge violacé produite lorsqu'il y a présence des flavonoïdes (flavonols, flavones, flavanones).

4.2. Leucoanthocyane :

Nous avons effectué la réaction à la cyanidine sans additionner du magnésium et chauffer pendant 15 minutes au bain-marie. Le développement d'une coloration rouge cerise ou violacé ou brun rouge indique la présence de leucoanthocyane.

4.3. Anthocyane

A 5 ml d'infusé, nous avons ajouté 5 ml de H_2SO_4 à 10% et 5 ml de NH_4OH dilué au demi. La présence d'anthocyane se traduit par une accentuation de la coloration par acidification puis le virage au bleu violacé par alcalinisation.

4.4. Tanins

On opère sur un infusé à 10 %. Avec le $FeCl_3$ à 1 % les tanins sont précipités de leur solution aqueuse en donnant un précipité bleu noir ou brun verdâtre selon qu'il s'agit de dérivés galliques ou catéchiques.

4.5. Alcaloïdes

5 g d'organes frais sont broyés au mortier avec du sable, de façon à dilacérer les tissus et libérer le contenu cellulaire. La pâte obtenue est reprise par 10 ml d'acide chlorhydrique 10 %, puis filtrée après macération de quelques minutes. Les alcaloïdes sont recherchés sur des prises d'essai de 1 ml de filtrat, réparties dans deux tubes à hémolyse, au moyen de 5 gouttes des réactifs de Dragendorff et 05 gouttes du reactif de Mayer.

4.6. Saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. À partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,6 cm de diamètre interne) avec 1, 2, ... 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le x^e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : $I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } x^e \text{ tube} \times 5 / 0,0x$. La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

4.7. Terpénoïdes

À 2 g de matériel végétal en poudre sont ajoutés 10 à 20 ml d'hexane. Le mélange est soumis à une agitation de 30 min puis filtré. Une CCM est effectuée, en utilisant comme solvant le benzène (pur à 98-99 %). Après migration, la plaque est pulvérisée avec du chlorure d'antimoine et placée à l'étuve à 110°C pendant 10 min. Toute fluorescence à 365 nm indique la présence de terpénoïdes.

4.8. Quinones

A 2 ml du décocté à 10%, on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque 50%. La présence de quinones est confirmée, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

4.9. Anthraquinones

À l'extrait chloroformique de chacun des organes (10%), on ajoute du KOH aqueux 10 % (v/v). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

4.10. Composés cyanogénétiques

2 g de matériel végétal frais, broyés sont introduits dans le fond d'un tube à essai avec 1 ou 2 gouttes de toluène qui déclenche l'hydrolyse de l'hétéroside s'il y a lieu. On bouche le tube en coinçant à l'intérieur une bandelette de papier filtre imprégnée extemporanément du réactif de Guignard (Picrate de sodium). Le papier coloré en jaune clair prend une teinte rouge sous l'influence des vapeurs d'acide cyanhydrique HCN.

4.11. Recherche des sucres réducteurs:

1 ml de la solution à analyser est évaporé à sec. Puis, 200 µl de réactif de Fehling sont ajoutés au résidu. L'obtention d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie à 70°C indique la présence de composés réducteurs.

5. Extraction et fractionnement des extraits bruts:

Nous avons réalisé une extraction solide-liquide suivie d'une série d'extractions liquide – liquide pour partager les constituants de l'extrait brute en fractions de polarités différentes entre deux phases liquides non miscibles. Les solvants d'extraction utilisés sont le méthanol aqueux 70%, l'hexane, le toluène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol.

50 g du matériel végétal séché ont été extraites avec un volume de (3 x 500 ml) du méthanol 70 %, sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. La solution obtenue est ensuite filtrée sur Büchner n°4 sous vide.

Le volume total du filtrat est concentré à un volume de 100 ml, sous vide à 50°C par un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à faible pression, puis dilué avec un volume de 300 ml d'eau pour faire chuter le degré alcoolique, ensuite partager cette phase contre des solvants en gradient de polarité croissante : n-hexane, toluène, chloroforme, acétate d'éthyle puis enfin le n-butanol. (3 x 100 ml) pour chaque solvant.

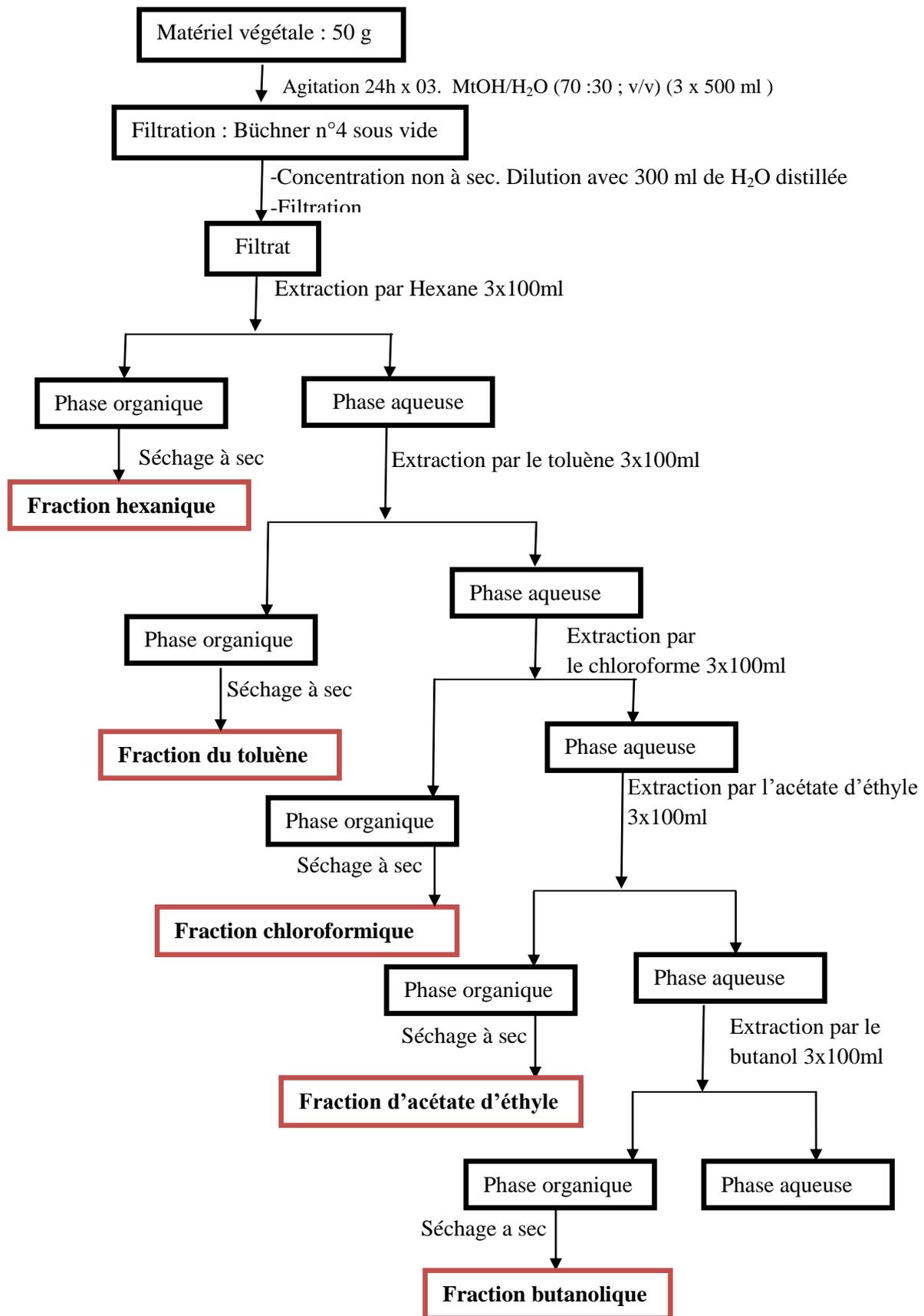


Figure 22: Schéma regroupant les étapes de fractionnement liquide-liquide des polyphénols de *Retama monosperma*.

Les extraits sont ensuite évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis pesés pour calculer le rendement. Ils sont ensuite resolubilisés dans le méthanol à une concentration de 20 mg / ml et conservés dans des flacons opaques à - 20 ° C.

Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matière végétale.

La figure 22 résume les différentes étapes d'extraction des différentes fractions des *Retama monosperma*.

6. Screening chimique préliminaire par CCM

Des chromatographies sur couche mince ont été menées sur les différentes fractions des trois échantillons de la plante, pour avoir un aperçu de la présence ou l'absence des molécules du métabolisme secondaires ainsi leurs activités antioxydantes.

Les plaques utilisées, sont recouvertes avec du gel de silice 60 F₂₅₄ Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Deux phases mobiles de polarité différentes ont été utilisées:

-ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10).

-ACOET-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11: 11: 20).

À l'aide d'une micropipette, des dépôts de 10µl d'une concentration de 4µg/µl de chaque extrait ont été effectués de façon linéaire sur la plaque et espacés de 1 cm afin d'éviter la superposition des taches. Les plaques sont placées dans la cuve contenant le solvant de migration puis retirées une fois que ce dernier parcourt 16 cm.

La plaque est ensuite séchée à l'air puis observée à l'aide d'une lampe UV à deux longueurs d'onde (254 nm et 366 nm), ou soumise à une pulvérisation par une solution de vanilline 1 % dans l'acide sulfurique. La révélation est activée par passage des plaques à 110°C dans une étuve pendant quelques minutes.

Pour un screening des activités antioxydantes nous avons réalisé une bio-autographie, les plaques CCM ont été pulvérisées par une solution de DPPH à 0.2%, les zones d'activités ont été déterminées par la coloration jaune sur fond violet.

le facteur de rétention (R_f) = (distance parcourue par la molécule) / (distance parcourue par le solvant de migration).

7. Dosage des composés phénoliques

Des méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

7.1. Dosage des polyphénols

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu»; c'est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm, le dosage de polyphénols est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

20 μ l d'extrait dilué à 1mg/ml est ajoutée à 1.58 ml d'eau distillée et 100 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu 0.1N. Après agitation vigoureuse, le mélange est maintenu au repos pendant 3 min, puis on lui additionne 300 μ l d'une solution de Na_2CO_3 à 7.5 % puis on ajuste à un volume final de 3 ml par l'eau distillée. Le mélange est laissé au repos pendant 90 min à la température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm. Une droite d'étalonnage de 0 à 0.6 mg/ml est réalisée avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser (voir annexe A). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de d'extrait sec (mg E GA/g ES).
(Singleton et Rossi, 1965)

7.2. Dosage des flavonoïdes

Les réactifs utilisés sont: les solutions incolores de nitrite de sodium ($NaNO_2$, 5%) et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

1 mL d'extrait dilué à 1mg/ml est ajouté à 5 ml d'eau distillée et 0.3 ml de $NaNO_2$ à 5%. Après 6 minutes de repos à température ambiante et à l'obscurité. Ce mélange est ensuite additionné à 0.3 ml de $AlCl_3$ à 10 % ; après 6 mn à l'obscurité ; 2 ml de $NaOH$ 1M est ajouté. Le volume final est ajusté à 10ml. Le mélange est soumis à une agitation au vortex, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 510nm. Une droite d'étalonnage de 0 à 0.3 mg/ml

est réalisée avec de la catéchine dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser (voir annexe B). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec (mg E Ct/g ES) (**Dewanto *et al*, 2002**)

7.3. Dosage des tanins condensés

Le contenu en tannins condensés également connu sous le nom de proanthocyanidines (dérivés polymériques de flavan-3-ol). La méthodologie consiste à dépolymériser les tannins en milieu acide, et après réaction avec la vanilline, à les transformer en anthocyanidols analysables à 500 nm (**Price *et al.*, 1978**).

A 100µl d'extrait dilué à 1mg/ml sont ajoutés 5ml du réactif vanilline/ HCL 4%. Les tubes sont laissés au repos pendant 20 minutes avant de lire l'absorbance à 500 nm. Une courbe d'étalonnage établie à partir des solutions des différentes concentrations de catéchine (0 à 0.12 mg/ml) permet d'exprimer la concentration des tanins condensés en mg équivalent catéchine/ g d'extrait sec (mg ECt/ gES), voir annexe C.

8. Evaluation de la capacité antioxydante

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en vitamine C, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en vitamine C.

Les deux types de radicaux que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de plantes sont: le radical DPPH et le radical PPM.

8.1. Activité antioxydante totale

La méthode consiste à introduire dans un tube 300 µl d'échantillon, mélangés à 2.7ml d'un réactif composé de H₂SO₄ (0,6 M), de NaH₂PO₄ (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300 µl de méthanol mélangé avec 2.7 du réactif mentionné ci-dessus. Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Une droite d'étalonnage de 0 à 0.6 mg/ml est réalisée avec de l'acide ascorbique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, voir annexe D.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait sec (mg EAA/gES) (Prieto *et al.*, 1999)

8.2. Etude de l'activité antioxydative par DPPH

La méthode du DPPH[•] est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort.

La capacité antioxydante des extraits de *Retama monosperma* est déterminée selon la méthode de (Brand-Williams *et al.*, 1995). 0.1 ml de différentes concentrations (0.01 à 10mg/mL) de chaque extrait est ajouté à 3,9 mL de DPPH à (60 µmol/L). La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 mn d'incubation dans l'obscurité. Les essais sont repris au moins trois fois. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] suivant l'équation : % Inhibition = (A blanc – A échantillon) x100/Ablanc
A = absorbance à 517 nm.

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition.

A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), qui correspond à la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. L'acide ascorbique est utilisé à titre de comparaison.

9. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel Microsoft Excel 2007. Toutes les analyses ont été répétées au minimum trois fois, les valeurs représentent une moyenne avec un écart type. Les coefficients de corrélation de Pearson (r) expriment la relation entre les variables étudiées.

Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1. Un signe négatif indique que (y) varie en sens inverse de (x) et on parle alors de corrélation négative. Plus le coefficient est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus la corrélation entre les variables est forte. Si le coefficient est proche de 0, les deux variables sont linéairement indépendantes tandis qu'une liaison linéaire est d'autant plus marquée que le coefficient s'approche de 1 ou de -1.

Chapitre II :

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Caractérisation phytochimique:

Les résultats de l'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de *Retama monosperma* par screening chimique sont repris dans le tableau 7. Nous remarquons que les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les sucres réducteurs sont présents dans les trois organes. Ainsi les composés cyanogénétiques, les anthocyanes, les quinones et les anthraquinones sont absentes. Quant aux leuco-anthocyanes et les terpénoïdes elles sont détectées uniquement dans les fleurs et les graines.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des classes phytochimiques présentes dans les tiges, les fleurs et les graines de *Retama monosperma*

Classe des molécules	Tiges	Graines	Fleurs
Flavonoïdes Genine flavonique	+ (Flavonole et Flavanonole)	+ (Flavanone)	+ (Flavone)
Anthocyanes	-	-	-
Leuco-anthocyanes Catéchols	- -	- -	+ +
Tannins (FeCl₃) Catéchiques Galliques	+ -	+ -	+ -
Saponosides Indice de mousse	+ 53.7 ± 1.20	± 15 ± 0	+ 67.3 ± 2.20
Sucres réducteurs (Fehling)	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-
Quinones	-	-	-
Composés cyanogénétiques (Guignard)	-	-	-
Alcaloïdes	+	+	+
Terpénoïdes	-	+	+

+ = présent; - = absente

1.2. Rendement des extraits et des fractions

Le tableau. 8 : présente les pourcentages massiques des fractions obtenues à partir des extraits bruts. Les résultats suggèrent que *Retama monosperma* est riche en composés polaires ayant une forte affinité pour le méthanol aqueux, par contre cette espèce est très pauvre en composés apolaires qui ont des affinités avec l'hexane et le toluène.

Tableau 8 : Pourcentages massiques des fractions obtenues à partir des extraits bruts

	Methanol 70%	<i>n</i> -Hexane	Toluene	Chloroforme	Acetate d'éthyle	<i>n</i> -Butanol
Tiges	23.26	-	-	0.6	0.47	4.55
Fleurs	34.8	-	0.075	1.1	1.5	11.3
Graines	18.13	-	0.05	-	1.2	2.06

1.3. Screening chimique préliminaire par CCM

Les chromatogrammes font apparaître de très nombreuses taches, diversement colorées, voire figure 23, 24 et 25

La bio-autographie par chromatographiques sur couche mince permet de montrer que mis à part les extraits butanolique, tous les autres extraits ont montré une activité antioxydante par le test au DPPH, l'intensité de cette activité varie d'un extrait à un autre et aussi selon le solvant de migration. L'extrait au toluène et l'extrait à l'acétate d'éthyle des graines ont montré trois spots franchement positifs et apparaissent majoritaires d'après l'importance des taches, avec le solvant de migration ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10) et qui sont absents dans les autres organes et les autres extraits, ces spots ont des R_f de 0.12, 0.21 et 0.46. Voir figure 26.

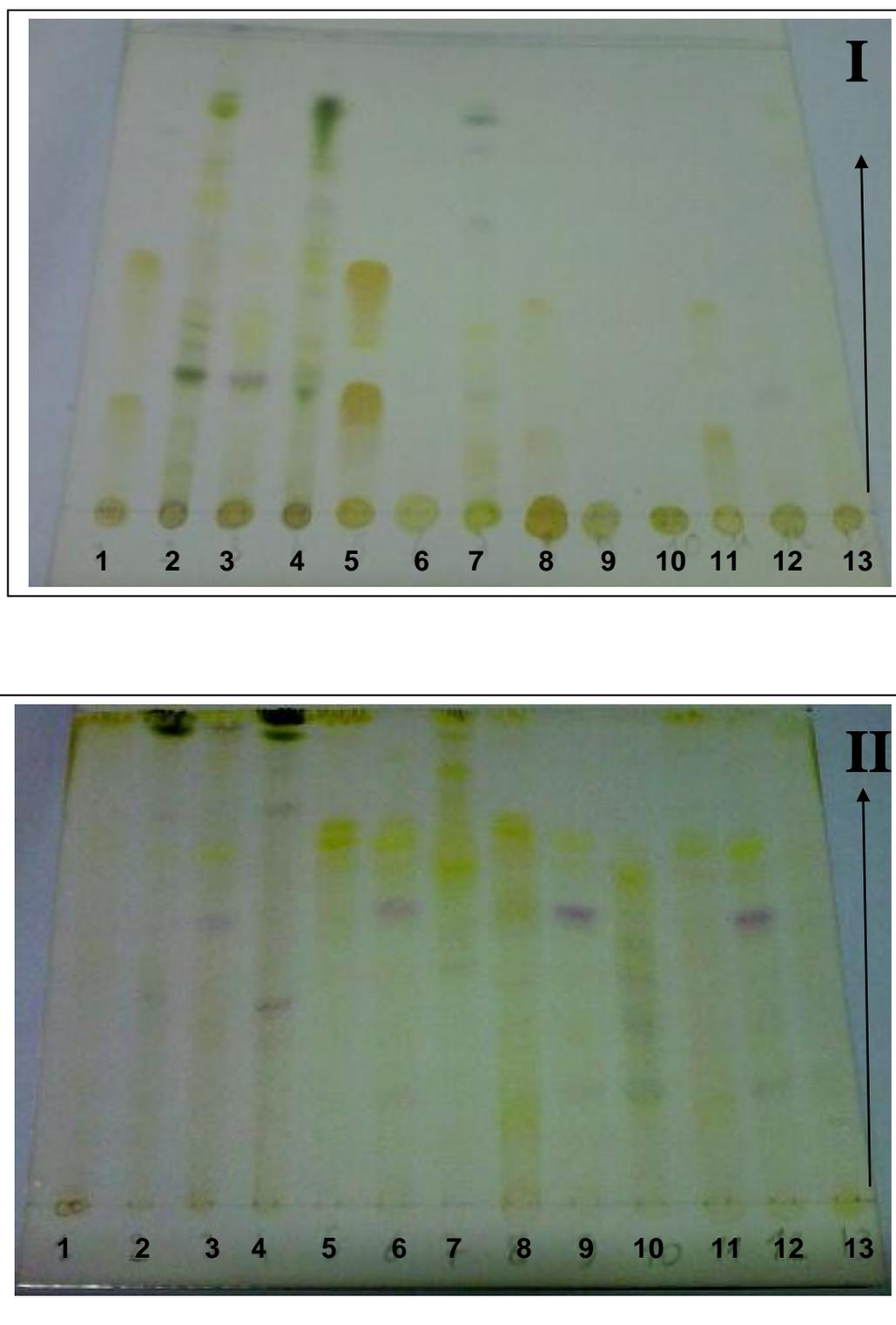


Figure 23 : Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de *Retama monosperma*, pulvérisé par la vanilline sulfurique. **I :** Solvant de migration : ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10). **II :** Solvant de migration : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:20). **1 :** Toluène graines. **2 :** Toluène fleurs. **3 :** chloroforme fleurs. **4 :** chloroforme tiges. **5 :** Acétate d'éthyle graines. **6 :** Acétate d'éthyle fleurs. **7 :** Acétate d'éthyle tige. **8 :** Butanol graines. **9 :** Butanol fleurs. **10 :** Butanol tiges. **11 :** Brute (méthanol 70%) graines. **12 :** Brute (méthanol 70%) fleur. **13 :** Brute (méthanol 70%) tiges.

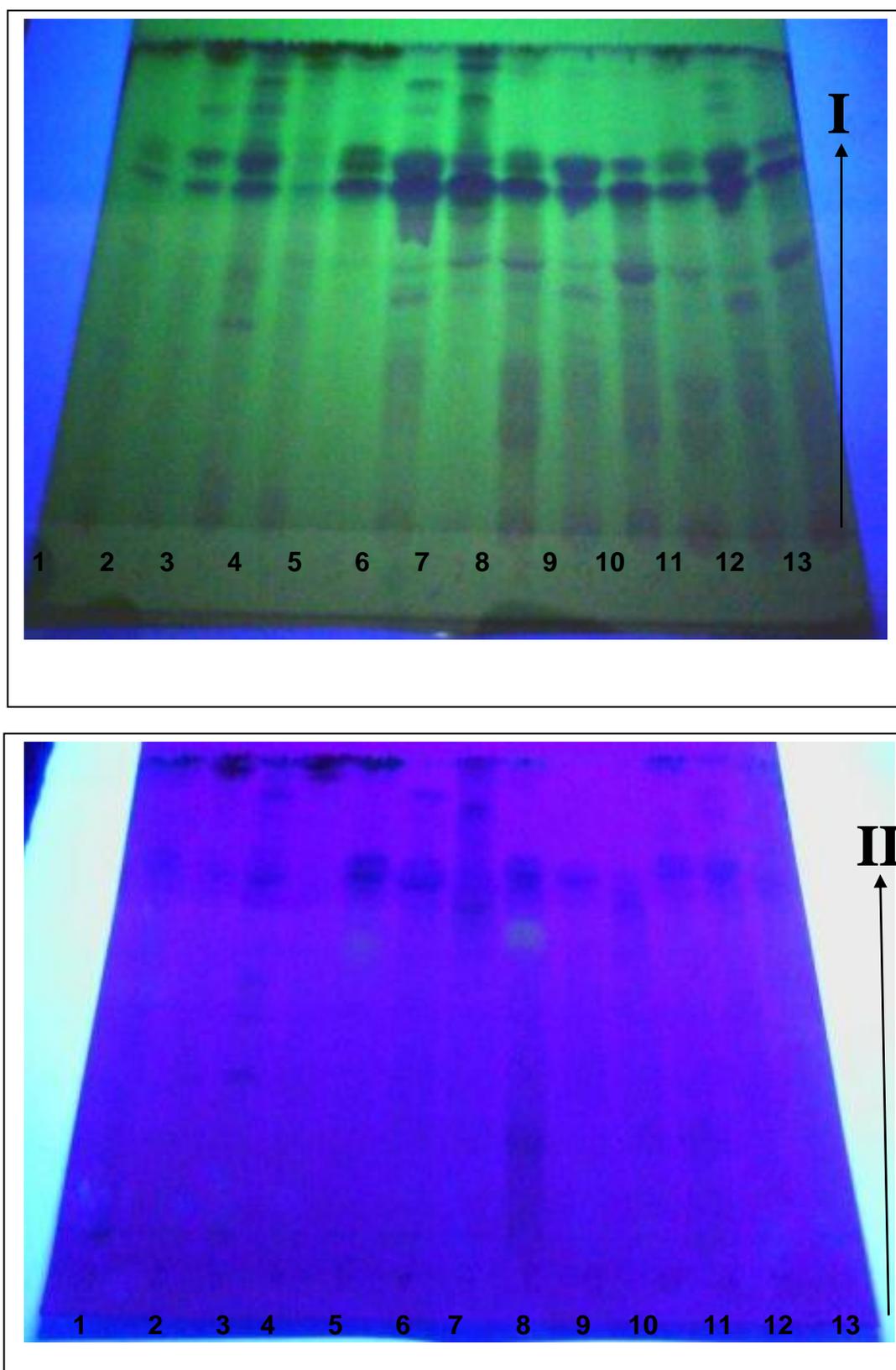


Figure 24. Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de *Retama monosperma*, observé sous UV. **I** : 254 nm. **II** : 366nm. Solvant de migration : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11: 11: 20). **1** : Toluène graines. **2** : Toluène fleurs. **3** : chloroforme fleurs. **4** : chloroforme tiges. **5** : Acétate d'éthyle graines. **6** : Acétate d'éthyle fleurs. **7** : Acétate d'éthyle tige. **8** : Butanol graines. **9** : Butanol fleurs. **10** : Butanol tiges. **11** : Brute (méthanol 70%) graines. **12** : Brute (méthanol 70%) fleur. **13** : Brute (méthanol 70%) tiges.

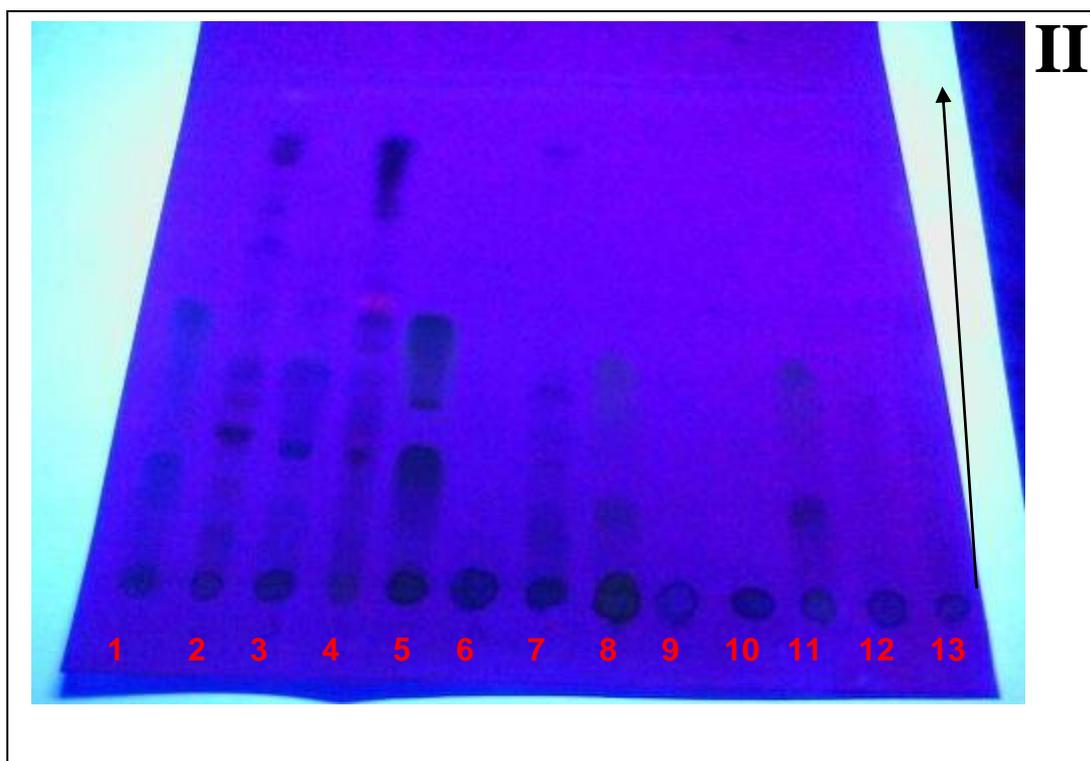
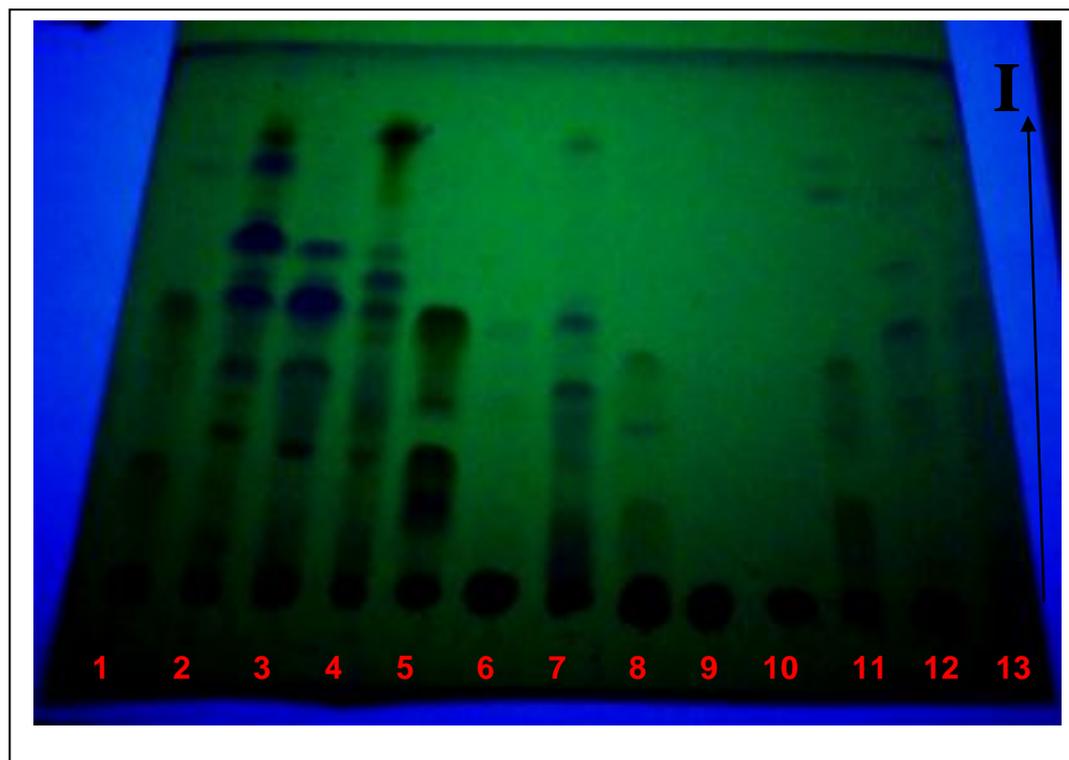


Figure 25 : Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de *Retama monosperma*, observé sous UV. **I :** 254 nm. **II :** 366 nm. Solvant de migration : ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10). **1 :** Toluène graines. **2 :** Toluène fleurs. **3 :** chloroforme fleurs. **4 :** chloroforme tiges. **5 :** Acétate d'éthyle graines. **6 :** Acétate d'éthyle fleurs. **7 :** Acétate d'éthyle tige. **8 :** Butanol graines. **9 :** Butanol fleurs. **10 :** Butanol tiges. **11 :** Brute (méthanol 70%) graines. **12 :** Brute (méthanol 70%) fleur. **13 :** Brute (méthanol 70%) tiges.

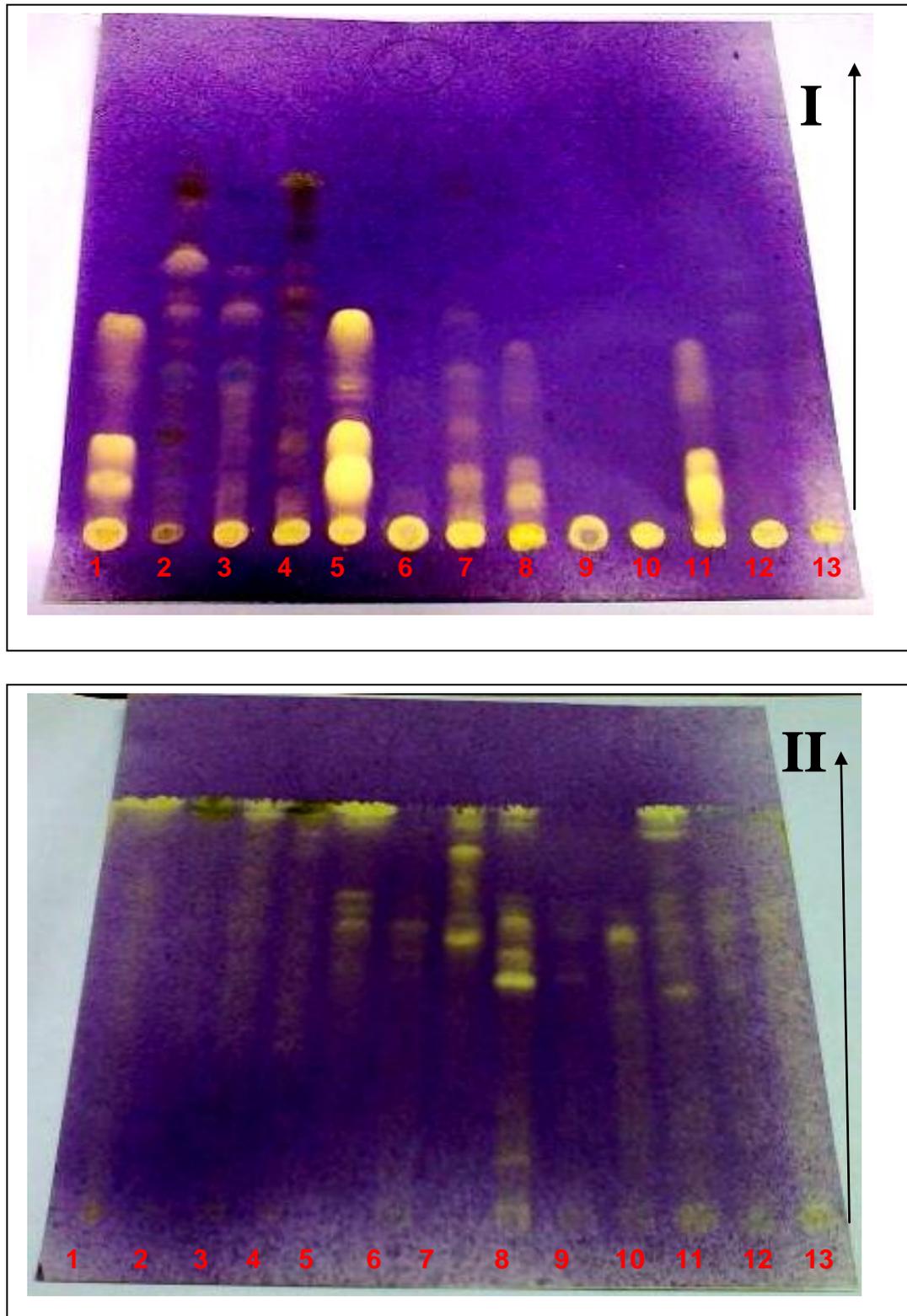


Figure 26 : Chromatogramme de différents extraits et leurs fractions de *Retama monosperma*, pulvérisé par le DPPH 0.2 % **I :** Solvant de migration : ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10). **II :** Solvant de migration : ACOET-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:20). **1 :** Toluène graines. **2 :** Toluène fleurs. **3 :** chloroforme fleurs. **4 :** chloroforme tiges. **5 :** Acétate d'éthyle graines. **6 :** Acétate d'éthyle fleurs. **7 :** Acétate d'éthyle tige. **8 :** Butanol graines. **9 :** Butanol fleurs. **10 :** Butanol tiges. **11 :** Brute (méthanol 70%) graines. **12 :** Brute (méthanol 70%) fleur. **13 :** Brute (méthanol 70%) tiges.

1.4. Rendement du dosage des composés phénoliques

Les teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées en mg équivalent d'acide gallique d'extrait sec pour les polyphénols et mg équivalent de catéchine par g d'extrait sec pour les flavonoïdes et les tannins condensés.

Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes totaux et des tannins condensés sont résumés dans le tableau 9 et sont représentés sur les figures 27 ; 28 et 29.

Les résultats montrent que les fractions d'acétate d'éthyle des trois organes, contiennent les teneurs en polyphénols totaux (Poly) et en flavonoïdes (Flav) les plus élevées, en particulier dans les graines 524.81 mg GAE/g pour les polyphénols et 300.2 mg CE/g pour les flavonoïdes, alors, que la quantité la plus faible en ces composés a été trouvée dans la fraction butanolique des fleurs avec des teneurs de 90.81 mg GAE/g pour les polyphénols et 17.1 mg CE/g pour les flavonoïdes.

Les résultats des analyses quantitatives en tanins condensés (Tan. Cond) indiquent que ces molécules ne sont pas les constituants majoritaires des composés phénoliques des différentes fractions, leur quantité varie entre 2.01 et 9.6 mg CE/g entre les différents extraits et leurs fractions.

Tableau 9 : Résultats de la quantification spectrophotométrique des phénols totaux, flavonoïdes et tannins.

	Tiges			Fleurs			Grains		
	Poly mg GAE/g	Flav mg CE/g	Tan. cond mg CE/g	Poly mg GA/ g	Flav mg CE/g	Tan. cond mg CE/g	Poly mg GAE/g	Flav mg CE/g	Tan. cond mg CE/g
Toluène	-	-	-	146.37 ± 0,17	46.76 ± 0,27	2.5 ± 0,27	263.78 ± 0,12	130.85 ± 0,43	3.6 ± 0,23
Chloroforme	148.05 ± 0,20	60.6 ± 0,19	9.60 ± 0,33	182.16 ± 0,06	41.5 ± 0,12	5.58 ± 0,23	-	-	-
Acétate d'éthyle	227.13 ± 0,42	93.38 ± 0,17	2.5 ± 0,21	229.19 ± 0,47	31.33 ± 0,02	4.67 ± 0,48	524.81 ± 1,23	300.2 ± 0,37	7.56 ± 0,61
n-butanol	137.72 ± 0,33	39.56 ± 0,17	5.97 ± 0,45	90.81 ± 0,16	17.1 ± 0,03	2.01 ± 0,11	232.01 ± 0,28	97.39 ± 0,54	4.01 ± 0,34
Methanol 70%	212.05 ± 0,19	19.41 ± 0,06	8.01 ± 0,35	200 ± 0,4	17.42 ± 0,02	6.01 ± 0,5	239.85 ± 0,04	47.23 ± 0,07	3.02 ± 0,27

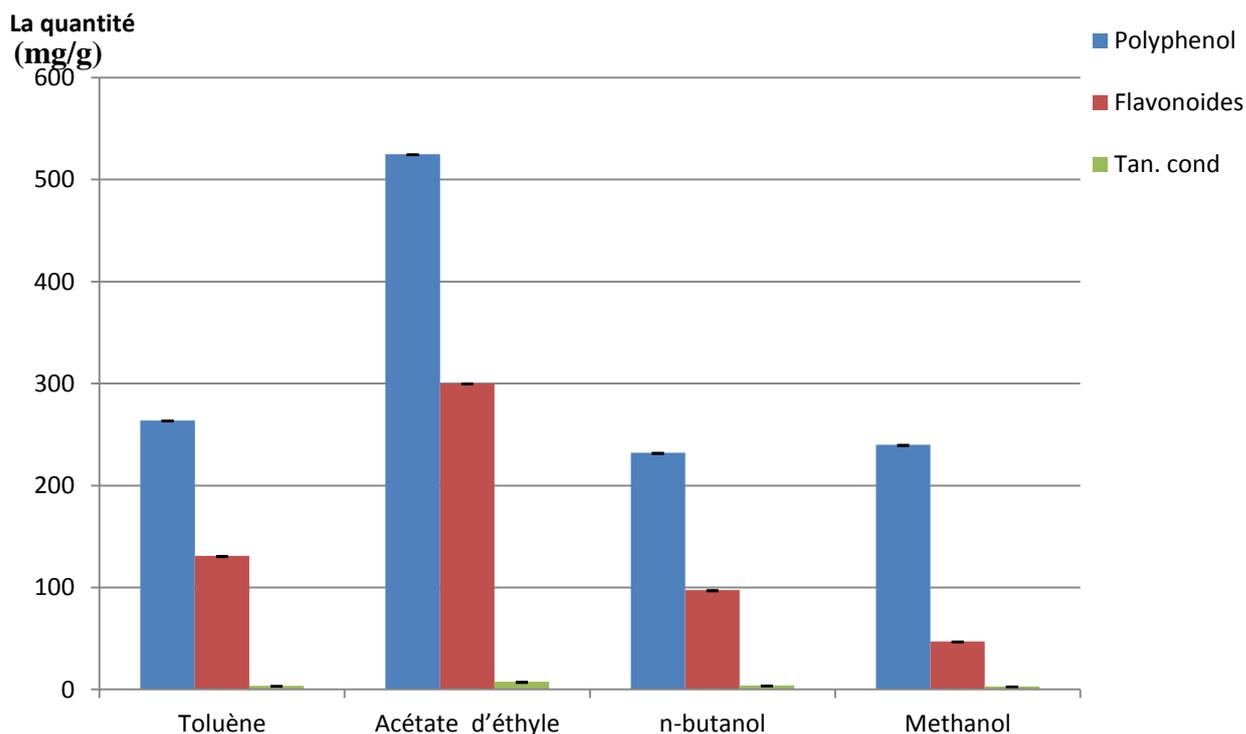


Figure. 27 : Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les graines de *Retama monosperma*

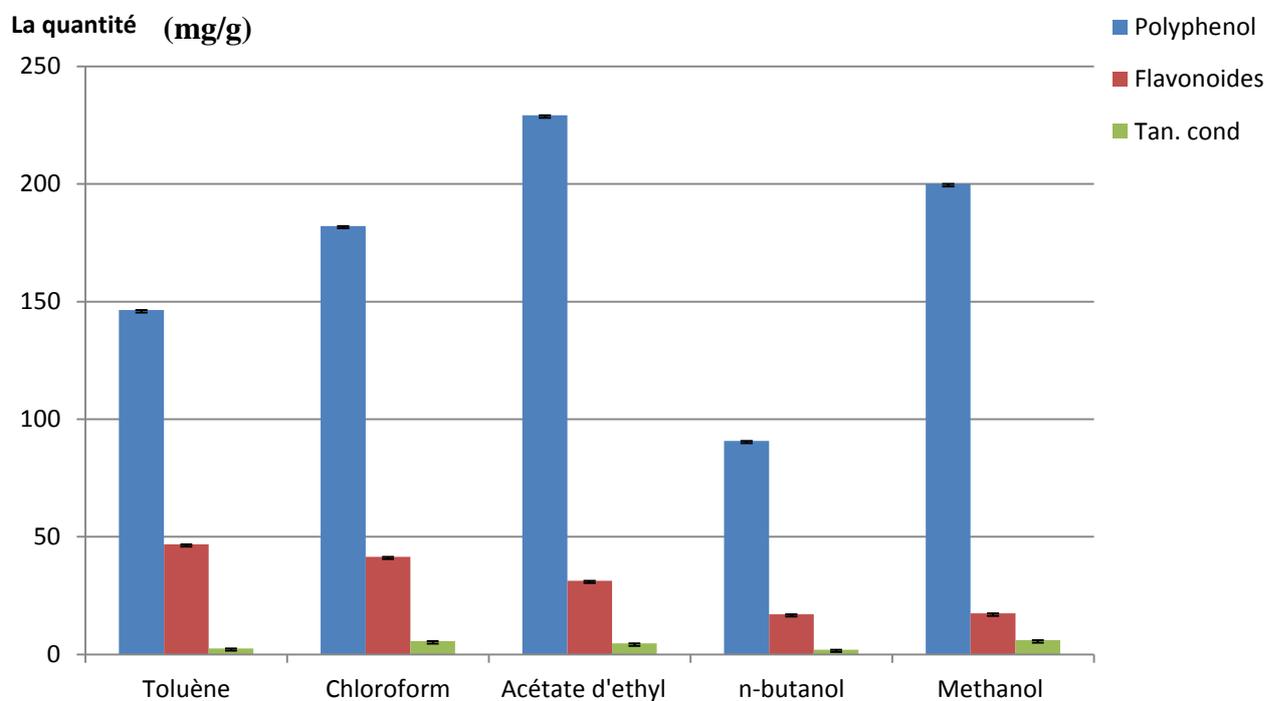


Figure 28 : Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les fleurs de *Retama monosperma*

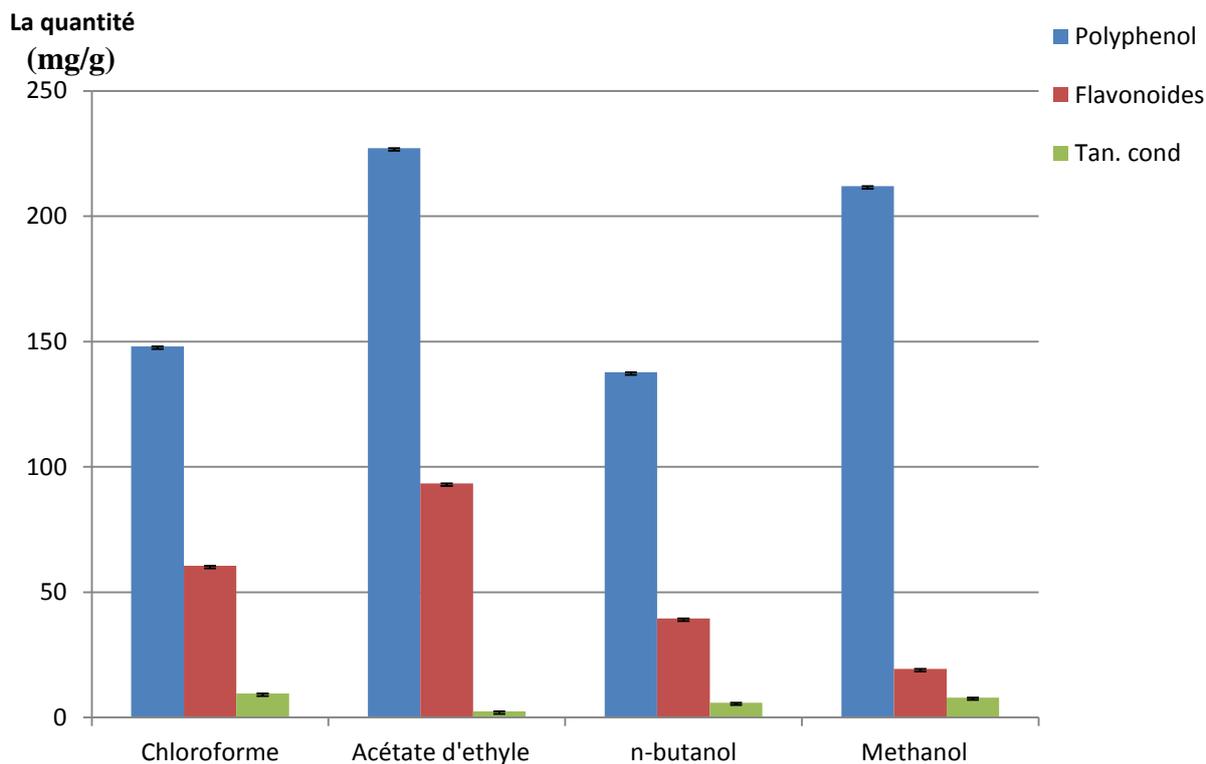


Figure 29 : Teneur en composés phénoliques totaux (mg GAE/g), en flavonoïdes et en tannins condensés (mg CE/g) dans les tiges de *Retama monosperma*

1.5) Activités antioxydatives :

La capacité antioxydante totale a été déterminée à partir une équation de la régression linéaire d'une courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait sec (mg EAA / g).

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests PPM et de DPPH sont résumés dans le tableau 10.

La figure 30 montre que tous les extraits des trois organes présentent des capacités antioxydantes différentes.

Tableau 10 : Résultats des activités antioxydantes

	Tiges		Fleurs		Grains	
	DPPH IC ₅₀ (mg/ ml)	TAC (mg/ g EAA)	DPPH IC ₅₀ (mg/ ml)	TAC (mg/ g EAA)	DPPH IC ₅₀ (mg/ ml)	TAC (mg/ g EAA)
Toluène	-	-	3.13 ± 0.21	63.26 ± 0.38	0.31 ± 0.13	129.8 ± 0.39
Chloroforme	3.15 ± 0.2	86.29 ± 0.52	2.56 ± 0.19	107.87 ± 0.72	-	-
Acétate d'éthyle	1.51 ± 0.11	68.22 ± 0.48	3.32 ± 0.17	39.56 ± 0.20	0.15 ± 0.11	197.95 0,98
<i>n</i> -butanol	2.88 ± 0.15	58.01 ± 0.29	24.1 ± 0.71	26.24 ± 0.22	1.17 ± 0.15	111.07 ± 0.45
Methanole 70%	3.87 ± 0.22	43.14 ± 0.31	4.08 ± 0.25	34.11 ± 0.15	1.66 ± 0.13	57.23 ± 0.31

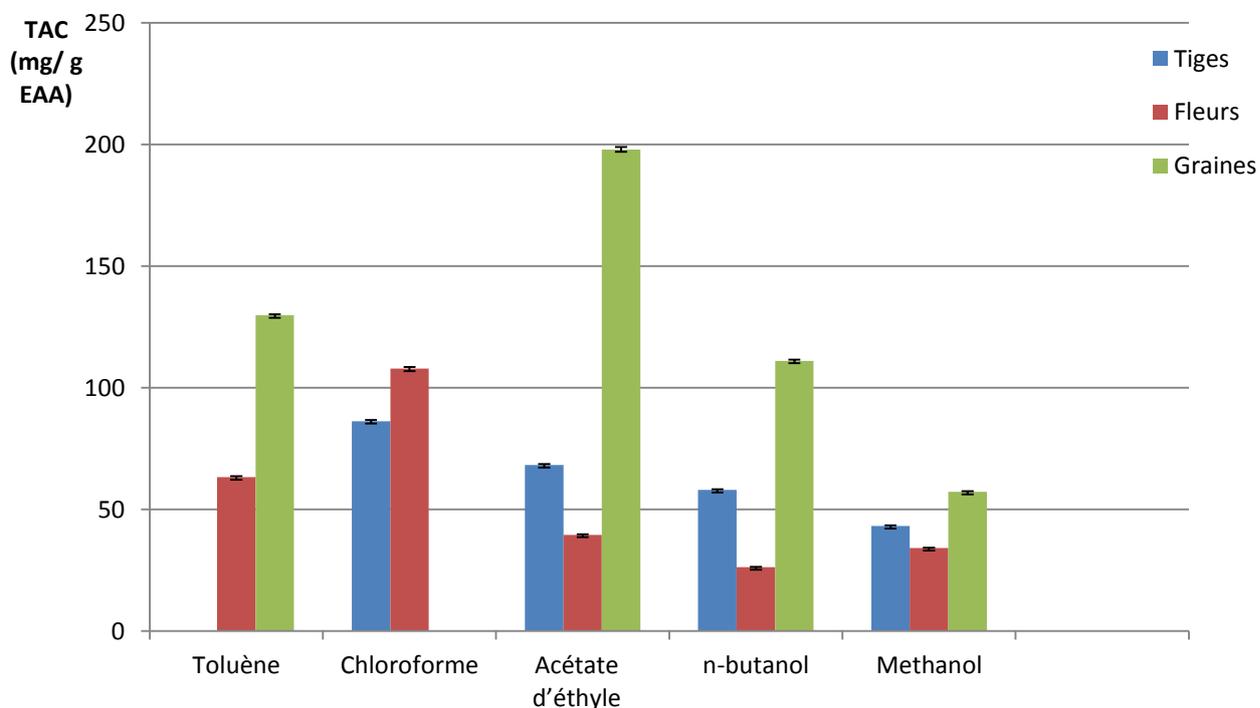


Figure 30 : La capacité antioxydante totale des différents extraits des graines, tiges et fleurs de *Retama monosperm*

Le pouvoir antioxydant d'un composé est d'autant plus élevé lorsque son IC_{50} est faible. Tous les extraits présentent IC_{50} plus élevé que l'acide ascorbique. (Fig. 31)

Tous les extraits présentent une activité antioxydante contre le DPPH plus faible que l'acide ascorbique, ce dernier à un IC_{50} de 0.05mg/ml

La fraction d'acétate d'éthyle des graines présente un IC_{50} le plus faible (0.15mg/ml) donc c'est la fraction qui porte les molécules à pouvoir antioxydant le plus élevé, suivie de la fraction du toluène des graines (IC_{50} : 0.31 mg/ml).

La fraction butanolique des fleurs à une concentration de 10 mg/ml n'arrive même pas à éliminer 20% du DPPH. (Fig. 31. C)

1.6) Relation entre composés phénoliques et activité antioxydante :

Nous avons cherché à établir une relation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits ; le coefficient de corrélation (r).

En établissant la relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins, on trouve une très bonne corrélation a été établit avec les flavonoïdes ($r = 0,912$), et une bonne corrélation aussi avec les phénols totaux ($r = 0.78$), mais cette corrélation est très faible avec les tannins ($r = 0.26$). (Figure 32)

De même il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en tannins condensés et IC_{50} du DPPH, ($r = 0.3$). Cette corrélation elle est négative et importante (-0.79) avec les flavonoïdes et peu importante (-0.66) avec les phénols totaux. (Figure 33).

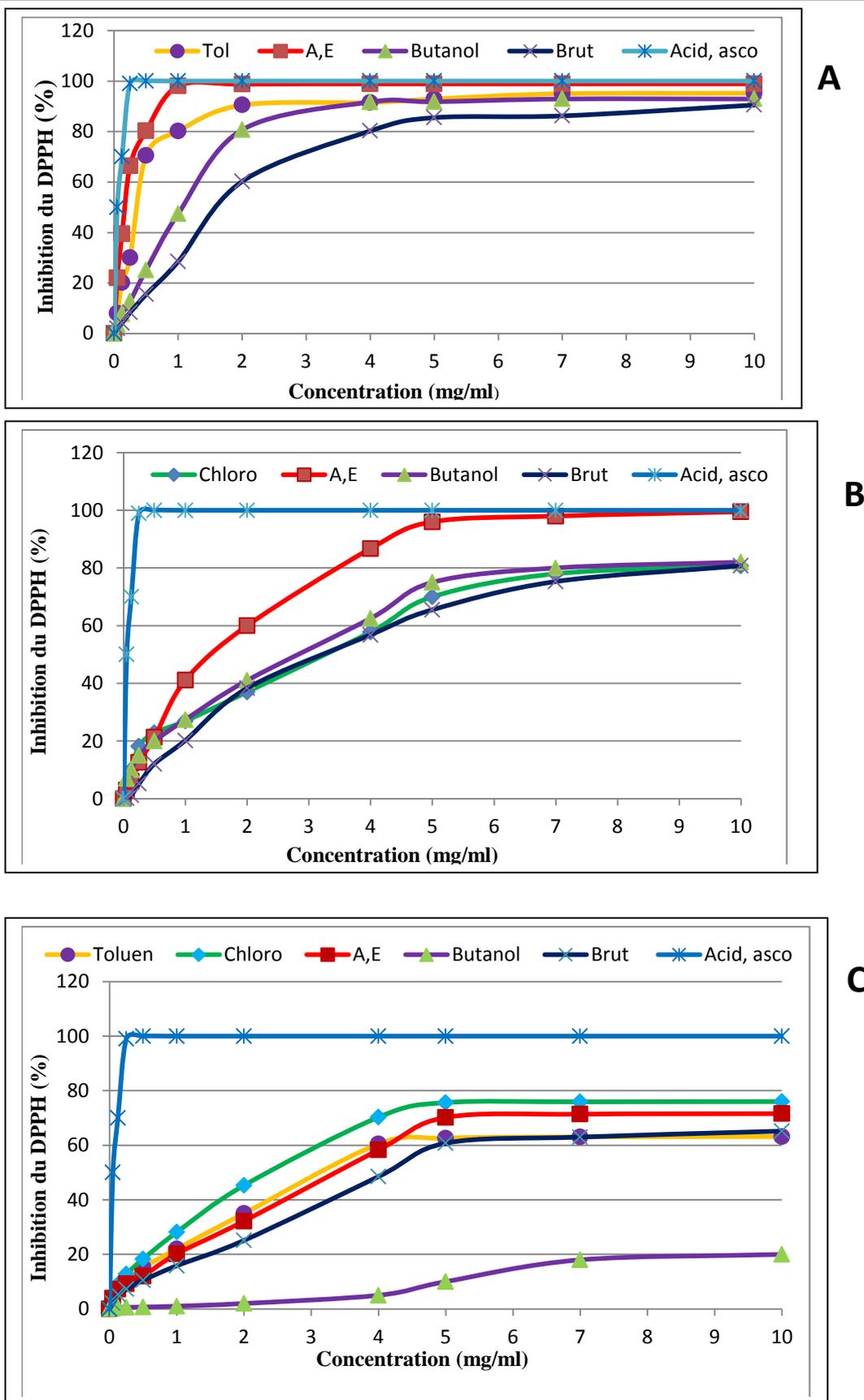


Figure 31: Activité antioxydante des différents extraits et leurs fractions (Toluène., (chloro) Chloroforme., (A,E) Acétate d'éthyle., Butanol. , l'extrait brute (Brut))de *Retama monosperma* et le témoin (Acid,Asco) acide ascorbique. **A** : graines, **B** : tiges, **C** : fleurs

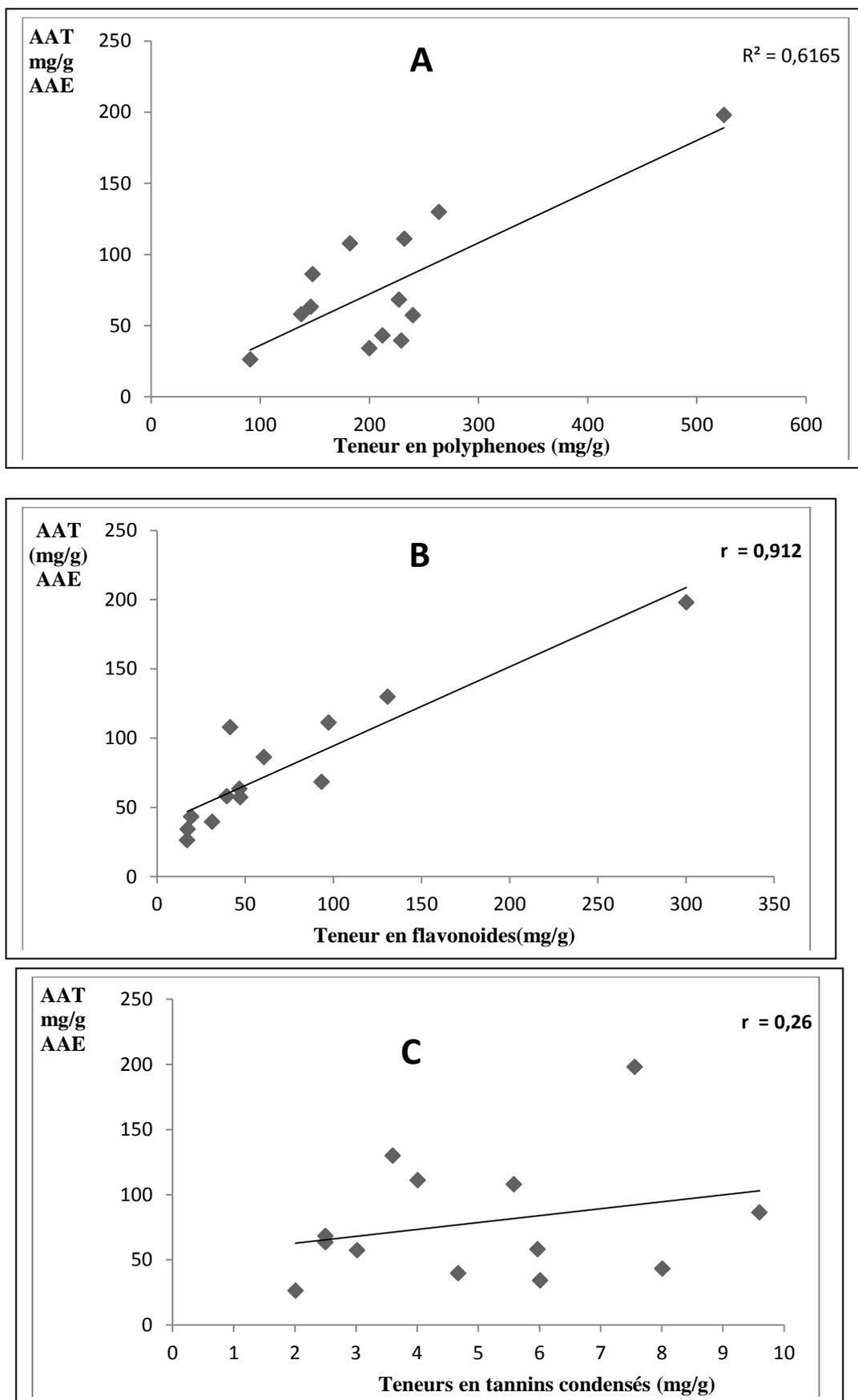


Figure 32 : Relation entre l'activité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B) et les tanins condensés (C).

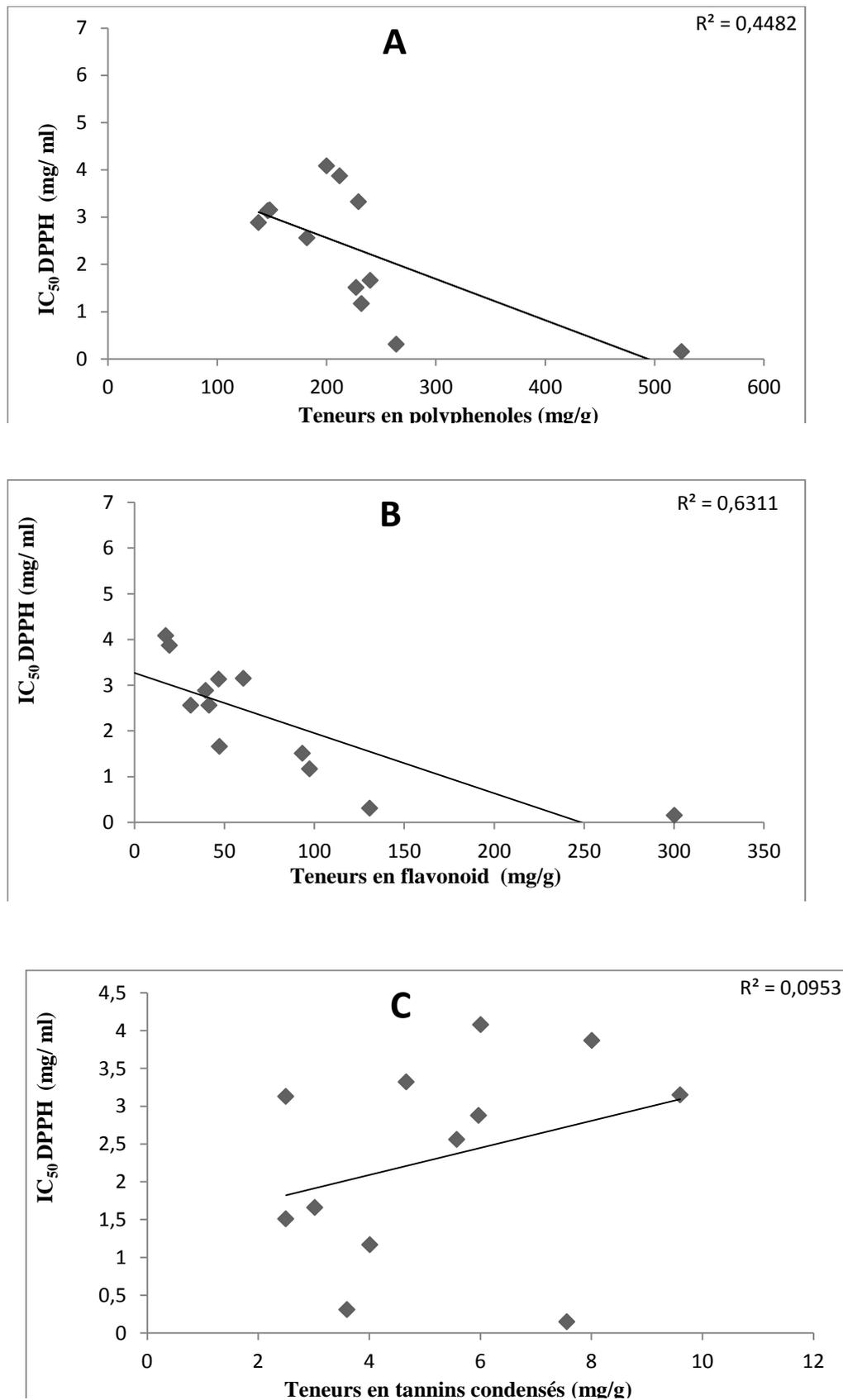


Figure 33 : Corrélation entre la réduction du DPPH exprimée en valeur IC₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B) et les tanins (C)

2) Discussion :

La caractérisation phytochimique effectuée pour la première fois sur *Retama monosperma* montre que les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les sucres réducteurs sont présents dans les trois organes, ceci justifie sa résistance contre les forts ensoleillements « radiations U. V » et sa propre protection contre les herbivores du fait que *Retama monosperma* elle n'est pas broutée par le bétail.

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles (**Treutter, 2005**).

Les enzymes entrant dans la biosynthèse des flavonoïdes sont inductibles par les UV, en particulier le glucose-6-phosphatase déshydrogénase, la 3-déoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase et la S-Adénosyl- homocystéine hydrolase (**Zhang et al., 2009**).

Les flavonoïdes peuvent aussi avoir un effet négatif comme substances antiappétantes, comme réducteurs de la digestion et comme toxines.

La production des alcaloïdes quinolozidines et bipipéridines constituent un moyen de défense essentiel pour les plantes, elles sont toxiques pour les animaux (les symptômes sont des crampes, des vomissements et même la mort par une paralysie respiratoire). Les alcaloïdes quinolizidines sont des neurotoxines, interfèrent avec le système nerveux des animaux, affectant principalement les récepteurs de l'acétylcholine nicotiques et muscariniques (**Wink, 1998**).

Certains alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par UV, ainsi leur goût amer repousse et leur toxicité affaiblit puis tue les herbivores.

Les saponines sont utilisées contre les herbivores et les microorganismes, notamment des champignons et des virus. (**Wink, 2003**). Une fois ingérés, les saponosides provoquent des effets caustiques et d'importantes irritations gastriques ; ils sont à l'origine de certaines météorisations spumeuses car ils forment des mousses stables. Les saponosides sont tenus pour responsables des photosensibilisations hépatogènes provoquées chez le mouton par diverses espèces d'*Agave* spp., *Panicum* spp. ou *Tribulus terrester*. Les génines, isomérisées et glucuroconjuguées, cristallisent et se transforment en glucuronates insolubles qui obstruent les voies biliaires : il en résulte la rétention de la phylloérythrine photodynamisante (**Kazi Tani, 2014**)

Les tanins sont des composés phénoliques qui se lient aux protéines, notamment les enzymes digestives, ce qui donne des « lourdeurs d'estomac ». Leur astringence, une sensation gustative très désagréable, qui est une de leurs caractéristiques. (**Kazi Tani ; 2014**)

La détection des terpénoïdes uniquement dans les fleurs et les graines dues à leurs interventions dans la reproduction ; les plantes font souvent appel à d'autres organismes pour disperser le pollen et les graines. À cet effet, des composés volatils libérés des fleurs et des fruits (**Knudsen et al., 2006**) servent à attirer les pollinisateurs en particulier les monoterpènes et les sesquiterpènes qui sont des bons vecteurs d'information à distance parce que ces molécules lipophiles ont un faible poids moléculaire et une pression de vapeur élevée à la température ordinaire.

Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animales (**Langenheim, 1994**). Certains terpènes sont toxiques vis-à-vis de certains insectes (**Justicia et al., 2005**) ou nématodes (**Lorimer et al., 1996**), cette action s'effectue par une action directe sur les récepteurs du goût (**Messchendorp et al., 2000**). L'action des terpènes peut s'exercer comme dans le cas des insectes par des saveurs indésirables qui conduisent à une aversion contre les plantes contenant ces substances. Par ailleurs, les terpènes peuvent influencer l'ingestion indirectement par des voies post-ingestives comme la réduction de la digestion (**Robbins et al., 1987**), la toxicité générale sur l'animal et l'acidose sanguine (**Foley, 1992**).

Cette caractérisation phytochimique indique aussi, l'absence des composés cyanogénétiques, des anthocyanes, des quinones et des anthraquinones ceci est due probablement à des facteurs externes; l'âge, le climat, le sol, la période de la récolte... etc., influent sur la concentration d'un constituant actif dans la plante. (**Banerjee et Bonde, 2011**). Parfois, l'influence de ces facteurs peut conduire même à l'absence de constituants actifs dans la même espèce récoltée de différentes stations (**Trease et Evans, 2002**).

La différence des rendements des extraits bruts et de leurs fractions résulte de la différence de polarité des solvants et la nature chimique des molécules correspondante à chaque extrait. Selon **Dai et Mumper (2010)** le rendement de l'extraction dépend du solvant en particulier

sa polarité, le temps et la température d'extraction le rapport ou ratio solide-liquide, ainsi que la composition chimique et les caractéristiques physiques des échantillons, telle que la taille des particules de l'échantillon. L'abaissement de la taille des particules améliore également le rendement en composés phénoliques (**Nepote et al., 2005**)

Les solvants moins polaires sont considérés comme étant appropriés pour l'extraction des composés phénoliques lipophiles (**Alothman et al., 2009**).

La chromatographie sur couche mince montre une diversité de coloration des spots après révélation par la vanilline sulfurique, ce dernier est un réactif polyvalent à spectre large et il permet la détection des molécules de classes chimiques différentes.

Plusieurs auteurs utilisent ce réactif comme révélateur non spécifique, il réagit avec de nombreux composés tels que les terpénoïdes, les stérols, les alcaloïdes et avec tous les composés lipophiles, formant des spots de couleur foncée (**Waksmundzka-Hajnos et al., 2008**).

Janicsak et al. (1999) ont montré que certains acides phénoliques réagissent avec la vanilline sulfurique en formant des spots pourpres ou violets clairs.

La vanilline sulfurique permet de détecter plusieurs molécules du métabolisme secondaire tel que les phénols, les stéroïdes, les glycosides, des saponines, des hydrates de carbone et les terpènes (**Sherma et Fried, 2003**). Selon **Spangenberg et al. (2011)** il permet la révélation des stéroïdes, des huiles essentielles, des terpènes, des caroténoïdes, des phénols, catéchine, des flavonoïdes, des ginsénosides, des acides gras, et des antibiotiques.

Dans le solvant de migration: AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11: 11: 20) considéré comme solvant polaire nous avons visualisé pratiquement dans tous les extraits deux spots majoritaires de R_f 0.75 et 0.71 sous UV 254, alors que cette même plaque ne montre aucun spot sous UV 366.

La majorité des molécules des solutés des extraits du toluène et du chloroforme et l'acétate d'éthyle des graines atteignent le front de migration de l'éluant et n'ont pas été retenues par la phase stationnaire ce qui signifie que le solvant est très polaire.

Le solvant de migration ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10) considéré comme solvant moyennement polaire permet une meilleure séparation des molécules extraites par le toluène, le chloroforme et l'acétate d'éthyle des graines. Cette bonne séparation des molécules résulte de la polarité du solvant qui est voisine à celle des solutés à séparer.

Les spots de R_f de 0.69 ; 0.61 et 0.51 de la fraction chloroformique des tiges et 0.69 et 0.51 de la fraction chloroformique des fleurs et de 0.71 ; 0.69 et 0.51 de la fraction du toluène des fleurs sont détectés uniquement sous UV 254 nm et sont absents sous UV 366 nm ce qui signifie que ces spots correspondent à des molécules des classes chimiques différentes.

La bio-autographie par chromatographie sur couche mince est un moyen de détection de l'activité biologique d'un échantillon qui a migré sur la plaque à l'aide d'un solvant approprié. La technique ne nécessite que de petite quantité d'échantillon. Permet l'étude d'un mélange complexe d'un extrait végétal et peut être aussi utilisé pour l'isolement de ces constituants.

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 38). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la transformation de la coloration bleue. Dans le cas des composés phénoliques (RH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH[•] alors neutralisé en une molécule stable DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune (Molyneux, 2004).

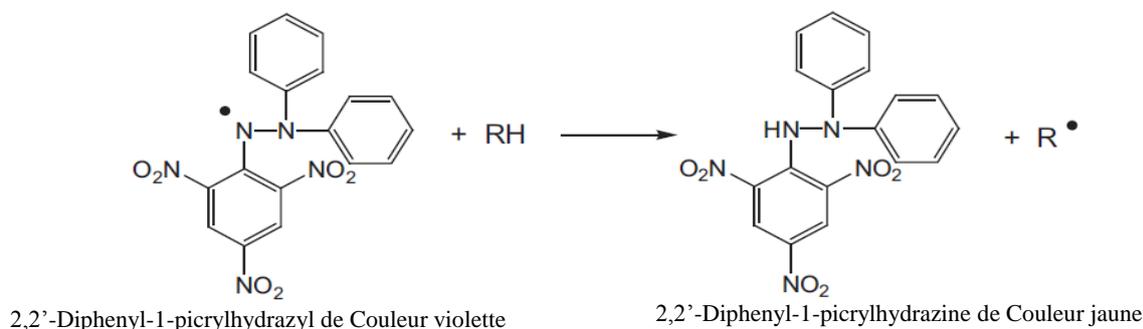


Figure 34 : La réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl radical avec des capteurs de radicaux (RH)

La bio-autographie de l'activité antioxydante par DPPH des différents extraits de *Retama monosperma* a bien montré que les fractions d'acétate d'éthyle et la fraction du toluène des graines présentent trois spots majoritaires bien séparés dont leurs R_f sont 0.12, 0.21 et 0.46 avec le solvant de migration ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10), ce qui indique que ces fractions possèdent des molécules à activité antioxydante intéressante.

Par contre la fraction butanolique des graines ne montre aucune activité antioxydante contre le DPPH par bio-autographie.

Les résultats de l'analyse colorimétrique par spectrophotomètre des polyphénols totaux montrent que les fractions d'acétate d'éthyle sont les plus riches en polyphénols totaux, alors, que la quantité la plus faible en ces composés a été trouvée dans les fractions butanoliques.

La quantification des polyphénols totaux concorde parfaitement avec les résultats de la CCM, où nous n'avons trouvé pratiquement aucun spot dans la fraction butanolique des fleurs et des spots bien prononcés et bien séparés dans la fraction d'acétate d'éthyle des graines.

Nos résultats sont complètement différents de ceux trouvés chez une espèce du même genre *Retama* ; *Retama reatam* de Tunisie où la fraction butanolique des fleurs qui est la plus riche en polyphénols (220.81 mg CAE/g) flavonoïdes (54.97 mg CAE/g) et c'est les tannins qui dominent avec une teneur varie entre 325.31 et 379.12 mg CAE/g. (Edziri *et al.*, 2008), ces différences sont probablement dues à la position biogéographique des deux espèces, *Retama monosperma* est une espèce côtière alors que *Retama reatam* est une espèce subsaharienne et saharienne.

Le contenu phénolique des écorces et des tiges dans différents extraits de *Caesalpinia pyramidalis* (Caesalpinaceae) du Nord-Est du Brésil a été évalué par Silva *et al.*, (2011) ; les phénols totaux variaient entre 135.55 et 459.79 mg d'acide tannique équivalents par gramme d'extrait sec (mg TAE/g) et de 114.55 à 370.40 milligrammes équivalent à la rutine par gramme d'extrait sec (mg RE/g) en flavonoïdes.

La solubilité des polyphénols dépend principalement des groupes hydroxyle, la taille des molécules et la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

La quantité des composés phénoliques dans un extrait végétal est influencée par la nature chimique des composés, ainsi que la méthode d'analyse, la sélection des standards et la présence de substances interférentes (Naczki *et Shahidi*, 2006).

En raison de l'hétérogénéité des composés phénoliques naturels et du possible de l'interférence des autres substances facilement oxydés dans les matières végétales, plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination des composés phénoliques totaux mais aucune n'est parfaite. Parmi ces méthodes on a la technique du Folin-Ciocalteu qui est la plus utilisée et présente le moins d'inconvénients. Elle repose sur le transfert des électrons dans un milieu alcalin des composés phénoliques au complexe acide phosphomolybdique / phosphotungstique pour former des complexes bleus (Singleton *et al.*, 1999).

Pour la première fois, nous avons évalué les propriétés antioxydantes de *Retama monosperma*

Le test du PhosPhoMolybdate (PPM) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'échantillon. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) (Prieto *et al.*, 1999).

La capacité antioxydante totale la plus élevée dans les différents extraits de *Retama monosperma* a été déterminée dans la fraction d'acétate d'éthyle des graines avec un taux de 197.95 mg EAA / g, suivie par la fraction de toluène des graines avec une capacité de 129.8 mg EAA / g, cette capacité se rapproche de celle trouvée dans la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Albizia procera* (Mimosaceae) ; 181.16 mg EAA / g (khatoon *et al.*, 2013). Alors qu'elle est très faible chez *Dolichos biflorus* (Papilionaceae) ; 0.058 mg EAA / g dans l'extrait d'acétate d'éthyle obtenue par une percolation continue de 24 heures par Soxhlet (Karri-Nanaji *et al.*, 2011)

Le test de l'activité antioxydante par DPPH confirme les résultats trouvés par le test du PhosPhoMolybdate dont les fractions d'acétate d'éthyle et du toluène présentent respectivement des IC₅₀ de 0.15 mg/ml et 0.31 mg/ml, ces IC₅₀ sont les plus faibles parmi les différents extraits donc seront considérés comme les plus puissants. Néanmoins ces deux fractions présentent aussi les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes.

Par contre le pouvoir réducteur de la fraction butanolique est très faible dans les deux tests. Ces résultats confirment les résultats du screening des activités antioxydantes par bioautographie, où l'extrait du toluène et l'extrait d'acétate d'éthyle des graines ont des résultats positifs tandis que l'extrait butanolique des fleurs donne un résultat négatif.

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (Molyneux, 2004).

Le travail réalisé sur les fleurs de *Retama reatam* de la station de Kerker (Tunis) montre que la fraction qui présente la meilleure activité antioxydante vis-à-vis du DPPH est la fraction d'acétate d'éthyle avec un IC₅₀ de 0.4 mg/ml. (Edziri *et al.*, 2008). À partir de cette fraction, deux molécules ont été isolées et identifiées, sont responsables des activités antioxydantes, antivirales, cytotoxiques, antibactériennes et antifongiques, ces deux molécules correspondent à un Licoflavone C qui est une flavone avec une formule chimique C₂₀H₁₈O₅ et un Derrone qui est un isoflavone de formule chimique C₂₀H₁₆O₅ (Edziri *et al.*, 2012)

L'étude de l'activité antioxydante de neuf espèces de la famille des fabacées par (Godevac *et al.*, 2007) montre que cette activité varie d'une espèce à une autre le IC₅₀ du DPPH peut aller de 0.013 mg/ml chez *Trifolium pannonicum* au 0.156 mg/ml chez *Astragalus glycyphyllos*.

Luo *et al.*, 2010 ont évalué l'activité antioxydante des composés phénoliques de diverses fractions de l'extrait brute éthanolique de *Dracaena cambodiana* (Asparagaceae) et ils ont observé que la fraction d'acétate d'éthyle contenait la teneur la plus élevée de phénols totaux et présente la plus grande capacité de piégeage des radicaux libres (IC₅₀ du DPPH : 1.61 mg/mL).

L'étude des corrélations entre les différentes molécules étudiées et leurs pouvoirs réducteurs montrent que les flavonoïdes présentent les coefficients de corrélation les plus importants dans les deux tests, ainsi que lorsque la quantité des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes est plus élevée, la concentration inhibitrice du DPPH sera plus faible c'est la raison pour laquelle leurs régressions linéaires ont été négatives. Par contre aucune corrélation n'est détectée entre les tannins condensés et les activités antioxydantes.

Plusieurs travaux similaires ont été réalisés dans ce sens, présentent des résultats similaires. Une corrélation négative a été obtenue avec le même test et le contenu en flavonoïdes ($r = -0.709$) et les composés phénoliques totaux ($r = -0,731$) dans les graines de soja (**Dajanta et al., 2013**).

L'étude de la capacité antioxydante dans 92 extraits obtenus à partir de 27 espèces appartenant aux différentes familles de la forêt tropicale de la Malaisie, indique une corrélation négative très significative entre le DPPH et les teneurs totales du contenu phénolique pour les 92 extraits avec ($r = -0,821$) (**Clarke et al., 2013**).

Cette corrélation négative entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante DPPH a été aussi déterminé chez cinq variétés de *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) avec un ($r = -0.826$) (**Rumbaoa et al., 2009**).

Plusieurs travaux de recherche montrent que l'activité antioxydante est en étroite relation avec la structure des flavonoïdes, en particulier : les groupes hydroxyle, *O*-méthylation, la double liaison 2-3 et la fonction 4-oxo, les fractions glucidiques et le degré de polymérisation.

La position et le nombre total de groupes hydroxyle influencent sensiblement différents mécanismes de l'activité antioxydante (**Burda et Oleszek, 2001**). La capacité de piégeage des radicaux libre est principalement attribuable à la réactivité élevée de substituant hydroxyles qui participent à la réaction suivante : $F-OH + R^{\bullet} \rightarrow F-O^{\bullet} + RH$

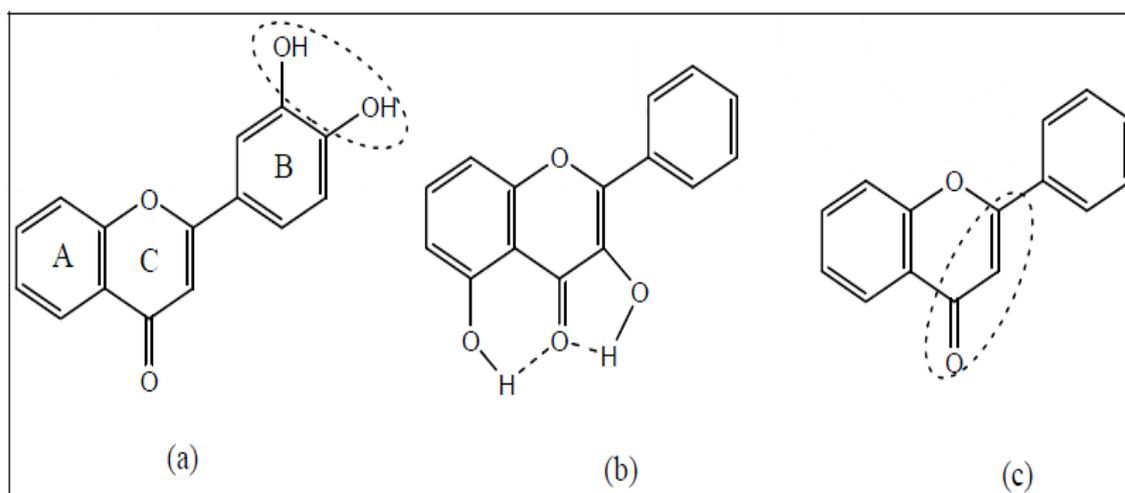


Figure 35 : Les relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes, **(a)** groupement catéchol de l'anneau B, **(b)** présence de groupes hydroxyle à la position 3 et 5, **(c)** la double liaison 2,3 en conjugaison avec une fonction 4-oxo d'un groupe carbonyle en cycle C.

La configuration des hydroxyles du cycle B est le facteur le plus important pour le piégeage des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives de l'azote, car il cède un hydrogène et un électron à un hydroxyle, à un peroxyde, et à des radicaux peroxydite, ce qui permet de les stabiliser et donnant ainsi naissance à un flavonoïde radical relativement stable. (Sekher-Pannala *et al.*, 2001).

La structure 3',4' catéchol dans le cycle B améliore l'inhibition de la peroxydation lipidique. (Dugas *et al.*, 2000). Cette disposition fait des flavonoïdes des piègeurs les plus puissants de peroxyde (Dugas *et al.*, 2000) superoxyde (Cushnie et Lamb, 2005) et des radicaux de peroxydite (Haenen *et al.*, 1997). L'oxydation d'un flavonoïde se produit sur le cycle B lorsque le catéchol est présent (Acker-Van *et al.*, 1996), ce qui donne un radical assez stable ; ortho-semiquinone (Arora *et al.*, 1998).

Les hydroxyles 3- et 5- avec la fonction 4-oxo dans les cycles A et C, sont essentiels pour augmenter le potentiel de piégeage des radicaux. (Bors et Michel, 2002)

L'hétérocycle des flavonoïdes contribue à l'activité antioxydante par la présence d'un 3-OH libre, et permettant la conjugaison entre les noyaux aromatiques (Burda et Oleszek, 2001).

Les flavonoïdes avec un 3-OH et 3', 4' catéchol sont signalés à être 10 fois plus puissantes que le ebselen, un piègeur connu contre peroxydite (Haenen *et al.*, 1997).

Plusieurs travaux montrent que la *O*-méthylation des groupes hydroxyle des flavonoïdes diminue leur capacité de piégeage des radicaux (Ollila *et al.*, 2002).

La distinction entre les différentes classes structurales des flavonoïdes est la présence ou l'absence d'une liaison insaturée en 2-3 en conjugaison avec une fonction 4-oxo. Les flavonoïdes avec une double liaison 2-3 en conjugaison avec un groupe de 4-carbonyle présentent des valeurs de IC₅₀ plus faible (indicatif de forte activité antioxydante) par rapport à ceux avec des hétérocycles saturés (Cholbi *et al.*, 1990).

La présence, la position, la structure, et le nombre total de fragments de sucre en flavonoïdes (flavonoïdes glycosides) jouent un rôle important dans l'activité antioxydante. Les aglycones sont des antioxydants plus puissants que leurs glycosides correspondants (Williamson *et al.*, 1999).

L'augmentation de degré de polymérisation augmente l'efficacité de procyanidines contre une variété d'espèces radicalaires. Les dimères de procyanidine et les trimères sont plus efficaces que les flavonoïdes monomères contre l'anion superoxyde. Tétramères présentent une plus grande activité contre le peroxyde d'hydrogène et superoxyde, tandis que heptamères et hexamères démontrent une propriété de piégeage nettement plus supérieure que les trimères et les tétramères (**Wang et al., 2000**).

L'activité antioxydante et le contenu des différentes classes de polyphénols dans les extraits hydro-acétonique 70% dans les graines de 20 hybrides de soja ont été évalués par **Malenčić et al. (2008)**, les résultats indiquent que les tannins sont les composés majoritaires. Ainsi l'activité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits d'hybrides qui présentent les quantités les plus élevées en tannins condensés.

Abaza et al. (2011) ont révélé que les solvants d'extraction ont une influence significative sur les propriétés antioxydantes de feuilles d'Olivier, et la capacité antioxydante (IC₅₀ du DPPH) dépend beaucoup plus des flavonoïdes que les phénols totaux.

Une étude comparative sur l'effet des solvants d'extraction sur le rendement des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) et les activités antioxydantes chez les légumineuses, montre que les extraits d'acétone 80% présentaient la plus forte teneur en tanins condensés et la plus grande capacité de piégeage des radicaux libre par le test DPPH pour le pois jaune, pois verts, pois chiches et le soja jaune (**Xu et Cang, 2007**).

Une autre étude réalisée par **Karamać et al. (2007)** qui ont utilisé une gamme de solvant (eau, méthanol, éthanol, eau-éthanol, eau - méthanol, acétone, eau- acétone, diméthylformamide-eau) pour l'extraction de divers groupes de composés phénoliques des graines de différentes espèces appartenant à la famille des Fabacée ; haricots rouges, lentilles rouges, lentilles vertes, fèves, féverole et vesce, les résultats montrent que l'acétone 80% assure une extraction plus complète des tanins jusqu'à 45% d'extraits brutes, et une bonne activité antioxydante des extraits obtenus. Les fractions de tannins obtenus ont été caractérisés par une réaction colorée avec le réactif de vanilline / HCl et la capacité de précipitation du (BSA) Bovin Serum Albumine.

Toujours dans la famille des Fabacées, la fraction des tanins extraits par l'acétone des haricots rouges et le pois, présente une activité antioxydante plus forte que la fraction méthanolique qui ne porte que les composés phénoliques de faible masse moléculaire et les sucres (**Amarowicz et al., 2005**)

Le méthanol est plus efficace pour l'extraction des polyphénols de faibles poids moléculaires, tandis que les polyphénols de haut poids moléculaire tel que les tannins condensés sont mieux excrétés avec de l'acétone aqueuse (**Labarbe et al., 1999**).

Tous ces auteurs qui ont travaillé sur les tannins de la famille des Fabacées indiquent qu'une extraction avec de l'acétone à 80% suivi par une chromatographie sur colonne Sephadex LH-20 avec l'utilisation d'acétone 50% comme phases mobiles est la meilleure méthode pour l'étude des tannins.

Chez d'autres familles, et toujours dans le cadre de la recherche du solvant adéquat pour l'extraction des tannins, l'extrait d'acétone 80% est le solvant le plus efficace pour l'extraction des tanins condensés (jusqu'à 542 mg ECt/ gEs) chez *Corylus avellana* L (Bétulacées); de même cet extrait présente l'activité antioxydante (beta-carotene) et l'activité antiradicalaire (DPPH) la plus élevée. Suivi par l'éthanol 80%. (**Alasalvar et al., 2006**). Cependant ; aucune relation significative entre l'activité antioxydante (DPPH et ABTS) et les tanins condensés, issus des extraits hydro-methanolique (70%) et de leurs fractions (dichloromethane, butanol et d'acétate d'éthyle) des feuilles de *Halimium halimifolium* (Cistaceae) (**Rebaya et al., 2015**)

En comparaison de nos résultats avec les résultats cités ci-dessus, on constate que les quantités faibles des tannins condensés par rapport aux composés phénoliques totaux sont dues principalement à leurs faibles solubilités dans les solvants choisis dans cette étude.

Conclusion et perspectives

La caractérisation phytochimique des principales classes du métabolisme secondaire indique la présence et en abondance chez *Retama monosperma* des flavonoïdes et les alcaloïdes, qui ont une activité thérapeutique confirmée. Ces caractérisations montrent aussi l'absence d'anthocyanes, des quinones, et des antraquinones dans les trois organes. Alors que les saponosides et les terpenoides ne sont présents que dans les fleurs et les graines.

La recherche du solvant le mieux adapté pour le meilleur rendement d'extraction indique que *Retama monosperma* est riche en composés polaires, et très pauvre en composés apolaires. L'acétate d'éthyle est le solvant adéquat pour extraire les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes, ceci a été confirmé par les résultats du dosage des molécules concerné par spectrophotomètre et par les résultats obtenus de l'analyse par chromatographie sur couche mince.

Le solvant de migration composé de ACOET-MeOH-H₂O (100:13.5:10) permet la meilleure séparation des constituants des différents extraits, ce qui permet dans une recherche future de l'utiliser pour isolé les molécules qui ont donné des résultats positifs avec le DPPH.

L'analyse des composés phénoliques varie beaucoup en fonction de la nature des composés à analyser. On devrait tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels: la polarité, et la technique d'extraction, pour augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage.

Aucune donnée bibliographique n'est aujourd'hui disponible sur les activités biologiques de *Retama monosperma*, ce qui constitue l'un des intérêts de notre étude. Pour la première fois, nous avons évalué les propriétés antioxydantes de *Retama monosperma*.

En comparant les résultats des différents organes, on peut dire que la forte teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes des extraits étudiés contribuent en grande partie à leur activité antioxydante. Ces résultats sont confirmés par les coefficients de corrélation obtenus.

Les graines possèdent l'activité antioxydante la plus importante alors que les tiges et les fleurs sont les moins actives. Ainsi, il peut être suggéré que l'activité antioxydante de cette fraction soit due à la présence de composés phénoliques concentrés soit renferme des antioxydants puissants.

Il manque des données structurales pour déterminer quelle molécule apporte l'activité antioxydante dans cette fraction. Donc il nous a paru intéressant d'aller plus loin dans

l'identification des molécules majoritaires et notamment celles présentes dans la fraction active d'acétate d'éthyle des graines.

L'utilisation d'autres solvants d'extraction en particulier l'acétone pour l'étude des tannins condensés.

Ainsi l'utilisation d'autres procédés d'extraction en fonction des composés phytochimiques à étudier en tenant compte aussi d'autres facteurs, comme le pH, la température, le ratio quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions sont indispensables pour améliorer le rendement d'extraction et en particulier les molécules biologiquement actives.

Autres activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire, ainsi l'identification des molécules actives de la fraction acétate d'éthyle par HPLC sont nécessaires pour valoriser cette espèce dans le domaine pharmaceutique.

Références bibliographiques

Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub-Haddada, F., Methenni, K., Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *grasas y aceites* 62 (1), 96-104.

Abd El Mohsen, J P., Minihane, MM., Mathers, AM JC. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* 99:12–22.

Acker-Van S A B E., De Groot, M J, Van-Den, B D J., Tromp M N J L., Den-Kelder, G D O., Van-Der W J F., Bast A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid, *Chem Res Toxicol* 9 : 1305–1312.

Aimé, S., Marie-Josée, P. (1982). Le complexe dunaire du Cap Falcon (Oran). Etude morphodynamique appliquée et perspectives d'aménagement . In: *Méditerranée, Troisième série, Tome 45, 2-*. pp. 3-13.

Alasalvar, C., Grigor, J M., Zhang, D., Quantick, P C., Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (49) 1410-1416.

Alothman, M., Bhat, R., Karim, A A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* 115, 785-788.

Amarowicz, R., Troszyńska, A., Barylko-Pikielna, N., Shahidi, F. (2005). Polyphenolics extracts from legume seeds: Correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. In *Journal of Food Lipids*, 11 (4): 278-286.

APG III. The Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105-121.

Arora, A., Nair, M G., Strasburg, G M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, *Free Radic Biol Med* 24 : 1355–1363.

Banerjee, S K., Bonde, C G (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa Spreng* Bark: Impact of dielectric constant and geographical location. *J. Med. Plants Res.* 5:817-822.

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri Y., Fernández de Mattos, S., Amzazi, S., Villalonga, P. (2014). *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. *BMC Complement Altern Med.* 14:38.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. (Paris, France: Ibis Press), p. 676

Belmokhtar, Z. (2005). Analyse qualitative et quantitative des protéines totales du genre *Retama* : *R. monosperma*, *R. raetam* et *R. sphaerocarpa*. Thèse de magister (Université des Sciences et de la Technologie d'Oran : Mohamed Boudiaf (USTOMB)

Belmokhtar, Z., Kaid- Harche, M. (2012). Evaluation of Genetic Diversity in Three Species of *Retama* Genus: *R. monosperma*(L) Boiss, *R. raetam* (Forssk) Webb and *R. sphaerocarpa* (L) Boiss. (Fabaceae) Based on SDS-PAGE. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(2): 202-205

Benbacer, L., Merghoub, N., El Btaouri, H., Gmouh, S., Attaleb, M., Morjani, H., Amzazi, S., El Mzibri, M. (2012). Antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Inula viscosa* L. and *Retama monosperma* L. extracts in human cervical cancer cells. *In: Rajamanickam, editor. Topics on cervical cancer with an advocacy for prevention. InTech.*

Benmiloud-Mahieddine, R., Abirached-Darmency, M., Brown, S., Kaid-Harche, M., Siljak-Yakovlev, S. (2011). Genome size and cytogenetic characterization of three Algerian *Retama* species, *Tree Genetics & Genomes.* (7) 987–998

Benrahmoune, I Z. (2003). Invitation à l'Amour des plantes – Réserve biologique de Sidi-Boughaba. Éd. Scriptr. Al maarif al Jadida, Rabat 318 p

Bernard-Dagan, C., Carde, J.P., Gleizes, M. (1979). Étude des composés terpéniques au cours de la croissance des aiguilles du Pin maritime : comparaison de données biochimiques et ultrastructurales. - *Can. J. Bot.*, **57**, 255-263.

Bhat, S V., Nagasampagi, B A., Sivakumar, M. (2005)., *Chemistry of Natural Products.* Narosa, *New Delhi, India.*, 237p.

Bors, W., Michel, C. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 57-69.

Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs.* *Lavoisier.* 1403p.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technology* 28, 25–30.

Bravo, L (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* (56) 317–333.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris. 1120p

Burda, S., Oleszek, W. (2001): Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J Agric Food Chem* 49 2774–2779.

Carde, J P. (1976). Évolution infrastructurale du système sécréteur des canaux dans les aiguilles du Pin maritime - *Soc. Bot. Fr. Coll. Sécrét. Végét.*, 123, 181-189.

Cardoso, D., Pennington, R T., Queiroz, L P., Boatwright, J S., Van-Wyk, B E., Wojciechowski, M F., Lavin, M. (2013). Reconstructing the deepbranching relationships of the papilionoid legumes. *South African J. Botany*. 89: 58–75

Chappell, J. (1997). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol*. 107, 1-6.

Charon, J., Vindt-Balguerie, E., Launay, J. (1990). Ontogenèse des canaux sécréteurs d'origine primaire dans la jeune plante de *Pinus pinaster*. - *Can. J. Bot.*, 68, 2119-2126.

Cholbi, M R., Paya, M., Alcaraz, M J. (1990). Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation, *Experientia* 47 : 195–199.

Clarke, G., Kang, N T., Christophe, W., Jeffrey, F. (2013). High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*. 2, 1-10

Cristofolini, G. (1997). The biodiversity of the “Leguminosae-Genisteeae” and its genesis. *Lagasalia* 19: 121–128.

Cushnie, T. P. T., Lamb A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, (5). 343–356

Dai, J., Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.

Dajanta, K., Janpum, P., Leksing, W. (2013). Antioxidant capacities, total phenolics and flavonoids in black and yellow soybeans fermented by *Bacillus subtilis*: A comparative study of Thai fermented soybeans (thuanao). *Int Food Res J*; 20(6): 3125-3132.

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W M A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U A T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography* 1112: 31 - 63.

Dellafiore, C M., Gallego-Fernández, J B., Munoz-Vallés, S. (2010). The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as a seed disperser in a coastal dune system. *Plant Ecol.* 206,251–261.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K K., Liu, R H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 50:3010–3014.

Dewick, P M. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 12: 579-607.

Dixon, R A., Paiva, N L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* 7(7): 1085–1097.

Djabeur, A., Kaid-Harche, M., Taieb-Brabim-Bokhari., H., Selami, N., Sangare, M., Mahboubi. S. (2007). Contribution à la connaissance de deux rétames : *Retama monosperma* et *Retama reatam*, Revue des régions arides (2) : 572-578

Dugas, A J., Castaneda-Acosta, J., Bonin G C., Price, K L., Fischer N.H., Winston, G W. (2000). Evaluation of the total peroxy radicals scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships, *J Nat Products* 63:327–331.

Dupont, F., Guignard, J L. (2012). Botanique systématique moléculaire. Elsevier.15^{ème} édition, 336p.

Edziri, H., Mastouri, M., Ammar, S., Matieu, M., Patrich, G., Hiar R., Mahjoub, M, Ali Si Mohamed , Laurent, G., Zine-Mighri , Aouni, M. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:2933–2940

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, M., Zine-Mighri, Aouni, M., Verschaeve, L. (2012) Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Two Flavonoids from *Retama raetam* Flowers. *Molecules*, 17, 7284-7293.

ElShazly, A., Ateya, A M., Witte, L., Wink, M. (1996). Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*: *R-sphaerocarpa* and *R-monosperma*. *Journal of Biosciences* 51,301–308.

Fahn., A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. - *N. Phytol.*, 108, 229-257.

Fdil, R., El Hamdani, N., El Kihel, A., Sraidi, K. (2012). Distribution des alcaloïdes dans les parties aériennes de *Retama monosperma* (L.) Boiss. du Maroc. *Ann Toxicol Anal.* 24(3): 139-143

Ferradini, C., (1986). Espèces activées radicalaires de l’oxygène. *Biochimie*, 68 :779-785.

Foley, W J. (1992). Nitrogen and energy retention and acid-base status in the common ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*): evidence of the effects of absorbed allelochemicals. *Physiological Zoology* 65: 403-421.

Frankel, E .N, Kanner, J., Kinsella, J E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* ; 341 : 454-7.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique, novembre – décembre*, 91-96

Godevac, D, Gordana? Z., Katarina, Š., Vlatka, V., Nebojša, M. (2007). Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia* 79 : 185–187

Gonzalez-Mauraza, H., Martin-Cordero, C., Alarcon-de-la-Lastra, C., Rosillo, M A., Leon-Gonzalez, A J., Sanchez-Hidalgo, M. (2013). Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. *J Physiol Biochem.* 70:163–172.

Haase, P., Pugnaire, F I., Fernandez, E M., Puigdefa-Bregas, J., Clak, S C., Incoll, L D. (1996). Investigation of rooting depth in the semi-arid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss by labelling of ground water with a chemical trace. *Hydrol. (177)* 23-31.

Haenen, G R., Paquay, J B., Korthouwer., R E., Bast A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids, *Biochem Biophys Res Commun* .236 : 591–593.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean, *British Journal of Pharmacology*.142, 231–255

Halliwell, B. (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group / www.els.net*

Halliwell, B., Gutteridge, J M C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., *Oxford University Press*,. 888p

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 91(3C):14S-22S

Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-5563.

Hannane, F Z., Kacem, M., Kaid-Harche, M. (2014). *Retama*-rhizobia symbiosis studies in some countries of the Mediterranean Basin. *International Journal of Mediterranean Ecology*. Vol. 40 (1) 5-18

Harborne, J B., Herbert, B. (1995). Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. *Bristol: Taylor & Francis*. 791p

Harborne, J B. (1988). Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, *Ed: Chapman & Hall*, 302p

Haworth, R D. (1936). Natural resins. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, **33**, 266-279.

Hertog, M G L., Feskens, E J., Hollman, P C., Katan, M B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : The Zutphen Elderly Study. *Lancet*; 342 : 1007-11.

Hwang, C., Sinskey A J., Lodish, H F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum, *Science* 57 : 1496–1502.

Iriti, M., Faoro, F. (2004). Plant defense and human nutrition: the phenylpropanoids on the menu. *Curr. Top. Nutr. Res.* 2: 47-95.

Janicsak, G., Mathe, I., Miklossy-Vari, V., Blunden, G. (1999). Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**: 733-738.

Ji, L L., Fu, R., Mitchell, E W. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73, 1854-1859.

Jiang, Y F. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer, *Oncogene.* 21 : 2245–2252.

Justicia, J., Oltra, J E., Barrero, A F., Guadano, A., Gonzalez-Coloma, A., Cuerva, J M. (2005). Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by titanocene (III) - evaluation of their antifeedant activity. *European Journal of Organic Chemistry* 4: 712-718.

Karamać, M., Kosińska, A., Rybarczyk, A., Amarowicz, R. (2007). Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*. 57 (4) 471–474

Karoui, H., Hogg, N., Frejaville, C., Tordo, P., Kalyanaraman, B. (1996). Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite— ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.* 271 : 6000–6009.

Karri-Nanaji, R., Somasundarm, G., Satheesh-Kumar, D., Manavalan, R., Kottai-Muthu, A. (2011). Antioxidant potential of various extracts from whole plants of *Dolichos biflorus* (linn) evaluated by three in vitro methods. *International Research Journal of Pharmacy*. 2(3)252-256

Käss, E., Wink, M (1997) Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Mol Phylogenet Evol* 8:65–88

Kazi Tani, C. (2014): Les plantes dangereuses pour le bétail. Une première synthèse pour la flore d'Algérie, *Fourrages*, 217, 105-114.

Khatoon, M., Islam, E., Islam, R., Abdur Rahman, A., Alam, K., Khondkar, P., Rashid, M., Parvin, S. (2013). Estimation of total phenol and in vitro antioxidant activity of *Albizia procera* leaves *BMC Research Notes* 2013, 6:121: 2:7

Kliebenstein, D J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ.* 27: 675-684.

Knudsen, J T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Stahl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent (Appendix I: Distribution of Floral Scent Compounds at the Level of Plant Family). *The Botanical Review* 72: 1-120.

Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J M., Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2719-2723.

Laguerre, M., Lopez Giraldo, L J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante OCL. *Oléagineux corps gras lipides*, 14 (5) : 278-292.

Leger, C. (2006). Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *Ol Corps Gras Lipides* ; 13 : 59-69.

Lamarti, A., Badoc, A G., Deffieux-Cardé J P. (1994). Biogénèse des monoterpènes II - La chaîne isoprénique ; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133, 79 - 99

Langenheim, J H. (1994). Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280.

Lorimer, S D., Perry, N B., Foster, L M., Burgess, E J. (1996). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2842-2845.

Luo, Y., Wang, H., Xu, X., Mei, W., Dai, H. (2010). Antioxidant phenolic compounds of *Dracaena cambodiana*. *Molecules*. 15, 8904-8914.

Maire, R. (1987). Flore de l'Afrique du nord. Encyclopédie biologique L. Éd : de CHEVALIER. Paris. Volume XVI.300p.

Malenčić, D., Maksimović Z., Popović M., Miladinović J. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology* 99 : 6688–6691

Marcheix, J., Jacques-Fleuriet, A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires Romandes*. 92p

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 : 577–586.

Messchendorp, L., Gols G J Z., Van-Loon J J A. (2000). Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. *Entomology Experimental Applied* 95: 217-227.

McCord, J M., Fridovich, I. (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrom C reduction by a variety of electron carriers. *J. Biol. Chem.*, 245 : 1374-1377.

Merghoub, N., Benbacer, L., El Btaouri, H., Ait-Benhassou, H., Terryn, C., Attaleb, M., Madoulet, C., Benjouad, A., El Mzibri M., Morjani, H., Amzazi, S. (2011). *In vitro* antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cell. Mol. Biol.* 57 1581-1591.

Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.

Moss, G P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.*, 72, 1493-1523.

Munoz-Vallés, S., Juan, B., Gallego, F., Claudia, D., Jesús, C. (2013). Long-term spatio-temporal expansion of the native-invasive *Retama monosperma* on coastal dunes: Importance of land-use and natural dispersal vectors. *Flora* (4) 259–267

Nacz, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1523-1542.

Nauroy, J. (1954). *Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine traditionnelle (drogues végétales)*, th. doct. Univ. Paris (pharmacie), Paris, Jouve, In Unesco. *Recherches sur la zone aride – XIII – Les plantes médicinales des régions arides*, sur le site unesdoc.unesco.org/images/0006/000681/068198fo. Pdf. document consulté : 15/032013

Nepote, V., Grosso, N R., Guzman, C A. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 33-38.

Neves-Muniz, M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs. Thèse doctorat Université Joseph-Fourier - Grenoble I, French. p 16. Site : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00129103/document>, consulté le 02/06/2015

Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H., Slotte, J P. (2002). Characterization of flavonoid-biomembrane interactions, *Arch Biochem Biophys* 399:103–108.

Ouarghidi, A., Martin, G J., Powell, B., Esser, G., Abbad., A. (2013). Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *J Ethnobiol Ethnomed.* 9:1–13.

Palozza, P., Krinsky, N I. (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro* : an overview. *Methods in Enzymology* 213, 403-20

Perron, N R., Brumaghim, J L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys* 53:75–100

Price, M L., Van-Scoyoc, S., Butler, L G. (1978). A critical evaluation of the vanillic reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214–1218.

Prieto, P., Pineda, M., Aguillar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*; 269: 337-341.

Quezel, P et Santa, S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, Ed. CNRS, 475 p

Rahman, I., Adcock, I.M (2006). Oxidative stress and redox regulation of inflammation in COPD. *Eur Respir J*, (28), 219–242

Rahman, I. (2005). The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med.* 4:175–200.

Randall, R P. (2007). The Introduced Flora of Australia and its Weed Status. Edi: *CRC for Australian Weed Management*, 524p

Randall, J M. (1997). Weed Alert! New invasive weeds in California. In: *Sympos. Proc. California Exotic Pest Plant Council, Sacramento/California*, pp. 1–6.

Rebaya, A., Igueld-Belghith, S., Baghdikian, B., Mahiou-Valérie, L., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, K J., Trabelsi-Ayadi, M. (2015). Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *J App Pharm Sci*, 1 (01): 052-057.

Rejmanek, M., Randall, J M. (1994). Invasive alien plants in California: summary and comparison with other areas in North America. *Madrono* (41)161–177.

Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 526p

Robbins, C T., Hanley T A., Hagerman A E., Hjeljord, O., Baker, D L., Schwartz, C C., Mautz, W W. (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology* 68: 98-107.

Rumbaoa, R G O., Cornago, D F., Geronimo, I M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chem.* 113, 1133-1138.

Sekher-Pannala, A., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans, C.A., (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1161–1168.

Selami, N., Auriac, M C., Catrice, O., Capela, D., Kaid-Harche, M ., Timmers, T. (2014). Morphology and anatomy of root nodules of *Retama monosperma* (L.)Boiss. *Plant Soil* 379:109–119

Sherma, J., Fried, B. (2003). Handbook of Thin Layer Chromatography, published by *Marcel Dekker Inc., New York*. 1016p

Silva, C H T P., Sobrinho, T J S P., Castro, V T N A., Lima, D C A., Amorim, E L C. (2011). Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules*, 16, 4728-4739.

Singleton, V L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.

Singleton, V L., Rossi, J A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3), 144-158.

Spangenberg, B., Poole-Colin, F., Weins, C. (2011). Quantitative Thin-Layer Chromatography, *Ed: Springer* 388p

Touati, R., Sónia, A.O., Sílvia M., Belhamela, K., Silvestre J.D. (2015). *Retama sphaerocarpa*: An unexploited and rich source of alkaloids,unsaturated fatty acids and other valuable phytochemicals. *Industrial Crops and Products* (69) 238–243

Touati, D., Allain, P., Pellecuer, J., Fkih-tetouani, S., Agoumi, A. (1996). Alkaloids from *Retama monosperma* ssp. *Eumonosperma*. *Fitoterapia*. 67(1):49–52.

Trease, G E., Evans, W C. (2002). Pharmacognosy. 15th Ed. *London: Saunders Publishers;* 585p

Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*; 7: 581-591.

Turrens, J F., Alexandre, A., Lehninger, AL. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.

Valko, M., Rhodes, C J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40

Vásquez, G., Ribas-Marques, I. (1955). Alcaloïdes de Papilionaceas. Alcaloïdes de la *Genista monosperma* Lam. (*Retama monosperma*), XXVIII Congreso intern. de Quim. ind.. In Unesco. Recherches sur la zone aride – XIII – Les plantes médicinales des régions arides, document consulté sur le site unesdoc.unesco.org/images/0006/000681/068198fo. Pdf. Le 1503/2013

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska., T. (2008). Thin layer chromatography in phytochemistry. Vol. 99. *USA: CRC Press.* 896p.

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series*, 477-478.

Wang, J F., Schramm, D D., Holt R R., Ensunsa, J L., Fraga, C G., Schmitz, H H., Keen, C L A. (2000). Dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage, *J Nutr* 130 : 2115S–2119S.

Wardman, P ., Candeias., L P. (1996) .Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 145(5):523-31.

Wendt, K U., Schulz, G E. (1998). Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalysed by similar enzymes. *Curr. Biol.* 6, 127-133.

Wickens, A P. (2001). Aging and the free radical theory. *Respir Physiol* 128:379–91.

Williamson, G., Plumb, G W., Garcia-Conesa, M T. (1999). Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties, *Basic Life Sci* . 66: 483–494.

Wilson, R., Cunha, Márcio, L A S, Rodrigo, C., Sérgio, R A., Jairo, K B (2012). Lignans: Chemical and Biological Properties, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, *Dr Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, Available from:* <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/lignans-chemical-and-biological-properties>. consulté le 01/04/2015

Wink, M. (1998). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 225-233

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 64(1):3-19.

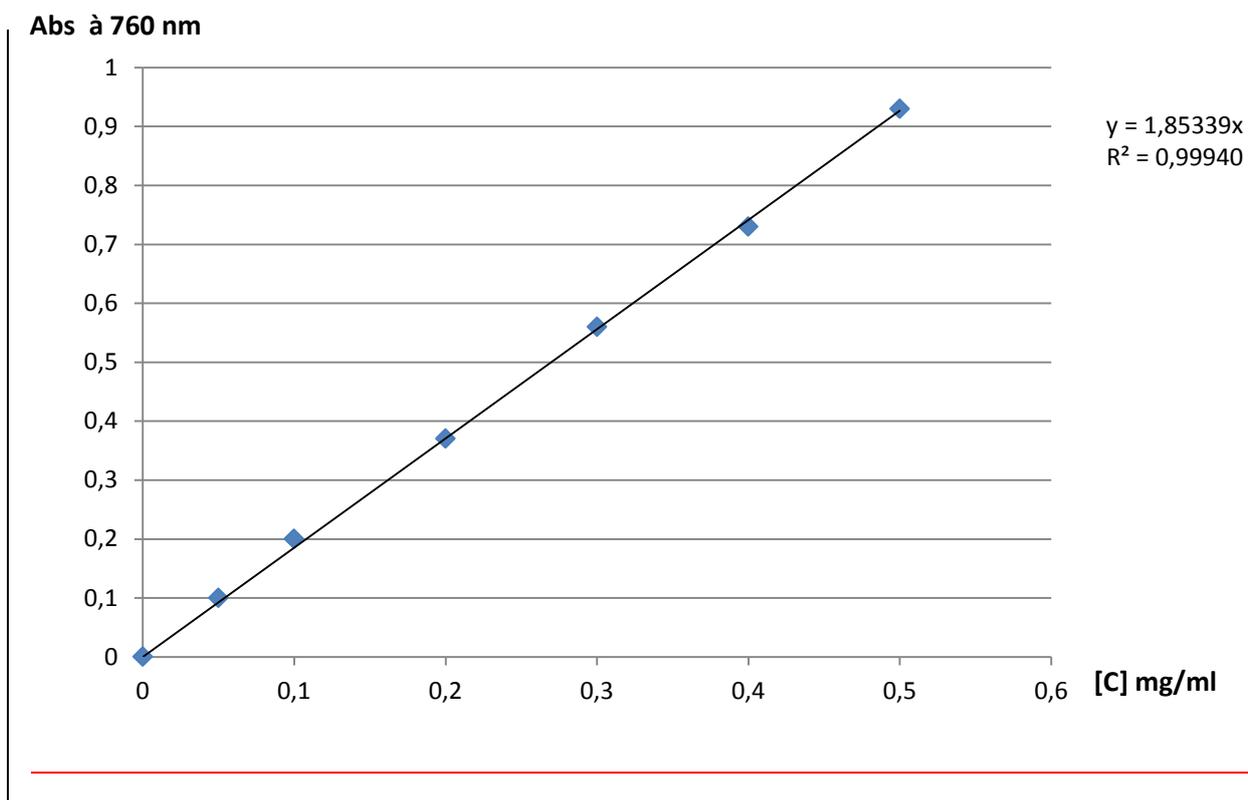
Wojciechowski, MF., Lavin, M., Sanderson, MJ. (2004). A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* (91) 1846–1862.

Xu, B J., Chang, S K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci.* 72(2):S159-66.

Zhang, W J., Bjorn, L O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*; 80: 207-218.

Annexes

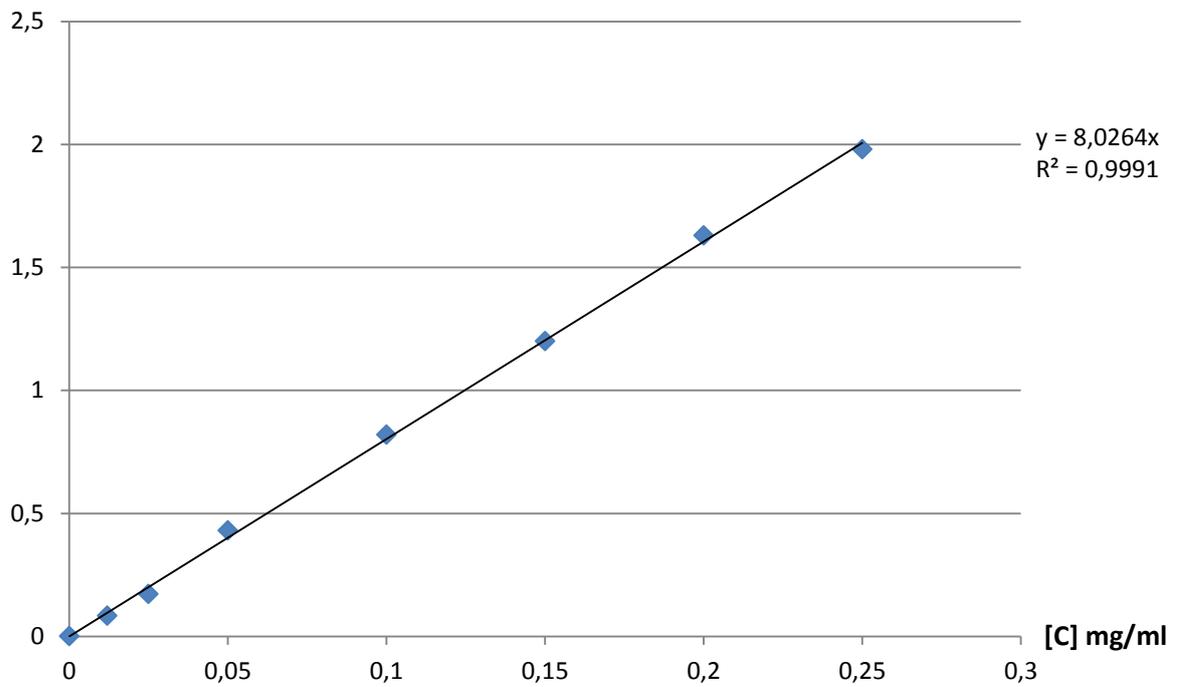
ANNEXE A



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

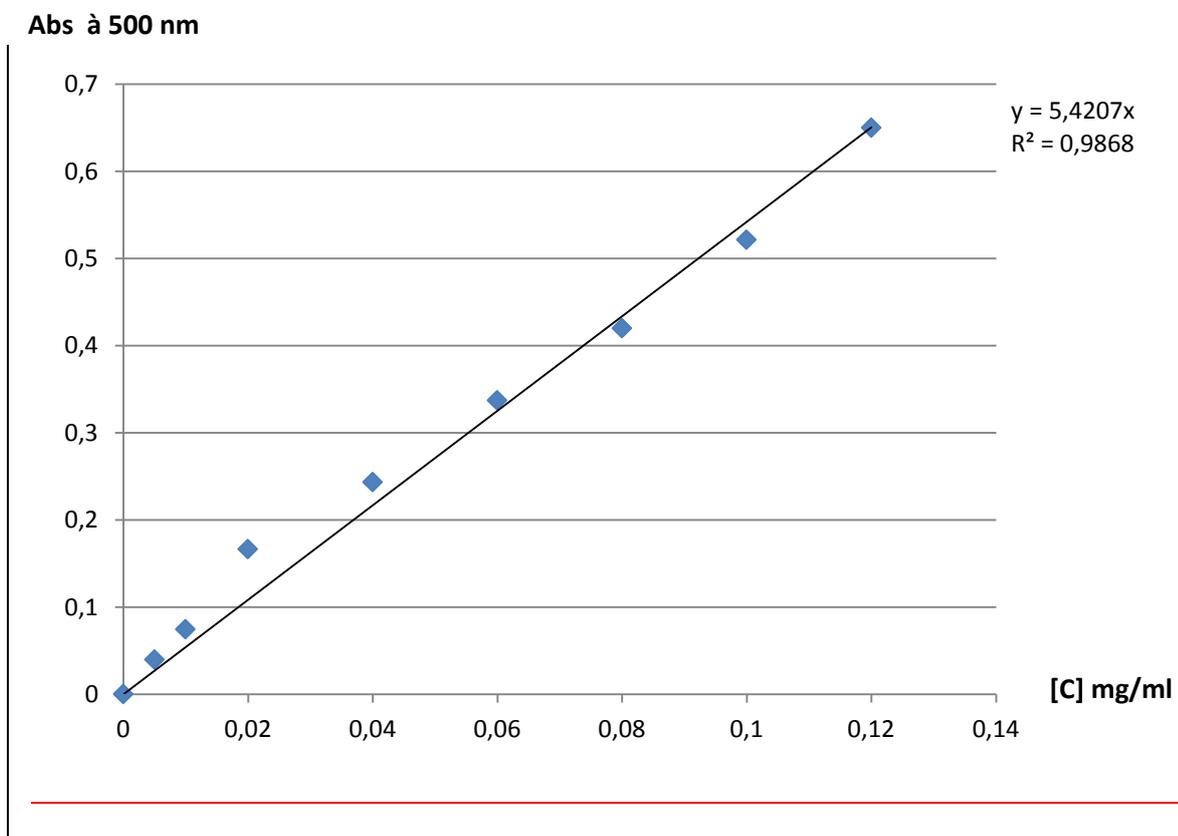
ANNEXE B

Abs à 510 nm



Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

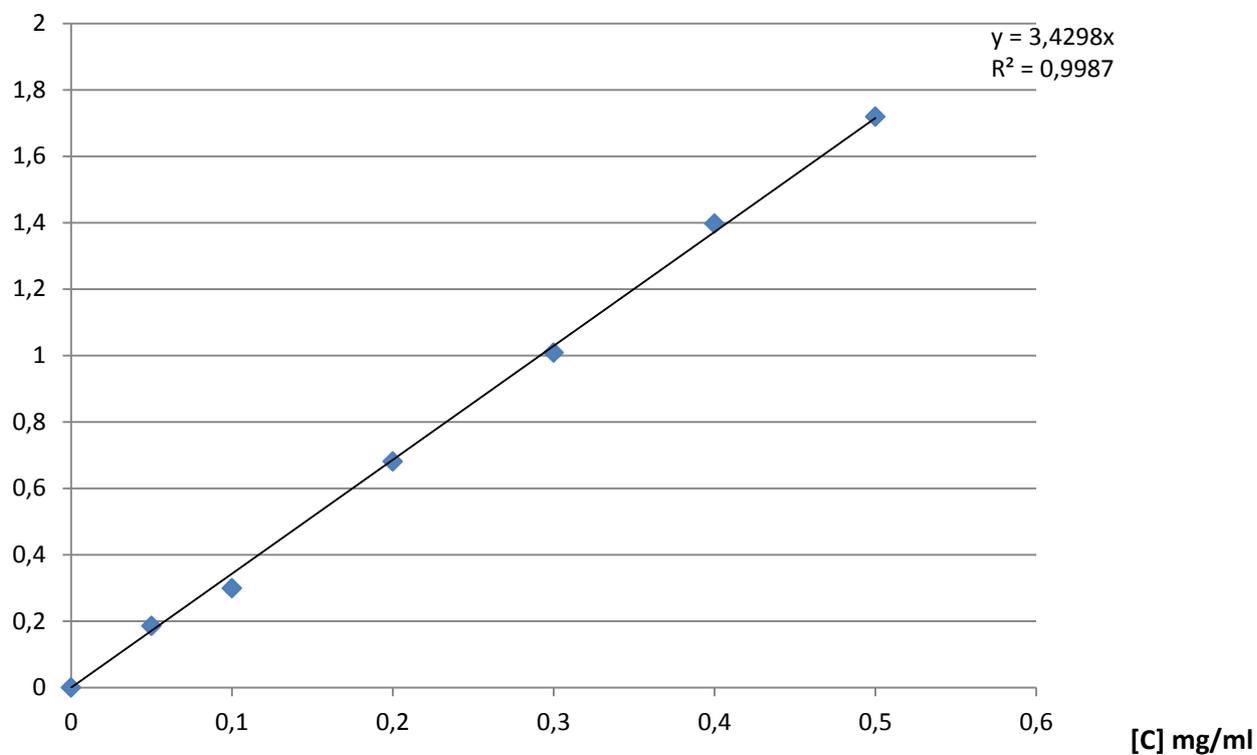
ANNEXE C



Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tanins condensés

ANNEXE D

Abs. à 695 nm



Courbe d'étalonnage réalisé par l'acide ascorbique pour le dosage de
l'activité antioxydative totale

SHORT COMMUNICATION

In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss.

Zoubir Belmokhtar* and Meriem Kaid Harche

Laboratoire des Productions Valorisations Végétales et Microbiennes (LP2VM), Faculty of Natural Sciences and Life, University of Sciences and Technology, Mohamed Boudiaf (USTOMB), Oran 31000, Algeria

(Received 21 April 2014; final version received 10 June 2014)

The relationship between the antioxidant activity and the phenolic contents (total polyphenol, flavonoid and condensed tannin) of *Retama monosperma* (Fabaceae), used commonly in the traditional medicine of Mediterranean regions, was investigated. The antioxidant activities of the various fractions (toluene, chloroform, ethyl acetate and butanol) of the hydromethanolic extract of the seeds, stems and flowers have been evaluated using *in vitro* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) radical scavenging activities and Phosphomolybdic acid assays and were compared to ascorbic acid. A significant high Pearson's correlations between flavonoid content and antioxidant activities ($r = 0.91$) with Phosphomolybdic acid assays and ($r = -0.79$) with IC_{50} DPPH radical scavenging activities. However, there was no correlation between condensed tannin and antioxidant activities. The results obtained in the present study indicate that the ethyl acetate fraction of seeds is a potential source of natural antioxidant for *R. monosperma*.

Keywords: *Retama monosperma*; polyphenol; antioxidant; relationship

Current Research Journal of Biological Sciences 4(2): 202-205, 2012

ISSN: 2041-0778

© Maxwell Scientific Organization, 2012

Submitted: November 25, 2011

Accepted: December 18, 2011

Published: March 10, 2012

**Evaluation of Genetic Diversity in Three Species of *Retama* Genus:
R. monosperma(L) Boiss, *R. raetam* (Forssk) Webb and
R. sphaerocarpa (L) Boiss. (Fabaceae) Based on SDS-PAGE**

Belmokhtar Zoubir and Kaid- Harche Meriem

Laboratoire des Productions Valorisations Végétales et Microbiennes (L2PVM)

Department of Biotechnology; Sciences faculty; University of Sciences and Technology,

Mohamed Boudiaf (USTOMB), P.O. Box. 1505, El Mnaouar, Oran, 31000, Algeria

Abstract: Genetic interpretation of protein polymorphism in *Retama* genus has not been well established until now. The aim of this study was to investigate interspecific and intraspecific polymorphism in three Species of *Retama* Genus: *R. monosperma* (L) Boiss, *R. raetam* (Forssk) Webb and *R. sphaerocarpa* (L) Boiss, by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In this study twelve populations collected from different regions of Algeria have been studied for the analysis of seed storage protein profiles to examine their relationship. Based on electrophoresis bands spectra, Jaccard's Similarity Index was calculated and cluster analysis was performed using unweighted pair group method with arithmetical means (UPGMA), to check the polymorphism among populations. The results from the present study indicate that the low polymorphism between *R. monosperma* and *R. raetam*. The cluster analysis indicated that the twelve populations constituted two clusters. Cluster A comprised from all population of *R. monosperma* and *R. raetam*, and Cluster B comprised of 2 populations from *R. sphaerocarpa*. The SDS banding proteins pattern showed that four bands are monomorphic in all populations of three species with molecular weights of 31.761, 63.767, 92.363 and 82.832 KDa.

Key words: Electrophoresis, polymorphism, SDS-PAGE, *R. monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa*
