

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté de la Technologie
Département de Génie des Procédés

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en génie des procédés
Option : Science et technologie du médicament

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des
extraits de la plante *Retama Sphaerocarpa***

Réalisé par :

M^{elle} BOUALLAG SORAYA

M^{elle} AIT MEHDI YAMINA

Devant le jury :

Président : M^{me} BELKACEMI H.

Promoteur : M^r BELHAMEL K.

Co- Promoteur: M^{elle} TOUATI R.

Examinatrice : M^{me} LOUNIS H.

Promotion Juin 2013



REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donnés le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous exprimons nos vifs remerciements en particulier à nos promoteurs Mr BELHAMEL K, et M^{elle} TOUATI R, qui ont acceptés de nous encadrer et pour leurs orientations et soutiens.

Nos sincères considérations et remerciement sont également exprimés aux membres de jury: madame Belkacemi H., qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury. Madame Lounis H. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions profondément tous les enseignants du département de génie des procédées qui nous ont donné de leurs savoir et nous ont soutenu tout au long de notre cursus.

Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



Figure n°	Nom des figures	Page n°
1	Image de <i>R.sphaerocarpa</i>	3
2	Carte de répartition de l'espèce <i>R.sphaerocarpa</i> en Afrique	3
3	Voies de biosynthèses des composés phénoliques	8
4	Structure de base des flavonoïdes	9
5	Structure de base des flavones	10
6	Structure de base des flavonols	10
7	Structure de base des flavanones	11
8	Structure de base des flavanols	11
9	Structure de base des chalcones	12
10	Structure de base des anthocyanes	12
11	Formation des ROS dans la chaîne respiratoire mitochondriale	14
12	Mécanisme de génération des ROS lors du processus d'ischémie / réperfusion	15
13	Polynucléaires neutrophile	16
14	Grains avec gousse (a), Grains avec gousse (b) et tiges (c) de <i>R. Sphaerocarpa</i>	22
15	Grains (a) et Tiges (b) de <i>R. Sphaerocarpa</i> après broyage	22
16	schéma représentatif de l'appareil soxhlet	23
17	extrait de grains et tiges de <i>R. Sphaerocarpa</i> par soxhlet	24
18	extraits de grains (a) et tiges (b) de <i>R. Sphaerocarpa</i> par macération	25
19	Structure du radical DPPH	27
20	Teneurs en polyphénols totaux des extraits de <i>R. Sphaerocarpa</i>	30
21	Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>R. Sphaerocarpa</i>	31
22	Pouvoir réducteur des extraits de <i>R. Sphaerocarpa</i>	33
23	Réduction du radical DPPH par un antioxydant	34
24	Activité anti-radicalaire des extraits de <i>R. Sphaerocarpa</i>	34

tableau n°	Nom de tableau	Page n°
I	Contenu et profil alcaloïdes (alcaloïdes total=100%) de <i>R. raetam</i> , <i>R. Sphaerocarpa</i> , <i>R. monosperme</i>	4
II	Exemples de flavonoïdes extraits de <i>R. Sphaerocarpa</i>	5
III	Quelques classes des polyphénols	6
IV	Facteur de corrélation antioxydants et activité antioxydante	35

DEDICACE

*Au nom de Dieu le Miséricordieux, Et la prière soient sur sa création,
Muhammad paix soit sur lui.*

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon très cher père pour ses précieux conseils, ses grands sacrifices pour la réussite de ses filles et assurer les bonnes conditions de vie. Vous serez toujours présent dans nos cœurs et Dieu vous bénisse dans son vaste paradis.

Je dédie ce travail à ma très chère mère qui ma toujours soutenu et encouragé. Elle a sacrifié tout pour nous sa santé et sa vie tout juste pour notre réussite que Dieu tu bénisses, t'apporte de santé et te garde pour nous.

A ma grande mère et mes Oncles et Tantes

A mes sœurs Farida, Salima et Adada.

A mes frères Taher, Djamel, Kamel, Farid et Mourad

A mon beau frère Smail

A mes belles sœurs

Rachida, Meriem, Soraya et Souhila

A mes nièces Imane, Mayssa, Nadia, Yasmine, Meriem et Sara

Et neveux Menad et Ahmed

A mes cousins et cousines

A toutes les familles qui portent le nom Ait Mehdi et Aguni

A tout mes amies

A ma collègue de travail BOUALLEG SORAYA qui je remercie profondément.

A tous mes camarades et amis (es) de la promo de génie des procédés.

Et à tout ceux que je connais

Yamina

DEDICACE

*Au nom de Dieu le Miséricordieux, Et la prière soient sur Sa création,
Muhammad paix soit sur lui.*

*Je dédie ce travail à mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé.
Ils ont sacrifié tout pour nous leurs santés et leurs vie tout juste pour notre réussite que Dieu
vous bénisse, vous apporte de santé et vous garde pour nous.*

*A mon mari Hamza, qui a toujours été à mes cotés, et m'a beaucoup aidé et encourager et
à toute sa famille.*

A ma belle mère Rachida et mon bon père Camel

A ma grande mère et mes Oncles et Tantes

A mes sœurs Linda, Ouahiba et Hakima.

A mes frères Makhlouf, Arzeki, Nabil et Salah

A mes beaux frères Karim et Azzeddine

A ma nièce Imane et neveu Amine

Aris et Dylan

A mes bons frères Malek et sa femme Taoues, Khelef, Marzouk,

Mouhand et Fares

A mes cousins et cousines

A toutes les familles qui portent le nom BOUALLAG, YAICI et MEZIANE

A mes sœurs et amies : Nardjes, Rafika, Nadjah, Kenza, Noria, Louiza, Kahina ,

A ma collègue de travail AIT MEHDI YAMINA qui je remercie profondément.

A tous mes camarades et amis (es) de la promo de génie des procédées.

Et à tout ceux que je cannais

Soraya

Abs : absorbance
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AGPI : acides gras polyinsaturés
AlCl₃: chlorure de sodium
AMP : adénosine monophosphate
ATP: Adénosine triphosphates
CoQ : coenzyme Q
DPPH: 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl
DPPH-H: 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazine
EAG : Equivalent en acide gallique
EQ : Equivalent en Quercétine
FL : représente le flavonoïde.
FL-O[•] : Le radical flavonoxy
IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence
MCF-7 : adénocarcinome du sein
MDA : malondialdéhyde
NAD⁺ Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
OMS : organisation mondiale de la santé
PAF: Platelet Activating Factor
R: représente le radical libre.
RL : radicaux libres
RO[°] : radicaux alkoxyles
ROO[°] : radicaux peroxyles
ROS : reactive oxygène species
SOD: Superoxyde dismutase
TK-10 : adénocarcinome rénal
t-PA : tissue-type plasminogen activator
UACC-62 : mélanome
XDH : enzyme xanthine déshydrogénase
XO : xanthine oxydase

Sommaire :

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

Chapitre I généralité sur la plante *Retama Sphaerocarpa*

1. <i>Retama sphaerocarpa</i>	2
1.1. Classification	2
1.2. Caractéristiques botaniques.....	2
1.3. Aire de répartition	3
1.4. Composition chimique	3
1.5. Effets biologiques et thérapeutiques	5

Chapitre II Les composés phénolique

1. Définition.....	6
2. Structure et classification.....	6
3. Biosynthèse des composés phénoliques	7
3.1. Voie de shikimate.....	7
3.2. Voie de l'acétate.....	7
4. Flavonoïdes.....	9
4.1. Définition	9
4.2. Structure et classification	9
4.2.1. Flavones	10
4.2.2. Flavonols	10
4.2.3. Flavanones	11
4.2.4. Flavanols	11
4.2.5. les chalcones	11
4.2.6. Anthocyanidines	12
5. Propriété des composés phénolique.....	12
5.1. Activité antioxydante	12
5.1.1. Radicaux libre	13
5.1.2. Mécanismes de production des ROS	13
5.1.2.1. Respiration cellulaire (chaîne respiratoire mitochondriale).....	13

5.1.2.2. Le phénomène d'ischémie-reperfusion	14
5.1.2.2. NADPH oxydase.....	15
5.1.2.3. Autres Sources	17
5.1.3. Stress oxydant	17
5.1.4. Cible des radicaux libres.....	17
5.1.4.1. Lipide	17
5.1.4.2. Protéine	18
5.1.4.3. ADN.....	18
5.1.5. Mécanisme d'action des flavonoïdes	19
5.1.5.1. Capture directe des radicaux libres	19
5.1.5.2. Capture des cations métalliques	19
5.2. Effets Cardiovasculaires.....	20
5.3. Effets Antiallergiques.....	20
5.4. Effets Anti-inflammatoires.....	21
5.5. Effets antiulcéreux.....	21
5.6. Effets Anticancéreux	21

Partie expérimentale

Chapitre III matériels et méthodes

1. Matière végétale	22
2. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	22
2.1. Extraction	22
2.1.1. Soxhlet.....	23
2.1.1.1. Description de l'appareil soxhlet.....	23
2.1.1.2. Principe.....	24
2.1.2. Macération.....	24
2.2. Dosage.....	25
2.2.1. Les phénols totaux.....	25
2.2.2. Les flavonoïdes	26
3. Activité antioxydant	26
3.1. Pouvoir réducteur	26
3.2. Activité anti radicalaire	27
4. Analyse statistique.....	28

Chapitre IV résultats et discussions

1. Quantification des composés phénoliques	29
1.1. Quantification des phénols totaux	29
1.2. Quantification des flavonoïdes.....	31
2. Activité antioxydante	32
2.1. Pouvoir réducteur	32
2.2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire.....	33
3. Corrélation antioxydant et activité antioxydante.....	35
3.1. Polyphénols	36
3.2. Flavonoïdes	36
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographique	
Annexes	

Introduction

La pharmacognosie "la connaissance des remèdes " est définie comme l'étude des substances naturelles à usage médical. D'origine empirique, cette connaissance des remèdes d'origine naturelle est devenue le fruit d'une démarche scientifique rigoureuse qui étudie toute substance issue des organes animaux ou végétaux et destinée au domaine pharmaceutique. L'étude des matières premières fournies par les végétaux joue un rôle important voir primordial dans beaucoup de domaines de la vie humaines à savoir : thérapeutique, pharmaceutique, cosmétique [1].

Selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle. En 2004, près de 75% de la population africaine a recours aux plantes qui l'entourent pour se soigner et n'a pas accès aux médicaments dits modernes. Sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances différentes, on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal [2].

Les rétames sont des légumineuses arbustives, possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques, caractérisés par une distribution géographique très diversifiée en partant des pourtours de la côte méditerranéenne jusqu'aux régions semi-arides et arides, ils représentent un moyen naturel de lutte contre la désertification [3].

Le genre *Rétama* a fait l'objet de plusieurs travaux en ce qui concerne l'anatomie, l'histologie et la biochimie des tiges, des feuilles et des rameaux, mais peu de recherches ont été entreprises sur les graines notamment en ce qui concerne les activités thérapeutiques

La reconnaissance des composés phénoliques comme des antioxydants naturels est maintenant bien acquise, elle est à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. Les flavonoïdes constituent le groupe plus répandue des composés phénoliques.

L'objectif de ce présent travail contribue à l'étude des substances actives (phénols, flavonoïdes) de la plante *Retama Sphaerocarpa* et à déterminer leurs propriétés biologiques (activité antioxydante).

1. *Retama Sphaerocarpa*

1.1. Classification

Retama Sphaerocarpa appartient à la famille des légumineuses qui sont les plus importantes du règne végétale. On y compte 750 genres et entre 16000 et 19000 espèces. Seul 10% des espèces connues sont examinées pour leur nodulation racinaire [4].

Selon Quezel et Santa (1962) les rétames sont classés dans le taxon suivant [5]

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Fabales
Super famille	Légumineuses
Famille	Fabacées
Sous famille	Papilionacées
Genre	<i>Retama</i>
Espèces	<i>R. Sphaerocarpa</i> <i>R. Monosperma</i> <i>R. raetam</i>

1.2. Caractéristiques botaniques

C'est un arbrisseau ou petit arbuste inerme, vert ou vert grisâtre, dressé, pouvant atteindre 1,5 à 2 m et très ramifié. Rameaux flexibles, ordinairement arqués, grêles blanchâtres dans la jeunesse par des poils simples puis bientôt glabres et verts.

Les feuilles sont très réduites unifoliées et caduques. Les fleurs sont de couleur jaune inodores déposée en grappes latérales multiflores. Gousses subglobuleuses ou Semiglobuleuses, jaune brun, lisses ou peu rugueuses, non charnues, minces, persistantes sur les rameaux, ordinairement monosperme, rarement disperme, à graine souvent mobile à l'intérieur de la gousse [5] ; [6] ; [7]. La floraison est observée entre avril-juillet.



Figure 1 : Grain et arbuste de *R. sphaerocarpa*

1.3. Aire de répartition

L'espèce *R. Sphaerocarpa* se rencontre dans des zones arides et semi-arides méditerranéenne (Algérie, Maroc, Tunisie, Portugal, Espagne) et en Amérique du sud (Argentine). La figure ci-dessous montre la répartition en Afrique de l'espèce *R. sphaerocarpa*.

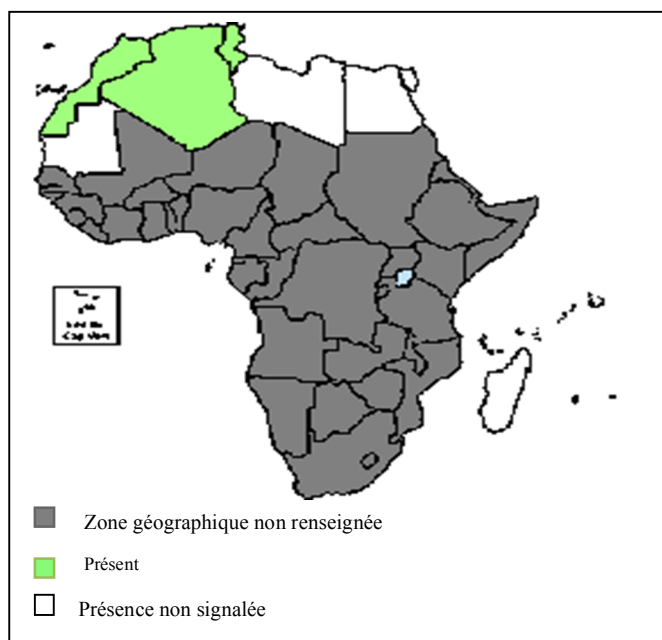


Figure 2 : carte de répartition de l'espèce *R. sphaerocarpa* en Afrique [3]

1.4. Composition chimique

L'espèce *R. Sphaerocarpa* fournit un grand nombre d'alcaloïdes et de flavonoïdes. Les alcaloïdes sont des produits d'origine végétale, basiques, riche en azote et pharmacologiquement actifs [8]; [9].

Les alcaloïdes sont connus depuis des milliers d'années. Ils sont utilisés comme Drogues (*morphine et codéine sont contenues dans le latex du pavot (opium)*) ou Poisons (*la ciguë contient coniine*).

Le tableau (I) montre la teneur des trois espèces: *R. sphaerocarpa*, *R. monosperma*, *R. raetam* en alcaloïdes.

Tableau 1: contenu et profil alcaloïdes (alcaloïdes total=100%) de *R. raetam*, *R. Sphaerocarpa*, *R. monosperme* [10].

Alcaloïdes	<i>R. raetam</i>				<i>R. Sphaerocarpa</i>		<i>R. monosperme</i>	
	Tiges	Racines	Grains	Fleur	Tiges	Fleur	Tiges	Fruits
Epilupinine	-	-	-	-	Tr	-	-	-
α -Isospartéine	Tr	-	-	-	Tr	-	Tr	-
Spartéine ^{a, b, c}	35.65	9.09	Tr	Tr	20.16	4.34	24.79	Tr
Dehydrospartéine	Tr	-	-	-	Tr	-	Tr	-
β - Isospartéine	0.80	0.98	Tr	Tr	-	-	Tr	-
11,12-Dehydrospartéine	0.81	-	-	Tr	Tr	-	Tr	-
Ammodendrine ^b	0.99	0.87	Tr	Tr	13.79	25.18	11.59	2.75
Dehydroammodendrine	-	-	-	-	-	-	Tr	-
N-Méthylcytisine ^{a, c}	9.91	20.13	5.63	10.81	Tr	6.87	4.90	12.72
Dehydrocytisine I	-	-	-	-	-	-	Tr	-
Rétamine ^{a, b}	24.86	45.44	Tr	Tr	37.20	12.35	1.50	-
Dehydrocytisine II	-	-	-	-	-	-	Tr	-
Cytisine ^{a, b, c}	0.91	6.00	94.37	54.25	5.04	24.16	7.95	58.69
Dehydrorétamine	Tr	-	-	Tr	Tr	-	Tr	-
17-Oxospartéine ^c	Tr	-	-	Tr	Tr	-	2.57	-
α -Isolupanine	-	-	-	-	Tr	-	Tr	-
5,6-Dehydrolupanine ^b	3.91	0.50	Tr	3.62	5.32	11.78	9.90	Tr
Rhombifoline	-	0.60	-	-	-	-	Tr	Tr
Lupanine ^{a, b}	8.73	2.15	Tr	2.26	15.40	15.32	4.24	Tr
Aphylline	-	-	-	-	-	-	Tr	-
N-Formylammodendrine	-	-	-	-	-	-	Tr	-
N-Carbométhoxycytisine	Tr	-	-	-	-	-	-	-
11-Allylcytisine	0.58	1.87	Tr	6.61	-	Tr	0.50	Tr
17-Oxorétamine	0.50	-	-	-	0.50	Tr	-	-
N-Formylcytisine	Tr	-	-	-	Tr	-	Tr	-
N-Acetylcytisine	-	-	-	-	-	-	Tr	-
12 α -Hydroxylupanine	Tr	-	-	-	Tr	-	-	-
Anagyrine ^{a, b}	12.35	11.92	Tr	22.55	2.59	Tr	32.06	25.84
Dehydrobaptifoline	-	-	-	-	-	-	Tr	-
Baptifoline ^b	Tr	-	-	Tr	Tr	-	Tr	-
Contenu alcaloïde*	2.56	1.36	2.00	0.57	0.82	0.13	0.70	0.21

Tr : trace

- : non détecté

a : les alcaloïdes connu de *R. raetam*

b : les alcaloïdes connu de *R. sphaerocarpa*

c : les alcaloïdes connu de *R. monosperma*

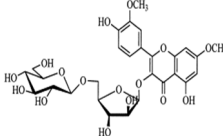
* : masse de la matière sèche de *R. raetam* mg/100mg

* : masse de la matière frais de *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma* mg/100mg

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles) [11]; [12].

Le tableau (II) montre trois flavonoïdes isolés à partir de *R. Sphaerocarpa* avec leurs formules et structures chimiques:

Tableau (II): Exemples de flavonoïdes extraits de *R. Sphaerocarpa* [13]; [14]

Flavonoïdes	Structure et formules
7 hydroxy-6-méthoxy-3,4-méthylendioxyisoflavone (6-méthoxypseudobaptégenin)	$C_{17}H_{12}O_6$
5, 7, 4-trihydroxyisoflavone-8-C-glucoside (Genistéin 8-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$
rhamnazine-3-O-β-glucopyranosyl-(1→5)-α-arabinofuranoside	

1.5. Effets biologiques et thérapeutiques

La famille des légumineuses fournit de très grand nombre de drogues, recherchées pour divers principes. Ces drogues existent surtout dans des espèces appartenant à la flore des zones arides ou semi-arides [15].

Selon une récente enquête ethnobotanique dans la région Nord-est de la Libye, *R. sphaerocarpa* est prescrite pour le traitement de l'hypertension et des troubles gastro-intestinaux [16]. Elle était couramment utilisée pour le traitement traditionnel de certaines maladies rénales et comme plantes guérisseurs pour le contrôle du diabète et de la phytothérapie [17].

Les flavonoïdes des parties aériennes de *R.sphaerocarpa* possèdent une activité cytotoxique contre trois lignées de cellules cancéreuses humaines : TK-10 (adénocarcinome rénal), MCF-7 (adénocarcinome du sein) et UACC-62 (mélanome) [18].

1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits, graines et bois) [19].

2. Structure et classification

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés ; malgré la grande diversité structurale, ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols [20].

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes comme le montre le tableau III [21].

Tableau III : Quelques classes des polyphénols [22].

Classe	formule
Phénols simples, benzoquinones	C6
acide hydroxybenzoïque	C6-C1
acéthophénones, acide phénylacétique	C6-C2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones)	C6-C3
flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6-C3-C6
lignanes, néolignanes	(C6-C3) ₂
Biflavonoïdes	(C6-C3-C6) ₂
tannins condensés (proanthocyanidines, ou flavolans)	(C6-C3-C6) _n

D'après cette classification, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les principaux composés phénoliques [22].

3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues. Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques (figure 3) [23].

3.1. Voie de shikimate

C'est une voie essentielle. Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamique et à leurs dérivés, tels que les acides benzoïques ou les phénols simples [24].

3.2. Voie de l'acétate

Cette voie issue de l'acétate, conduit à des poly β -coesters (polyacétate) de longueurs variables menant par cyclisation à des composés polycyclique tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones. De plus, la diversité structurale des composés polyphénolique, due à cette double origine bio-synthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes [24].

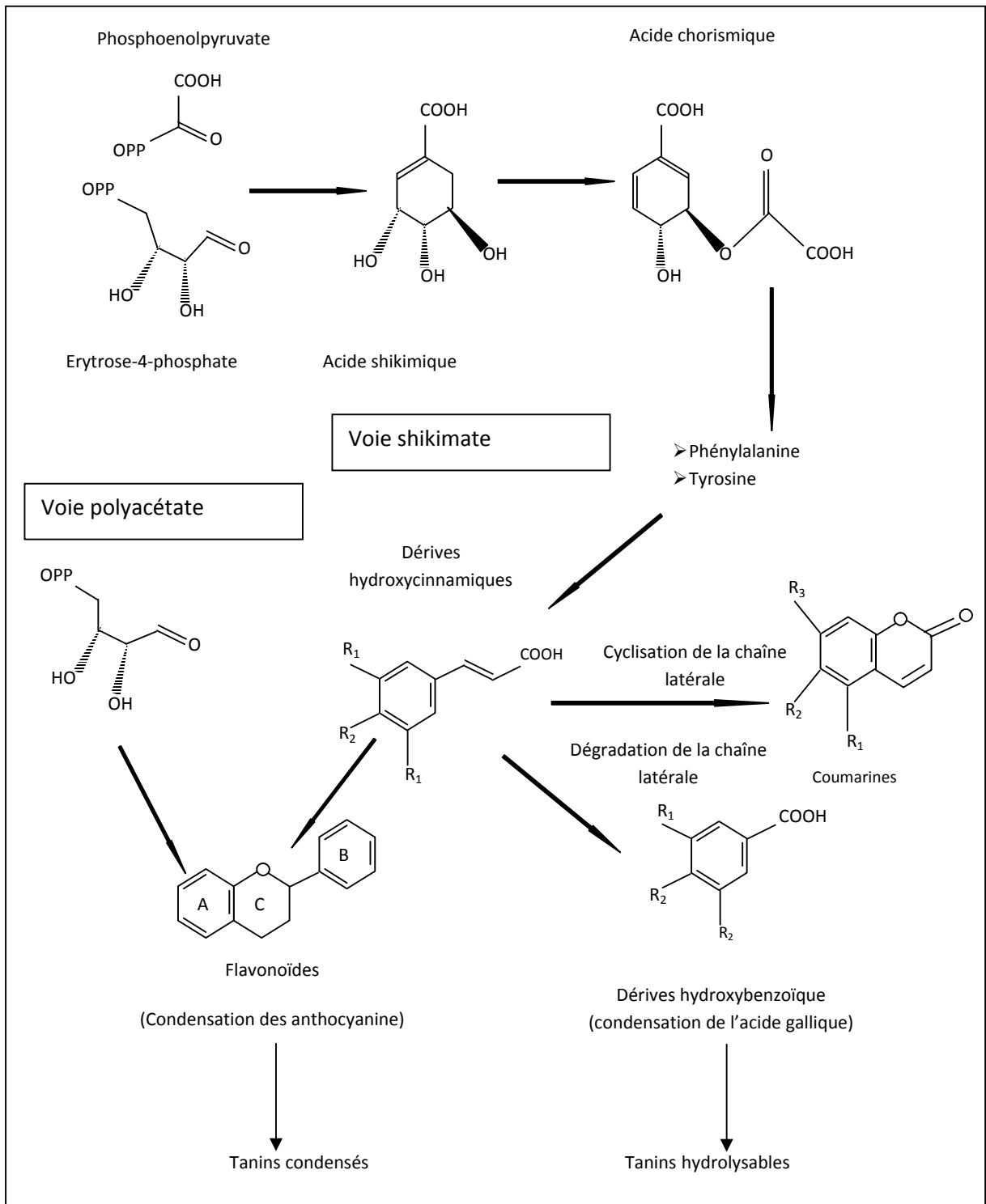


Figure 3 : voies de biosynthèse des composés phénoliques [25].

4. Flavonoïdes

4.1. Définition

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules.

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) et superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [26].

4.2. Structure et classification

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (figure 4) [27].

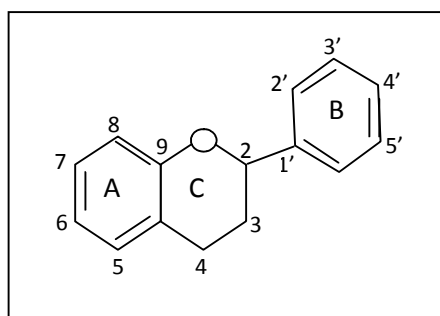


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes [29].

Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées. Les flavones et les flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus, alors que les flavanones, les flavanols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte: [25];[29]; [30];[31].

4.2.1. flavones

Le noyau flavone dérivé du noyau flavane de base (dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) par la fixation à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison.

Les principaux flavones sont l'apigénine et la lutéoline. Elles ont dans la majorité des cas la forme de glycosides (figure 5) [31].

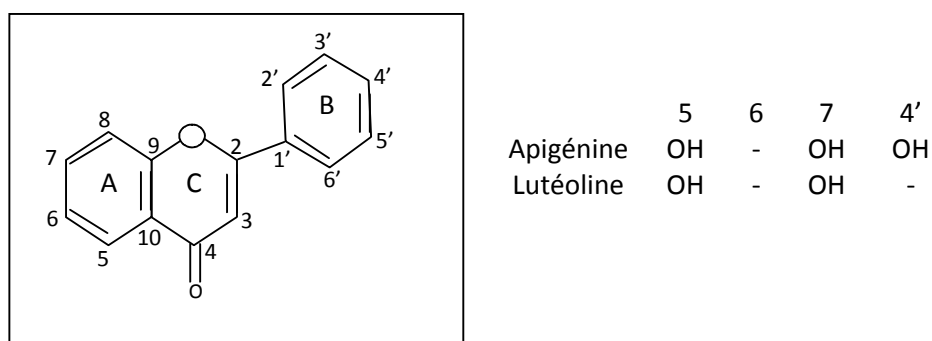


Figure 5 : Structure de base des flavones [32].

4.2.2. Flavonols

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3. En plus de ce radical OH, les diverses molécules de flavonols en comprennent deux, trois, quatre ou cinq autres. Les flavonols sont beaucoup plus abondants dans le règne végétal que les flavones et leurs concentrations sont plus élevées. Les principaux sont la quercétine, kaempférol et myricétine (figure 6) [29].

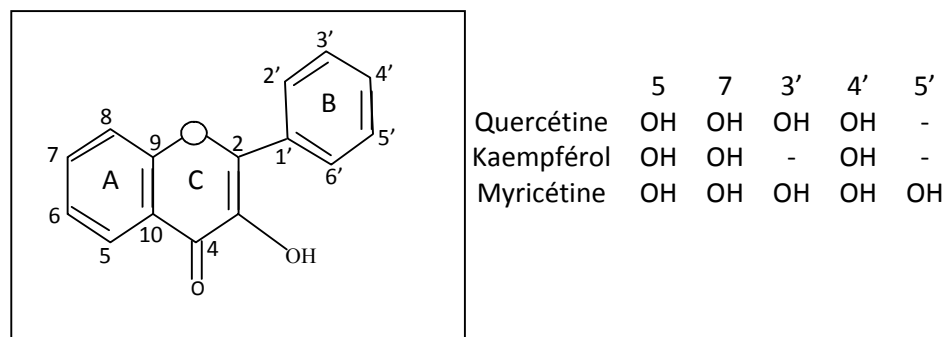


Figure 6 : Structure de base des flavonols [33].

4.2.3. Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous forme libre ou sous formes glycosylées. Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylés ou méthoxylés. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. La principale flavanone est : La naringénine (figure 7) [25].

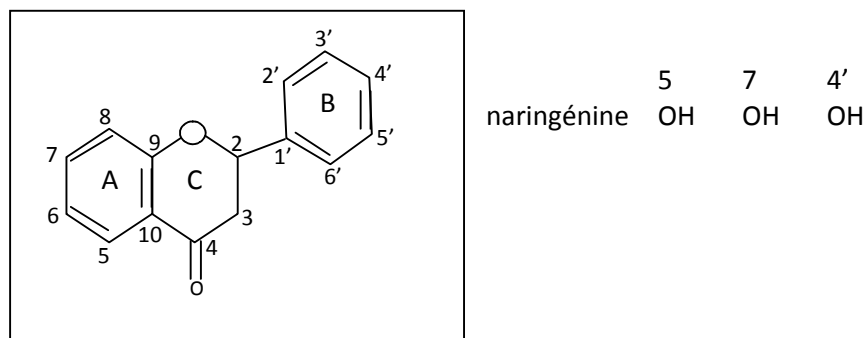


Figure 7 : Structure de base des flavanones [25].

4.2.4. Flavanols

Ils se distinguent des flavanones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison la plus rencontré est la catéchine (figure 8) [30].

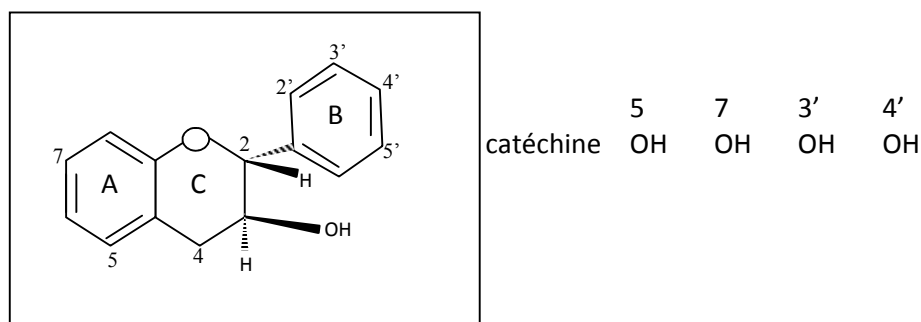


Figure 8 : Structure de base des flavanols [22].

4.2.5. les chalcones

Les chalcones et par défaut les dihydrochalcones sont uniques au sein de la famille des flavonoïdes. Dépourvus du cycle C central, les deux cycles A et B sont reliés par une chaîne tricarbonée cétonique α , β insaturée (saturée dans le cas des dihydrochalcones).

Les cycles A et B sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes mais leurs numérotations sont inversées. Les plus abondants sont : butéine et phlorétine (figure 9) [31].

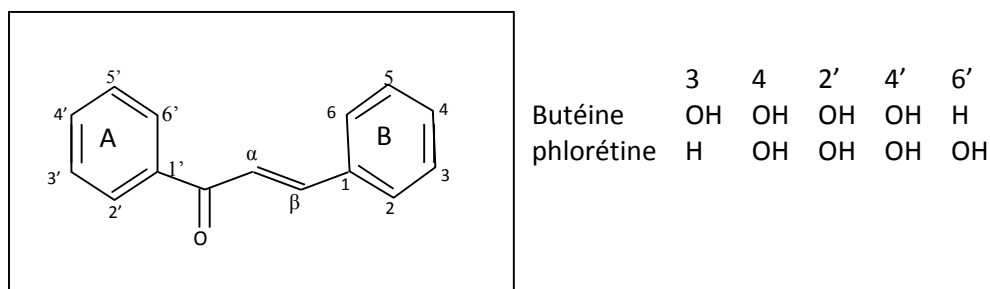


Figure 9 : Structure de base des chalcones [25].

4.2.6. Anthocyanidines

Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont une double liaison entre les positions 3 et 4. Les plus importants sont : pélargonidine, cyanidine et péonidine (figure 10) [25].

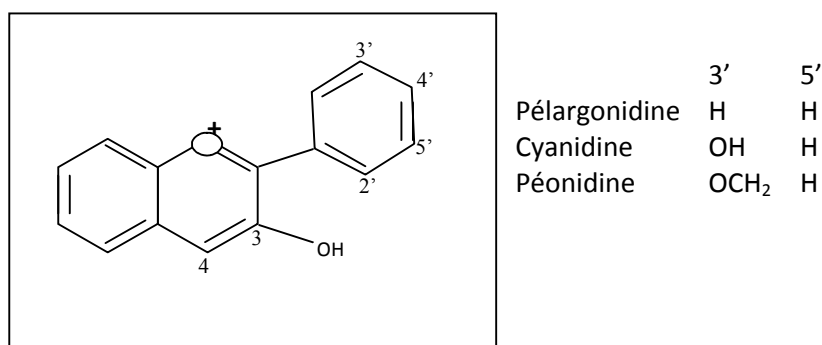


Fig 10 : Structure de base des anthocyanidines [25].

5. Propriété des composés phénolique

5.1. Activité antioxydante

C'est la capacité d'une molécule à réduire ou supprimer l'oxydation des composés biologiques par les radicaux libres ou toutes molécules pro-oxydantes [34].

5.1.1. Radicaux libre

Les électrons dans les atomes et les molécules occupent des régions de l'espace appelées orbitales [35]. Un radical libre est une espèce chimique, molécule ou simple atome qui a la particularité de porter un ou plusieurs électrons célibataires comme conséquence de la perte d'un ou plusieurs électrons de l'orbitale externe [36] ; [37] ; [38].

Le terme radical libre est souvent remplacé par celui de substances oxygénées réactives (ROS, en anglais : *reactive oxygen species*) [39] ; [40]. Cette appellation n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde ($O_2\cdot^-$), radical hydroxyl ($OH\cdot$), monoxyde d'azote ($NO\cdot$)...), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) [39] ; [41].

5.1.2. Mécanismes de production des Reactive Oxygen Species

Le principal processus endogène de production des ROS in vivo est la respiration cellulaire (au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale) [42].

D'autres processus endogènes interviennent également, mais plutôt lors de situations pathologiques, comme le phénomène d'ischémie-reperfusion ou la lutte anti-infectieuse (phénomène inflammatoire).

Les ROS apparaissent également lors de la biosynthèse des prostaglandines et de différentes hormones [43], lors de l'autoxydation des catécholamines.

5.1.2.1. Respiration cellulaire (chaîne respiratoire mitochondriale)

Indispensable aux organismes aérobies, l'oxygène participe à la production d'ATP lors de la respiration cellulaire mitochondriale. Mais, lors de ce processus, 2 à 5 % des électrons ne sont pas réduits en eau par réduction tétravalente, mais fuient à différents niveaux de la chaîne (coenzyme Q (CoQ)). Cette réduction univalente de l'oxygène [44] conduit à la formation des ROS [45] (figure 11).

L'anion superoxyde est le premier radical libre formé. En présence d'ions H^+ , il subit une réaction de dismutation aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène, en présence de fer ferreux (Fe^{2+}), se décompose ce qui aboutit à la formation du radical hydroxyle $^{\circ}OH$, le plus toxique car le plus réactif. Le radical $^{\circ}OH$ provoque la formation de nouveaux radicaux par arrachement d'un atome d'hydrogène ou par le transfert de son électron célibataire. Ainsi, le radical $^{\circ}OH$ peut générer, en présence d'un acide gras polyinsaturés (AGPI), des radicaux alkoxy (RO°) ou peroxy (ROO°) [46].

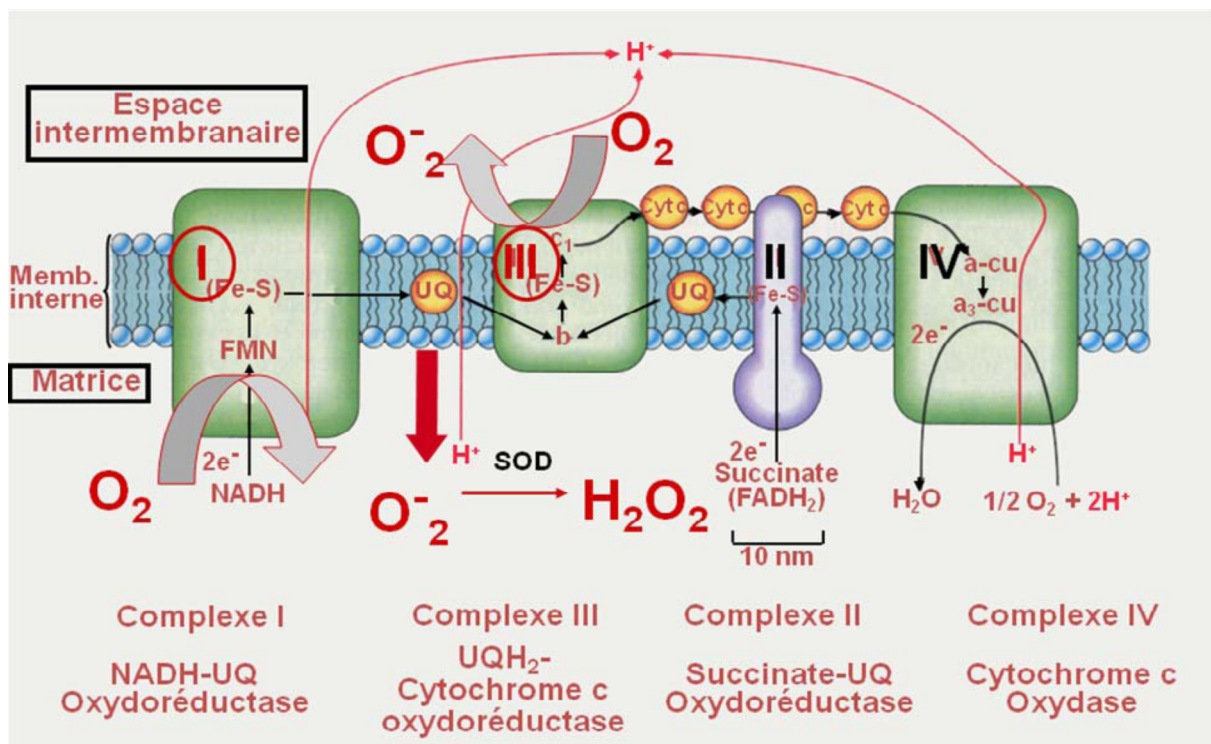


Figure 11 : Formation des ROS dans la chaîne respiratoire mitochondriale [47].

5.1.2.2. Phénomène d'ischémie-reperfusion

Le phénomène d'ischémie-reperfusion se caractérise par la diminution sévère ou l'arrêt de la circulation sanguine dans un territoire donné (et par conséquent par une baisse de l'apport en oxygène et de la resynthèse d'ATP) suivi d'un afflux massif de sang dans ce même territoire. Cette situation survient lors de la levée d'un garrot, lors d'interventions chirurgicales, lors d'infarctus, de greffes d'organes mais aussi à l'exercice physique.

Elle s'accompagne de mécanismes complexes, comme la conversion de l'enzyme xanthine déshydrogénase (XDH) en xanthine oxydase (XO). Cette conversion se fait sous l'action de protéases calcium dépendantes qui ont été activées par le dysfonctionnement des pompes calciques ATP-dépendantes provoqué par l'ischémie (figure 12). Lors du fonctionnement de la XDH, l'accepteur d'électron est le NAD^+ alors que pour la XO, l'accepteur d'électron est l' O_2 qui arrive en excès lors de la reperfusion, conduisant à une surproduction d' $\text{O}_2^{\bullet-}$. De plus d'autres agents oxydants comme le Peroxynitrite sont également produits suite à la libération d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ lors de la reperfusion [48].

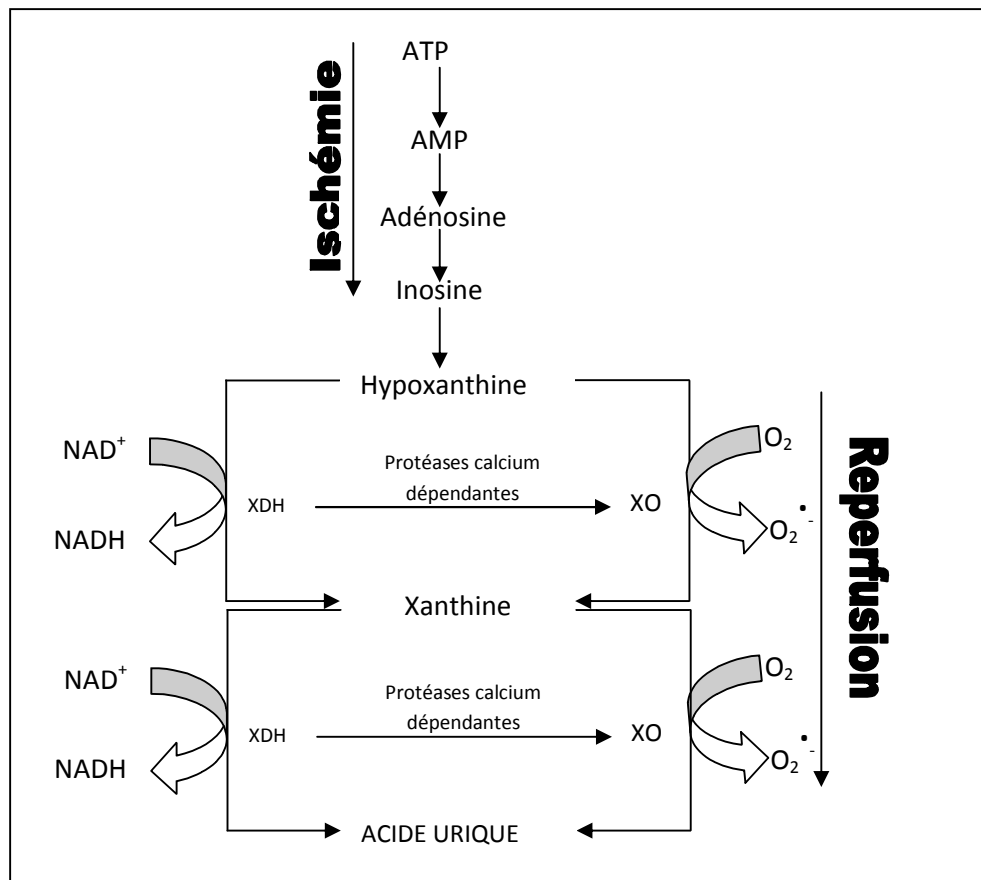


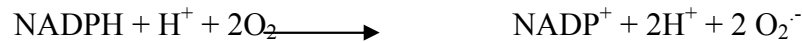
Figure 12 : Mécanisme de génération des ROS lors du processus d'ischémie / réperfusion [48]

5.1.2.2. NADPH oxydase

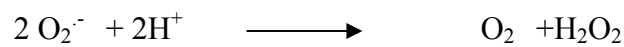
En parallèle de la production des ROS par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux libres via une activité NADPH oxydase membranaire (Figure 13) [49].

NADPH oxydase est une enzyme localisée dans les cellules phagocytaires (neutrophiles, eosinophiles et macrophages) [50].

Elle catalyse la réduction monoélectronique (O_2) en utilisant le NADH ou le NADPH comme donneur d'électron. [49] ; [51].



Le radical superoxyde formé dans cette réaction est rapidement dismuté à la forme peroxyde d'hydrogène, une réaction catalysé par la superoxyde dismutase [52]



En plus de ces deux produits primaires de ROS, autres radicaux sont formés, incluant radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et acide hypochloride ($HOCl$) qui sont formés dans une réaction catalysée par myéloperoxydase granulaire [53]. Théoriquement, il pourrait aussi y avoir une production d' OH^{\cdot} Par réaction de Feton en présence fer complexe [53].

Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers [54].

D'autres cellules possèdent une activité de NADPH-oxydase et de NO synthétase: lymphocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, myocytes. La « NADPH-oxydase » y aurait une activité normale modérée assurant la production des ROS comme seconds messagers et régulant ainsi les réponses de croissance cellulaire [53].

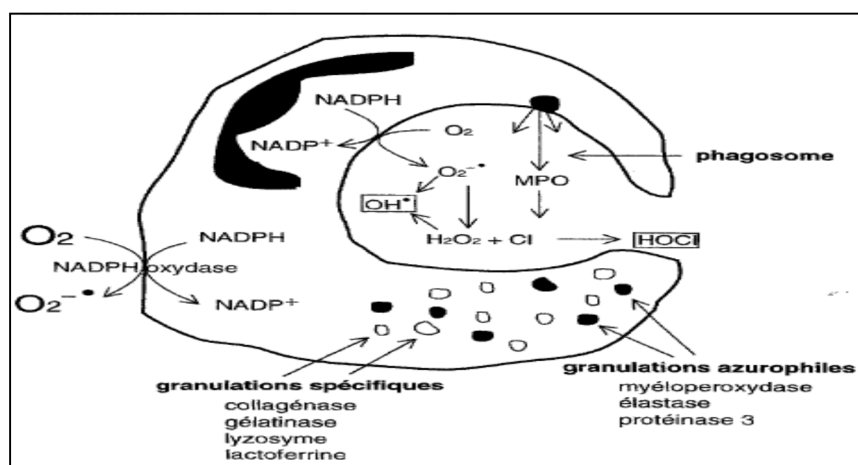


Figure 13 : Polynucléaires neutrophile [55].

5.1.2.3. Autres Sources

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des espèces réactives de l'oxygène [19].

Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources des radicaux, qu'ils s'agissent des rayons ionisants X, gamma ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants [56].

En outre, des résidus de la fumée de cigarette, l'alcool ou même certains médicaments sont une source importante des radicaux libres. Cette production est anormale, toujours dommageable, et sans objectif physiologique [37].

5.1.3. Stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense [55]. En situation physiologique, la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre [57].

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre de la balance entre le niveau de production des radicaux libres et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premiers [58] ;[59] ;[60].

5.1.4. Cible des radicaux libres

5.1.4.1. Lipide

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons [19]. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique.

Le radical formé (R°) subit un réarrangement interne dû au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire [61].

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lésion complète [54].

La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène [62].

5.1.4.2. Protéine

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les ROS sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical OH° s'additionne, modifiant la conformation de la protéine [54].

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydés et inactivés. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases [54] ;[62].

5.1.4.3. ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH° peuvent être générées.

L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone.

Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. [55]

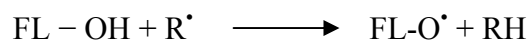
Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dans la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine [54] ;[62] ;[63].

5.1.5. Mécanisme d'action des flavonoïdes

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis les effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS, ou en captant les cations métalliques [64].

5.1.5.1. Capture directe des radicaux libres

La structure chimique des flavonoïdes leur confère la capacité de fixer directement les radicaux libres « effet anti radicalaire ». Les flavonoïdes peuvent piéger le radical superoxyde, hydroxyle, alkoxyles et peroxyles, par transfert d'hydrogène.



FL : représente le flavonoïde.

R : représente le radical libre.

Le radical flavonoxy (FL-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable. La capacité anti radicalaire des flavonoïdes dépend principalement de leurs structures [65].

5.1.5.2. Capture des cations métalliques

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs.

Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production des ROS, pour cette raison sont considérés comme de bons chélateurs.

Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont:

- Un noyau catéchol sur le cycle B, Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

La quercétine est la plus active des flavonoïdes [66].

5.2. Effets Cardiovasculaires

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des composés phénoliques. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes [67].

Les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempférol et la génisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire [67].

5.3. Effets Antiallergiques

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATP Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATP Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules.

En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [27].

5.4. Effets Anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [68]. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase [26].

5.4. Effets anti-ulcèreux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes [27]. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel [69]. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

5.4.1.1. Effets Anticancéreux

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale [70]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [71].

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres [27]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [72] et inhibe l'activité de la collagénase [73].

1. Matière végétale

Le matériel végétal est constitué de grains et de tiges du *Retama Sphaerocarpa* (figure 14) récoltés en Novembre 2012 (grains) et Avril 2013 (tiges). Après séchage à l'air libre, la matière sèche est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur à hélices et les poudres obtenues sont tamisées à un diamètre de 100 μm (figure 15).

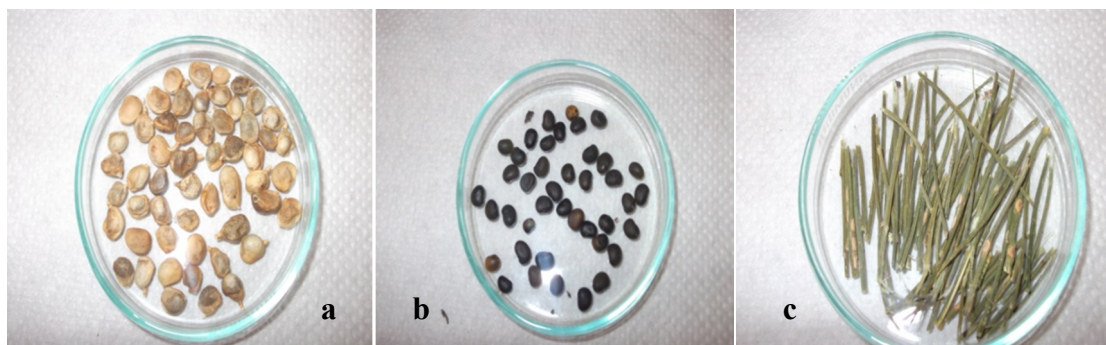


Figure 14: Grains avec gousse (a), Grains sans gousse (b) et tiges (c) de *R. Sphaerocarpa*

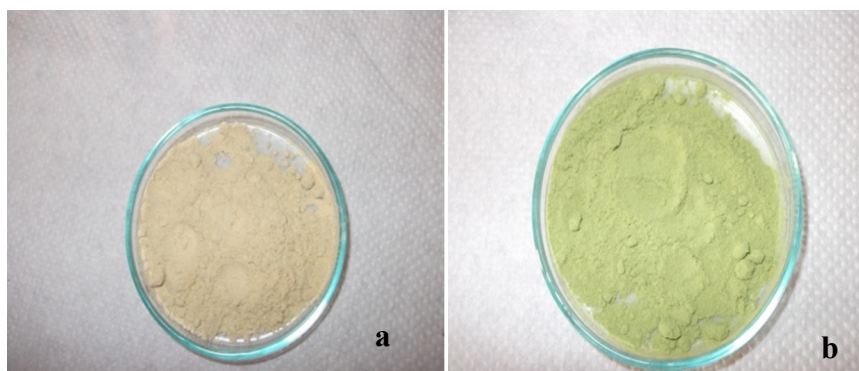


Figure 15: Grains (a) et Tiges (b) de *R. Sphaerocarpa* après broyage

2. Extraction et dosage des composés phénoliques

2.1. Extraction

Les composés phénoliques de *R. Sphaerocarpa* sont extraits par deux méthodes :

2.1.1. Soxhlet

Le Soxhlet permet de faire l'extraction continue par solvant d'une substance contenue dans une poudre solide. Cet appareil porte le nom de son inventeur : **Franz Von Soxhlet** en 1879 [74].

2.1.2. Description de l'appareil soxhlet

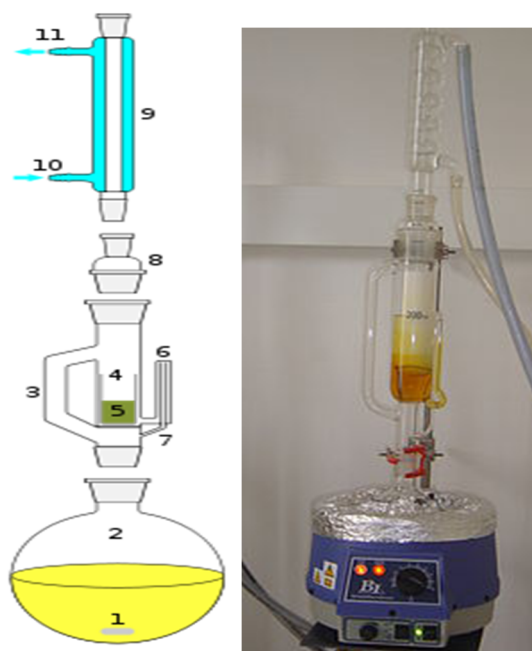


Figure 16: schéma représentatif de l'appareil soxhlet.

La figure (16) représente un schéma du soxhlet. Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placée la poudre contenant l'espèce à extraire ; puis un réfrigérant (9-10-11) est adapté au-dessus de l'extracteur [74].

2.1.1.1.Principe

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur faisant ainsi macérer le solide dans la cartouche. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'il atteint le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon (leurs température d'ébullition doit être nettement supérieure à celle du solvant extracteur) [74].

2 g des poudres de grains et tiges de *R. Sphaerocarpa* ont subit une extraction par « Soxhlet » dans 200 ml de méthanol 80% pendant 6 heures.

Et la figure 17 représente les extraits de grains et tiges de *R. Sphaerocarpa* par soxhlet

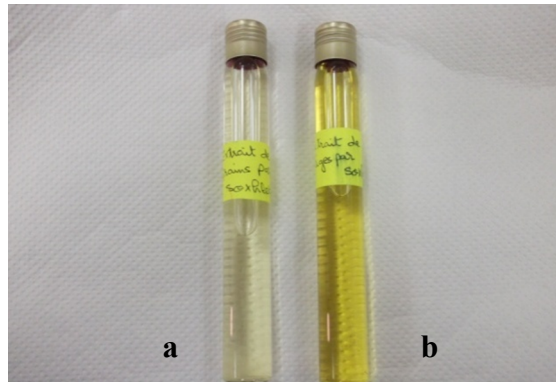


Figure 17: extraits de grains (a) et tiges (b) de *R. Sphaerocarpa* par soxhlet

2.1.2. Macération

2 g de chaque poudre sont ajoutés à 200 ml de solvant d'extraction (Méthanol 80%). Après une agitation de 2 heures à la température ambiante, Le mélange est centrifugé à 1400 tr/min pendant 20 min. Le surnageant est récupéré et filtré à l'aide du papier filtre. Les extraits obtenus sont représentés dans la figure (19) [75].

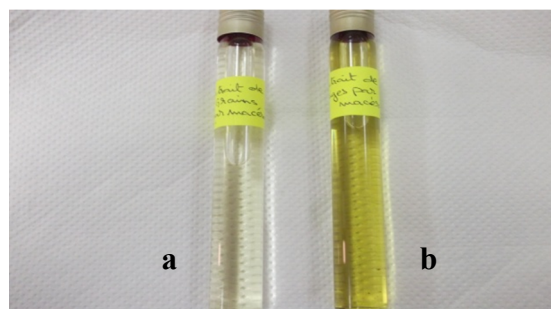


Figure 18: extrait de grains (a) et tiges(b) de *R. Sphaerocarpa* par macération.

2.2. Dosage

2.2.1. Les phénols totaux

Le dosage par le Folin-Ciocalteu est une des plus anciennes méthodes conçues pour déterminer la teneur totale en composés phénoliques dans les aliments et les plantes médicinales [76] ; [77]. Les composés phénoliques réagissent avec le Folin-Ciocalteu, mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) [75], uniquement dans des conditions basiques obtenu généralement en ajoutant du carbonate de sodium (Na_2CO_3) [76].

La dissociation de proton de composé phénolique dans un milieu basique conduit à la formation d'un anion phénolate. Cet anion est capable de réduire le Folin-Ciocalteu (de couleur jaune) en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) [79]. L'intensité de la coloration bleue produite est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans la solution [76]; [77]; [78].

Pour évaluer la teneur en composés phénoliques ou phénols totaux de *R. Sphaerocarpa*, 100 μ l des quatre extraits sont mélangés avec 100 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (50%), puis 2ml de la solution de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés au mélange réactionnel. Ce dernier est laissé pendant 30min à l'abri de la lumière et l'absorbance est mesurée à 700nm [79].

Les concentrations en composés phénoliques sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100g d'échantillon.

2.2.2. Les flavonoïdes

La méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (Fer et Aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre. Ils contiennent des groupements hydroxyles (OH) libres, en position 3 et 5, ces groupements sont susceptibles de former des complexes avec le groupement CO, en présence de chlorure d'aluminium. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de complexes formés. [80]

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en mélangeant 200µl d'extrait avec 150µl de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%) ce mélange est incubé à température ambiante pendant 5 min puis 150 µl de chlorure de sodium (AlCl_3 , 10%) et ce dernier mélange est incubé pendant 6 min à température ambiante et enfin 1 ml de hydroxyde de sodium (Na OH, 1 M) sont ajoutés au mélange réactionnel. L'absorbance est mesurée à 510nm.

Les concentrations en flavonoïdes sont exprimées en mg équivalent en quercétine par 100g d'échantillon (mg EQ/100g) [81].

3. Activité antioxydant

3.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure – Fe^{+3} en fer ferreux. [82] La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait. [83]

Une quantité de 500 µl d'extrait est additionnée à 1.5 ml du tampon phosphate (pH 6.6, 0.2M) et 1.5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1%); 1.5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés au mélange après incubation à 50°C pendant 20 minutes. Un aliquote de 1.25 ml est transféré dans un tube et mélangé avec 1.25 ml d'eau distillée et 0.25ml de chlorure ferrique (FeCl_3 , 0.1%). L'absorbance est mesurée à 700nm après 10 minutes d'incubation. [84]

Les résultats de ce protocole sont exprimés en mg EAG/100g d'échantillon.

3.2. Activité anti radicalaire

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable caractérisé par une couleur violacée avec une absorbance maximale de 516 à 517 nm. [85]; [86] Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure19). [87]

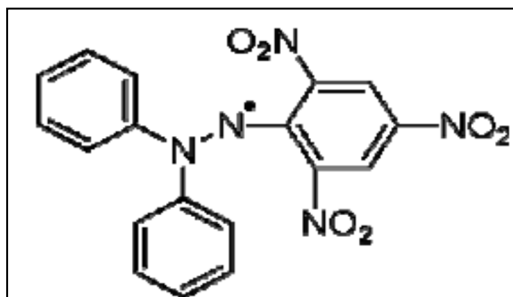


Figure 19 : Structure du radical DPPH [88]

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH- groupes. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles [88].

La méthode de DPPH est la plus ancienne méthode indirecte utilisée pour déterminer l'activité antioxydant [76]. Elle est basée sur la mesure spectrophotométrique de changement de la concentration du radical de DPPH résultant de la réaction de DPPH avec un antioxydant.

Au cours de la réaction, les antioxydants (donneurs de H) réagissent avec DPPH et il est réduit au DPPH-H (1,1-diphényl-2-picrylhydrazine). Par conséquent, la couleur de la solution change allant de violet au jaune pâle [89] et l'absorbance diminue, passant de la forme radical DPPH à la forme DPPH-H.

Le degré de décoloration indique le potentiel de l'activité antioxydante des extraits en terme de capacité de donneur d'hydrogène [90]. Le test DPPH est largement utilisé car il est considéré comme une méthode simple rapide, facile à mettre en œuvre [88] le radical DPPH est stable et le système réactionnel implique une réaction directe entre le radical libre et antioxydant [91].

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la méthode et l'interprétation des données expérimentales comme le solvant, pH, temps de réaction, réactif et la concentration de l'échantillon [86].

Pour estimer l'activité anti radicalaire, 1000µl de la solution de DPPH sont ajoutés à 100µl de l'extrait, l'absorbance est mesurée à 517nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante. Les résultats sont exprimés en pourcentage [92]

$$\text{Activité scavenger \%} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Contrôle : méthanol avec la solution DPPH.

4. Analyse statistique

Une analyse statistique des données est réalisée par le programme Microsoft Office Excel 2007 (caractérisation numérique) et par le logiciel STATISTICA par application d'une ANOVA/MANOVA.

Les résultats sont classés par ordre décroissant a>b>c>d. Les valeurs obtenues portant la même lettre ne présentent aucune différence significative et les barres verticales représentent les écarts types.

1. Quantification des composés phénoliques

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sont généralement utilisés pour l'extraction [93].

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir de matériel végétal. Les phénols sont généralement extraits, selon leur solubilité varie d'une classe de composés à une autre, dépendant des substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles [94] : [95]

Le méthanol est recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques [96]. Le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydés par des enzymes, telles que des phénoloxydases [56].

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits préparés à partir des grains et des tiges de *R. Sphaerocarpa*, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes a été effectué. La principale raison pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

1.1. Quantification des phénols totaux

La teneur en polyphénols est estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer tels que les caroténoïdes et quelques sucres et acides aminés. Cependant, elle reste la méthode la plus utilisée pour déterminer la concentration des polyphénols totaux [97].

Les teneurs en phénols totaux exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique sont représentés dans la figure (20)

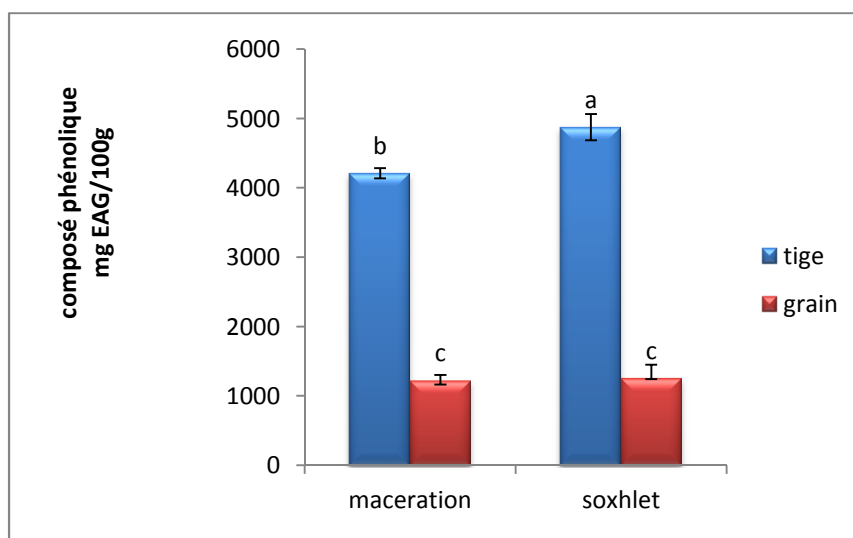


Figure 20 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits de *R. sphaerocarpa*

Selon la figure 20, l'extrait de tiges de *R. Sphaerocarpa* obtenu par la méthode du soxhlet révèle la plus grande teneur en composés phénoliques de valeur 4874,06 mg EAG/100g d'échantillon qui donne une différence significative ($p < 0.05$) avec les autres extraits, la plus petite teneur en composés phénoliques est enregistrée dans l'extrait de grains de l'espèce étudiée obtenu par la méthode de macération avec une valeur de 1227,687 mg/100mg d'échantillon qui ne révèle aucune différence significative avec l'extrait de grains obtenus par le soxhlet et une différence significative ($p < 0.05$) avec les autres extraits.

L'extraction par soxhlet a donné des meilleurs teneurs en composés phénoliques par rapport à l'extraction par macération. Cela est due au fait que l'extraction par soxhlet est un cycle qui se répète indéfiniment et qui peut ainsi épuiser complètement la matière végétale en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations. Le solvant est constamment distillé, de sorte qu'il ne se sature jamais. Même si la substance extraite est en grande quantité par rapport au solvant et qu'elle dépasse sa solubilité maximale, c'est toujours du solvant pur qui retombe dans l'évaporateur [74]. Les résultats obtenus montrent que les tiges de *R. Sphaerocarpa* est la partie la plus riche en composés phénoliques que les grains.

1.2. Quantification des flavonoïdes

La raison principale pour la quelle cette classe de polyphénols est choisi, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits [98].

La spectrophotométrie a permis de quantifier les flavonoïdes dans les extraits de la plante étudiée, ces résultats sont représentés dans la figure 21.

Dans cette étude, l'évaluation des teneurs des extraits des grains et tiges de *R. Sphaerocarpa* en flavonoïdes a été déduite de la courbe d'étalonnage (annexe 2) réalisé avec la quercétine et les valeurs sont exprimées en mg EQ/100g d'extrait.

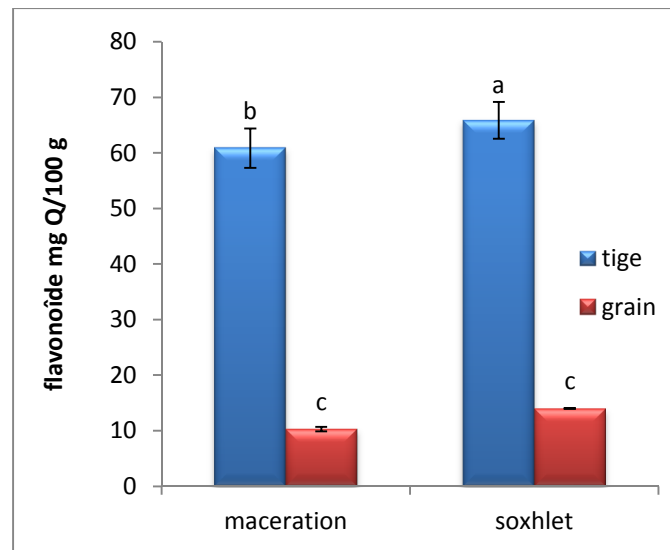


Figure 21 : Teneurs en flavonoïdes des extraits de *R. sphaerocarpa*

La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg EQ/100g d'échantillon. Les données sont présentées sous forme de moyenne de 10.29 à 65.86 mg EQ/100g d'échantillon,

Les teneurs de l'extrait des tiges obtenues par le soxhlet donnent une valeur élevée qui correspond à 65.86 et qui diffère significativement ($p < 0.05$) avec les autres extraits, par ailleurs les teneurs de l'extrait des grains obtenues par macération ne donnent que 10.29 sans aucune différence significative avec les teneurs de l'extrait des grains obtenue par soxhlet.

Du point de vue statistique, le taux en flavonoïdes des extraits de tiges et de grains diffèrent significativement où les premiers sont les plus riches en ces molécules.

En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des composés phénoliques dans tous les extraits, il est remarquable qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (acides phénoliques, tanins...).

2. Activité anti-oxydante

Les antioxydants naturels sont considérés comme une solution intéressante pour remplacer les antioxydants synthétiques et qui peuvent être employés pour empêcher les maladies et l'oxydation des systèmes complexes des aliments.

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire [99].

Les résultats de détermination de la capacité antioxydante d'un extrait dépendent considérablement de la méthodologie utilisée, de l'oxydant et du substrat oxydable utilisé dans la mesure [100]. Par conséquent, il est important de comparer les différentes méthodes analytiques variantes dans leur cible d'oxydation afin de comprendre l'activité biologique d'un antioxydant et d'obtenir des données précises pour une meilleure comparaison avec les travaux déjà publiés [101].

La propriété antioxydante des extraits de *R. Sphaerocarpa* ne peut pas être évaluée par une seule méthode qui est due à la nature complexe de leurs constituants. Dans cette étude, deux méthodes sont employées (pouvoir réducteur et activité anti radicalaire contre le DPPH).

2.1. Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité anti oxydante de l'extrait testé.

Le pouvoir réducteur des extraits de *R. Sphaerocarpa* est exprimés en mg EAG/100g d'échantillon et les résultats obtenus sont représentés dans la figure (22)

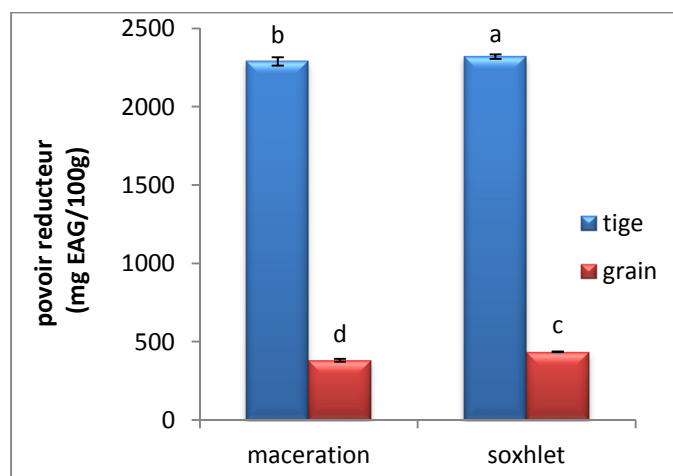


Figure 22: Pouvoir réducteur des extraits de *R. Sphaerocarpa*

La figure 22 montre que l'extrait de tige de *R. Sphaerocarpa* obtenu par le soxhlet se distingue par le meilleur pouvoir réducteur avec une valeur de 2320,357 mg EAG/100g d'échantillon. Il révèle une différence significative avec tous les autres extraits.

Par ailleurs, la plus faible activité est obtenue par l'extrait des grains de *R. Sphaerocarpa* par macération avec une valeur de 380,650 mg EAG/100g d'échantillon et qui diffère aussi significativement avec le reste des extraits. Les deux parties de la plante désignent une différence significative et c'est la partie tiges qui possède le pouvoir réducteur le plus puissant.

2.2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire

Le radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des molécules biologiques. Ce test n'est pas quantitatif, il permet de comparer les différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH. Il est réduit en présence d'antioxydant qui entraîne sa décoloration par le transfert de proton [88](figure 23).

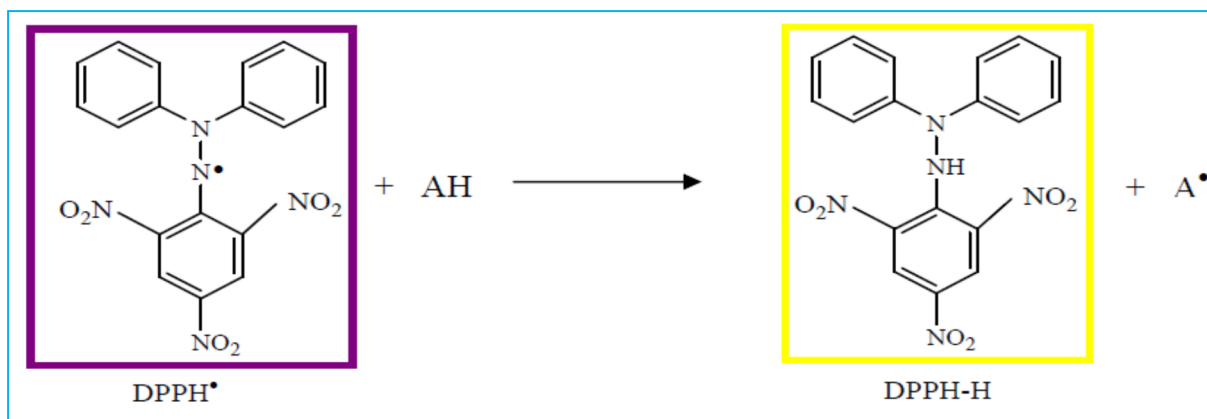


Figure 23 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant [102].

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant [103] ;[104] ;[105]. Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant [106].

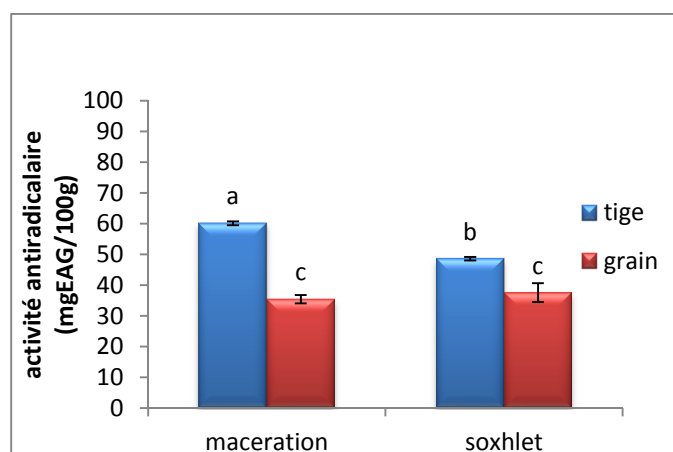


Figure 24: Activité anti-radicalaire des extraits de *R. sphaerocarpa*.

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de l'activité antiradicalaire ou en pourcentage de DPPH restant. Ils peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC₅₀, qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH [107].

La figure 25 montre que tous les extraits testés sont des anti-radicalaire, l'extrait des tiges obtenu par macération a une concentration de 0.02mg/ml présente le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (60.76%) qui diffère significativement par rapport aux autres extraits, et l'extrait des grains obtenu par soxhlet montre que l'activité antiradicalaire la plus faible et ne présente aucune différence significative avec l'extrait des grains obtenu par macération.

Les extraits obtenus par macération a donné les meilleur résultats par rapport au soxhlet, avec une différence significative ($p < 0.05$) des tiges avec les autres extraits et aucune différence significative entre les grains et cela et due a l'extraction au soxhlet qui se fait au point d'ébullition du solvant au cours de longs périodes, ce qui peut entrainer la altération thermique des substances cibles [108] ;[109] ;[110].

Les extraits des tiges sont généralement les plus actives par rapport aux autres extraits des grains, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants [96].

3. Corrélations antioxydants et activités antioxydante

Dans le but de déterminer la relation existante entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénolique des extraits de tiges et grains de *R. Sphaerocarpa*, les facteurs de corrélation sont déterminés et résumé dans le tableau IV.

	Pouvoir Réducteur		DPPH %	
	Tiges	grains	tiges	grains
Polyphénols	0.64	0.23	0.95	0.17
Flavonoïdes	0.26	0.98	0.63	0.45

Tableau IV : facteur de corrélations antioxydants et activité antioxydante.

3.1. Polyphénols

Les phénols totaux semblent contribuer de manière importante à l'activité scavenger de DPPH, notamment les extraits de tiges qui présentent des coefficients de corrélation $r=0.95$ et $r= 0.64$, respectivement. Cependant, les extraits des tiges révèlent des très faibles corrélations avec des coefficients $r= 0.23$ et $r= 0.17$ pour le pouvoir réducteur et l'activité scavenger de DPPH respectivement.

Les niveaux élevés des phénols sont souvent accompagnés d'une capacité antioxydante élevée des extraits de tiges car les polyphénols sont des excellents piègeurs des radicaux libres et le nombre de groupe hydroxyle sur l'anneau phénylique est responsable de l'augmentation de la capacité antioxydante d'une molécule polyphénolique [110].

3.2. Flavonoïdes

Le tableau révèle l'existence des corrélations linéaires entre l'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits de tiges et de grains de *R. sphaerocarpa* et leur teneurs en flavonoïdes ($r= 0.63$ et $r= 0.45$ respectivement). En outre, une excellente corrélation entre le pouvoir réducteur des extraits de grains et les teneurs en flavonoïdes ($r= 0.98$) est obtenue.

Cependant, l'extrait des tiges montrent une corrélation faible avec un coefficient de $r= 0.26$. Ces résultats indiquent que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la quantité, mais également de la qualité et de la structure des antioxydants [24].

L'étude réalisée a pour but d'évaluer quantitativement et qualitativement les substances antioxydants contenues dans les grains et tiges de la plante *R. Sphaerocarpa* poussant dans la région de Béjaïa. Les extraits sont obtenus par la méthode de macération et par le soxhlet. L'activité antioxydant *in vitro* obtenue par la méthode du pouvoir réducteur et les effets anti radicalaire par le test DPPH ont été estimés pour les différents extraits de la plante *R. Sphaerocarpa*.

Le dosage des composés phénoliques des quatre extraits a montré que ces derniers sont riches en phénols totaux et en flavonoïdes. Les extraits de tiges par les méthodes d'extraction de l'espèce étudiée sont intéressants en raison de leurs teneurs élevées en phénols totaux qui sont arrivés jusqu'à 4874,060 mg EAG/100 g d'échantillon, et une teneur de 65.86 mg EQ/100g d'échantillon en flavonoïdes pour l'extrait de tiges obtenu par la méthode du soxhlet.

L'activité antioxydant des extraits de *R. Sphaerocarpa* varie considérablement d'un extrait à un autre, elle dépend de plusieurs facteurs: la partie de la plante, la concentration et la nature des composés phénoliques contenu dans chaque extrait. L'extrait de tiges obtenu par la méthode du soxhlet révèle un pouvoir réducteur plus puissant avec une valeur de 2320,357 mg EAG/100g d'échantillon.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire par le test DPPH a montrée que les extraits de tiges manifestent des effets très importants, supérieur à 60% notamment pour l'extrait de tiges obtenu par macération et un effet supérieur à 40% pour l'extrait de tiges obtenu par soxhlet.

Ces résultats préliminaires témoignent de la richesse de ces extraits en composés phénoliques, ils ouvrent des perspectives vers des études plus approfondies qui se résument dans les points suivants :

- Élargir l'échantillonnage et d'augmenter le nombre d'échantillons de *R. Sphaerocarpa*.
- Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de l'espèce *R. Sphaerocarpa*.
- Caractérisation d'autres composés actifs dans ces extraits par des méthodes physiques d'analyses.
- Evaluer d'autres effets biologiques *in vivo* des extraits et de leurs composés actifs en utilisant les différentes techniques.

- [1] **Vercaurteren J. (2006).** Plan, schémas, formules du cours de pharmacognosie-formation commune de base. *Université MontpellierI.* 247P.
- [2] **Diallo A. (2005).** Etude de la Phytochimie et des activités Biologiques de *syzygium guineense* willd. (*MYRTACEAE*). *Thèse de Doctorat*, Université de Bamako de Mali, 99p.
- [3] **Mehnane W. (2010).** Appréciation de la diversité génétique du genre *Rétama* par les marqueurs biochimiques. *Mémoire De Magister*, Université Mentouri de Constantine, 48p.
- [4] **Duhoux E. et Nicole M. (2004).** biologie végétales association et interaction chez les plantes. Paris p166.
- [5] **Quezel P. et Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et les régions désertiques méridionale. tome1.Centre national de la recherche scientifique. Paris p 15.
- [6] **Maire R. et Quezel P. (1987).** Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara). Dicotyledonae, *lechvalier*, Paris 302p.
- [7] **Valladares F. et Pugnaire F-I. (1999).** Tradeoffs between Irradiance Capture and Avoidance in semi-aride Environments Assessed with a Crow Architecture Model. *Annals of Botany* 83, 459-459.
- [8] **Mauro N.M. (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+) –anatoxine- a et la (±) –camphécine-. *Thèse de doctorat.* 171p.
- [9] **EL Shazly A., Ateyaa A.M. et Witte L. (1996).** Quinolizidine alkaloid profiles of *R. Raetam*, *R. Sphaerocarpa* And *R. Monosperma*. *Zeitschrift Für Naturforschung* 51, 301-308.
- [10] **Galati G. et O'Brien P.J. (2004).** Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 287-303.

- [11] **Peluso M.R. (2006).** Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med* 231, 1287-1299.
- [12] **Louaar S., Akkal S., Laouer H. et Guilet D. (2007).** Flavonoids of *Rétama Sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43, 547.972.
- [13] **Martin-Cordero C., Lopez Lazaro M., Gil-Serrano A., Rodriguez Carvajal M.A. et Ayuso Gonzalez M.J. (1999).** Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry* 51, 1129–1131.
- [14] **Chopra C., k.Abrol B., Handa K.L. (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout de point de vue botanique. UNESCO, Paris. Pp: 75.
- [15] **Ishurd O., Kermagi A., Zgheel F. Flefla M. Elmabruk M. Yalin W. Kennedy J-F. et Yuanjiang P. (2004).** Structural aspects of water- soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. *Carbohydrate Polymers* 58, 41-44.
- [16] **Chaabi M. (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). *Thèse de Doctorat*, Université de Mentouri de constantine et Université Louis Pasteur.250p.
- [17] **Maghrani M., Zeggwagh N-A. Haloui M. et Eddouks M. (2005).** Acute diuretic effect of aqueous extract of *retama raetam* in normal rats. *Journal of ethnopharmacology* 99, 31-35.
- [18] **López-Làzaro M., Martín-Cordero C., Cortés F., Piñero J. et M. Jesús Ayuso (2000).** cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *retama sphaerocarpa* boissier. *Z. Naturorsch* 55, 40-43.
- [19] **Djemai Zoughlache S. (2009).** Etude De L'activité Biologique Des Extraits Du Fruit De *Zizyphus Lotus* L. *Mémoire De Magister*, Université -El Hadj Lakhder de Batna, 63p.

- [20] **Keskas N. (2011).** Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de *cachrys libanotis* .L .*Mémoire De Master*. Université De Setif, 39p.
- [21] **Maamri S. (2008).** Etude de *Pistacia Atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. *Mémoire De Magister*, Université de Boumerdes. P 57.
- [22] **Madi A. (2010).** Caractérisation Et Comparaison Du Contenu Polyphénolique De Deux Plantes Médicinales (Thym Et Saugé) Et La Mise En Evidence De Leurs Activités Biologiques. *Mémoire De Magister*, Université de Constantine.107p.
- [23] **Sarmi M.P. et Cheymer V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier*. P 2 -10.
- [24] **Arkoub L. (2011).** Activité biologique in vitro des extraits de *Fraxinus angustifolia* contre les radicaux ABTS⁺, O₂⁻ et NO[•] Et caractérisation des fractions active. *memoire de Magister*, Université de Bejaia.
- [25] **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Editions Tec & Doc Lavoisier, 1120p.
- [26] **Marfak A. (2003).** Radiolyse Gamma Des Flavonoïdes. Etude De Leur Réactivité Avec Les Radicaux Issus Des Alcools : Formation De Depsides. *Thèse de Doctorat*. Université De Limoges.199p.
- [27] **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo Aa. Capasso F.(1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65, 337-353
- [28] **Girotti –Chanu C. (2006).** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de *mirotea de bilis* .*thèse de Doctorat*, Institut national des sciences appliquées de Lyon.136p.
- [29] **Harborne J. B., Williams C. A. (2000).** Advances In Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504

- [30] **Havsteen B. H. (2002).**The Biochemistry And Medical Significance Of The Flavonoids. *Pharmacol Therap* 96, 67-202.
- [31] **Dacosta Y. (2003).** Les Phytonutriments Bioactifs. Yves Dacosta. Paris, 317p.
- [32] **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4, 162-169.
- [33] **Derbel S. et Ghedira K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* 1, 28-34.
- [34] **Durand G., Polidori A. et Pucci B. (2003).** La vectorisation de pièges à radicaux libres Nouvelle stratégie thérapeutique. *L'actualité chimique*. 26-29.
- [35] **Halliwell B. (1995).**Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 54, 505-510
- [36] **Fang Y.Z. Yang S. et Wu G. (2002).** Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 18, 872– 879.
- [37] **Berger M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme* 20, 48–53.
- [38] **Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Pénicaud L. et Casteilla L. (2006).** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine/Sciences* 22.47-53.
- [39] **Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. et Leverve X. (2002).** Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation* 11, 411-420.
- [40] **Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L. et Had-Aissouni L. (2005).** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24, 502–509.
- [41] **Kuciel R. et Mazurkiewicz A. (2004).** Formation and Detoxification of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry and molecular biology education* 32, 183–186.

- [42] **Yu BP. (1994).** Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiology Review* 74: 139–162.
- [43] **Sahnoun Z., Jamoussi K. et Zeghal Km. (1998).** [Free Radicals And Antioxidants: Physiology, Human Pathology And Therapeutic Aspects]. *Thérapie* 53, 315-339.
- [44] **Fridovich I. (1978).** Superoxide Radicals, Superoxide Dismutase And The Aerobic Lifestyle. *Photochemistry Photobiology* 28, 733-741.
- [45] **Pattwell Dm. et Jackson Mj. (2004).** Contraction-Induced Oxidants As Mediators Of Adaptation And Damage In Skeletal Muscle. *Exercise Sport Science Review*. 32,14-8.
- [46] **Youssef H. (2008).** L'obésité De L'adolescent Libanais : Etude Epidémiologique Et Effets D'un Exercice Aigu Et Chronique Sur Le Stress Oxydant D'adolescentes En Surpoids. 313p.
- [47] **Cadenas E. et Davies Kj. (2000).** Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology & Medicine* 29, 222-230.
- [48] **Halliwell B., Gutteridge JM. (1989).** Antioxydant defences: endogenous and diet derived in Free Radicals In *Biology And Medicine*. Oxford biosciences edition. New York pp 79-185.
- [49] **Migdal C. et Serres M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 27 : 405-412.
- [50] **Babior B. M. et Lambeth J. D. et Nauseef W. (2002).** The Neutrophil NADPH Oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397, 342–344.
- [51] **Fialkow L., Wang Y. et Downey G. P. (2007).** Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine* 42, 153–164.
- [52] **Condliffe A. M., Kitchen E. et Chilvers E. R. (1998).** Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clinical Science* **94**, 461±471.

- [53] **Deby-Dupont G., Deby C. et M. Lamy (2002).** Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation* 11, 28-39.
- [54] **Favier A. (2003).** Le Stress Oxydant Intérêt Conceptuel Et Expérimental Dans La Compréhension Des Mécanismes Des Maladies Et Potentiel Thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.
- [55] **Pasquier C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires* 276, 87-92.
- [56] **Athamena S. (2009).** Etude Quantitative Des Flavonoïdes Des Graines De *Cuminum Cyminum* Et Les Feuilles De *Rosmarinus Officinalis* Et L'évaluation De L'activité Biologique. *Mémoire De Magister*, Université -El Hadj Lakhder de Batna, 90p.
- [57] **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J-O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme* 16, 233–239.
- [58] **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. et Chapelle fonc J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 62, 628-638.
- [59] **Sajous L., Botta A. et Sari-Minodier I. (2008).** Dosage de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine dans les urines : un biomarqueur du stress oxydatif d'origine environnementale? *Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of environmental oxidative stress? . Annale de Biologie Clinique* 66, 19-29.
- [60] **Sorg O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *C. R. Biologies* 327, 649–662.
- [61] **Fulbert J.C. et Cals M.J. (1992).** Les Radicaux Libres En Biologie Clinique : origine, rôle pathogène et moyens de défense. *Pathologie Biologie* 40, 66- 77.
- [62] **Ahmad S. (1995).** Oxidative Stress And Antioxidant Defenses In Biology. Chapman & Hall. New York, Pp 1-457.

- [63] **Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W. et Blake D.R. (1995).** Reactive Oxygen Species And Iron-A Dangerous Partnership In Inflammation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol* 27, 109-122.
- [64] **Nkhili E. (2009).** Polyphénols De L'alimentation : Extraction, Interactions Avec Les Ions Du Fer Et Du Cuivre, Oxydation Et Pouvoir Antioxydant .*Thèse de Doctorat.* Université de Marrakech. 320p.
- [65] **Muanda F.N. (2010).** Identification De Polyphenols, Evaluation De Leur Activité Antioxydante Et Etude De Leurs Propriétés Biologiques. *Thèse De Doctorat*, Université Paul Verlaine-Metz.300p.
- [66] **Zarrou B.(2009).** Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens (Asteracées)* et évaluation de leur activité antioxydante. *Mémoire de Master.* Université Kasdi Merbah Ouargla.46 p.
- [67] **Xu Y.C., Leung S.W.S., Yeung D.K.Y., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M. et Man R.Y.K. (2007).** Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 68, 1179-1188.
- [68] **Landolfi R., Mower R.L. et Steiner M. (1984).** Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology* 33,1525-1530.
- [69] **Izzo A. A. (1996).** PAF and the digestive tract. *Journal of Pharmacie and Pharmacology.* 48: 1103-1111.
- [70] **Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., Foidart J.M., De Pestel G. et Mareel M. (1991).** Effect of catechins and citrus Flavonoids on invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis* 9 :13-25.
- [71] **Larocca L.M., Giustacchini M., Maggiano N., Ranelletti F.O., Piantelli M., Alcini E. et Capelli A. (1994).** Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J Urol*, 152, 1029-1033.

- [72] **Scutt A., Meghji S., Canniff J.P. et Harvey W. (1987).** Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia* 43, 391-393.
- [73] **Makimura M., Hirasawa M., Kobayashi K., Indo J., Sakanaka S., Taguchi T. et Otake S. (1993).** Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol* 64, 630-636.
- [74] **Luque De Castro M.D., Garcia-Ayuso E. (1998).** Soxhlet Extraction Of Solid Materials An Outdated Technique With A Promising Innovative Future. *Analytica Chimica Acta* 369, 1-10.
- [75] **Abu Bakar M.F., Rahmat A. et Fry J. (2009).** Phytochemicals And Antioxidant Activity Of Different Parts Of Bambang (Mangifera Pajan) And Tarap (Artocarpus Odoratissimumus). *Food Chemistry* 113, 479-483.
- [76] **Roginsky V. et Lissi E. A. (2005).** Review Of Methods To Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity In Food. *Food Chemistry* 92, 235-254.
- [77] **Abdel-Hameed E. S. (2009).** Total Phenolic Contents And Free Radical Scavenging Activity Of Certain Egyptian Ficus Species Leaf Samples. *Food Chemistry* 114, 1271-1277.
- [78] **Cicco N., Lanorte M. T., Paraggio M., Viggiano M. et Lattanzio V. (2009).** A reproducible, rapid and inexpensive folin–ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91, 107-110.
- [79] **Naithani V., Nair S. et Kakkar P. (2006).** Decline in antioxidant capacity of indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. *Food Research International* 39, 176-181.
- [80] **Ribéreau Gayon, P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. *In Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod. 1-27.
- [81] **Gan Ch-Y. et Latiff A. A. (2011).** Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry* 124, 1277–1283.

- [82] **Sousa A., Ferreira I.C. F. R., Barros L., Bento A. et Pereira J. A. (2008).** Effet of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olive “alcaparras”. *LWT* 41, 739-745.
- [83] **Moreira L., Dias L.G., Pereira J. A. et Estevinho L. (2008).** Antioxidant properties, total phenols and *pollen* analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3482-3485.
- [84] **Gülçin I., Oktay M., Küfreviöglu Ö. I. et Aslan A. (2002).** Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology* 79. 325–329.
- [85] **Endo T., Fukunaga T., Yoshimura T. et Esumi K. (2006).** Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal–dendrimer nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science* 302, 516-521.
- [86] **Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J.D., Rinaldi M. et Arlorio M. (2009).** Study Of The Dpph -Scavenging Activity: Development Of A Free Software For The Correct Interpretation Of Data. *Food Chemistry* 114, 889-897.
- [87] **Dawidowicz A. L., Wianowska D. et Olszowy M. (2012).** On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by dpph method (problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry* 131, 1037-1043.
- [88] **Popovici C., Saykova I. et Tytkowski B. (2009).** Evaluation De l’activité Antioxydant Des Composés Phénoliques Par La Réactivité Avec Le Radical Libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4,25-39.
- [89] **Milardovic S., Ivekovic D. et Grabaric B. S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry* 68, 175-180.
- [90] **Mosquera O. M., Correa Y. M., Buitrago D. C. et Niño J. (2007).** Antioxidant activity of twenty five plants from colombian biodiversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 631-634.

- [91] **Noipa T., Srijaranai S., Tuntulani T. et Ngeontae W. (2011).** New Approach For Evaluation Of The Antioxidant Capacity Based On Scavenging Dpph Free Radical In Micelle Systems. *Food Research International* 44, 798-806.
- [92] **Brand-Williams W., Cuvelier M. E. et Berset C. (1995).** Use A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 28, 25-30.
- [93] **Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F. et Polat G. (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules* 12, 484-496.
- [94] **Macheix J.J., fleuriet A. et Jay-allemant C.H. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. *Presses polytechnique et universitaires romandes*.192.
- [95] **Naczk M. et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41. 1523–1542.
- [96] **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly Ch. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 331. 372–379.
- [97] **Moktan B., Saha J. et Sarkar P. K. (2008).** Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. *Food Research International* 41, 586–593.
- [98] **Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1220-1234.
- [99] **Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M-E., Topcu, G. (2007)** Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*103, 623-630.

- [100] **Morais M., Moreira L., Feas X. et Estevinho L. M. (2011).** Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 49 1096–1101
- [101] **Mărghitas L.A., Stanciu O.G., Dezmirean D.S., Bobis O., Popesar O., Bogdanov S. and Campos M.G. (2009).** In vitro antioxidant of honey bee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food chemistry* 115, 878-883.
- [102] **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de tlemcen. *Mémoire de Magistère*, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p.
- [103] **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal de Science Technologique* 26, 211-219.
- [104] **Tsimogiannis D.I. et Oreopoulou V. (2004).** Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 523-528.
- [105] **Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H. et Oreopoulou V. (2007).** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 155-162.
- [106] **Bondet V., Williams W.B. et Berset C. (1997).** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie* 30, 609-615.
- [107] **Markowicz Bastos D. H., Saldanha L. A., Catharino R. R., Sawaya A.C.H.F., Cunha I. B. S., Carvalho P. O. et Eberlin M. N. (2007).** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- [108] **Aspé E. et Fernández K. (2011).** The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial Crops and Products* 34, 838– 844.

- [109] **Bimakra M., Abdul Rahmana R., Taipa F. S., Ganjloob A., Md Salleha L., J. Selamat, Hamid A. et Zaidul I.S.M. (2011).** Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *food and bioproducts processing* 89, 67-72.
- [110] **LeBlanc W.B., Davice O.K., Boue S., Delucca A. et Deeby T. (2009).** Antioxydant activity of sonoran desert bee pollen. *Food chemistry* 115,1299-1305.

Annexes

Annexe : Courbes d'étalonnages

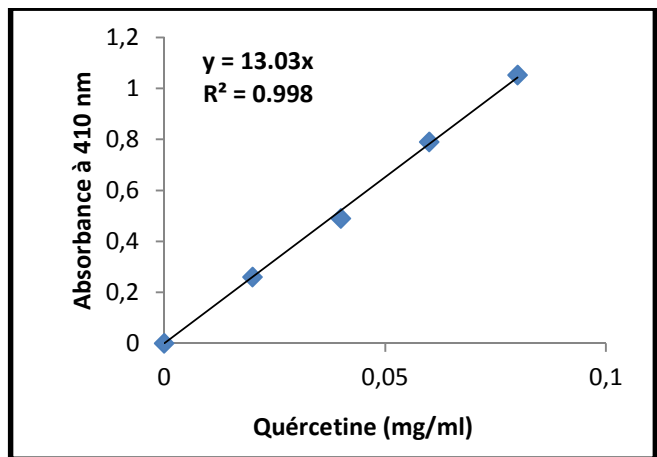
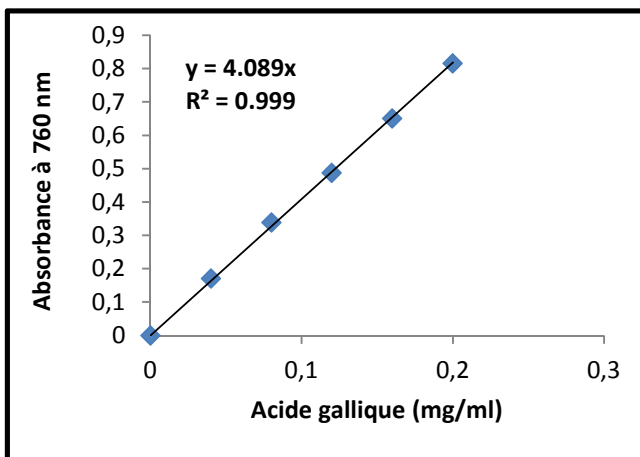


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols. Figure 2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

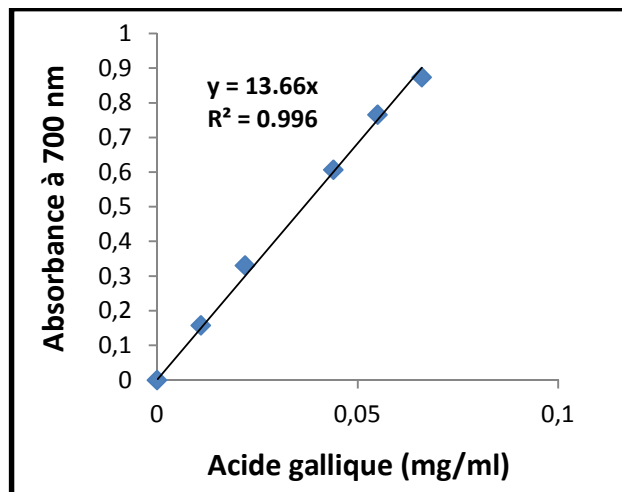


Figure 3 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'acide gallique.

Annexe : Courbes de corrélation

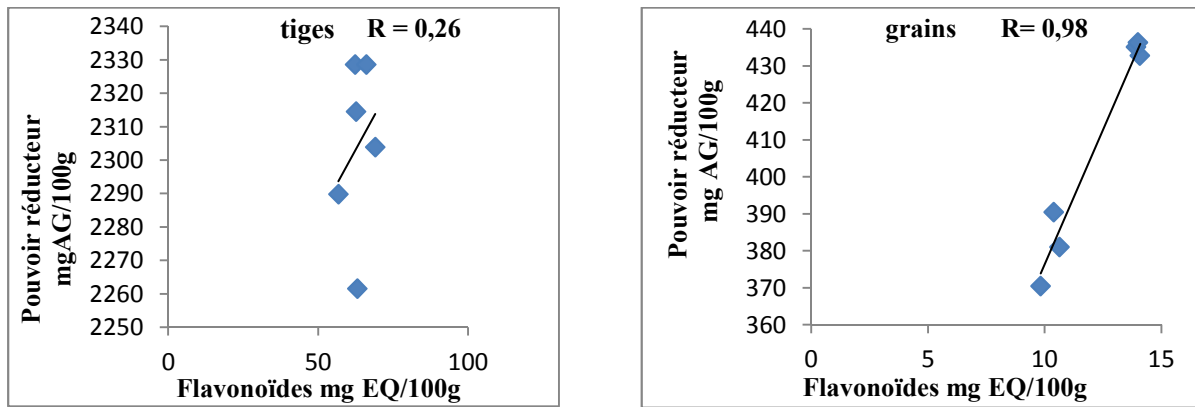


Figure 4 : Corrélation flavonoïdes et pouvoir réducteur

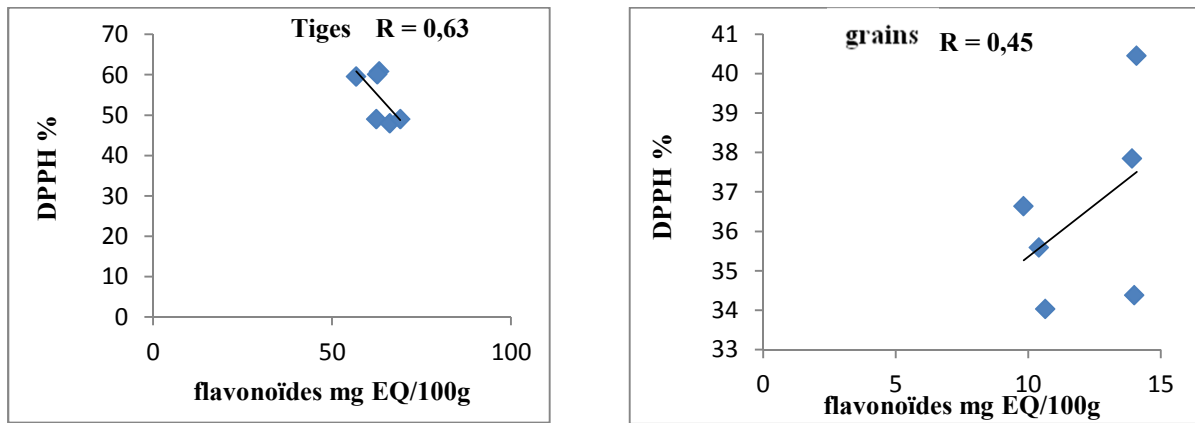


Figure 5 : Corrélation flavonoïdes et DPPH

Annexes

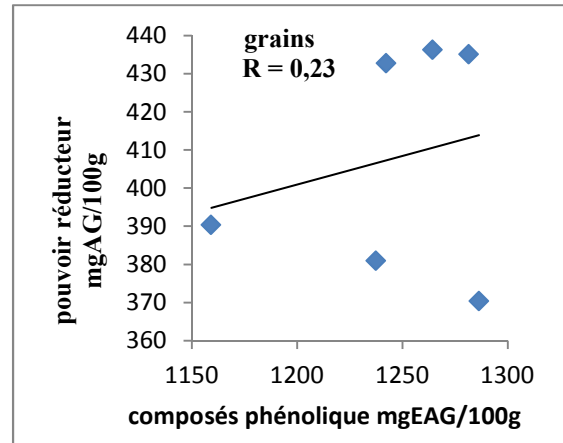
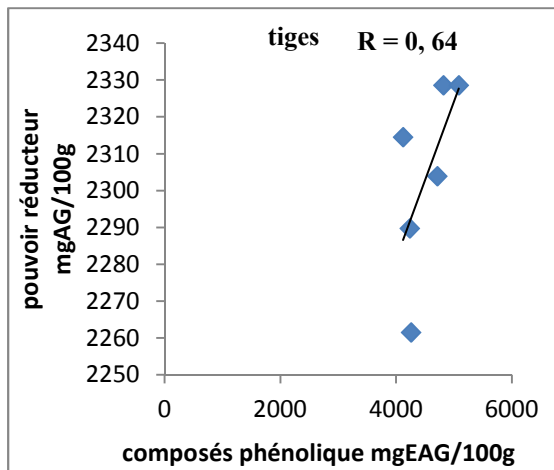


Figure 6 : Corrélation composés phénoliques et pouvoir réducteur

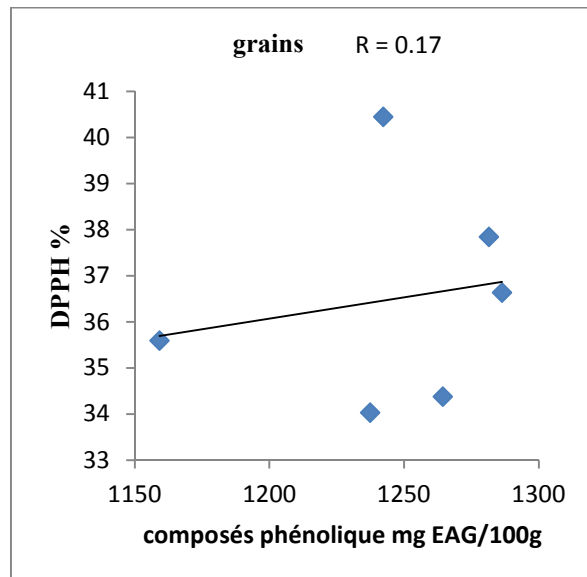
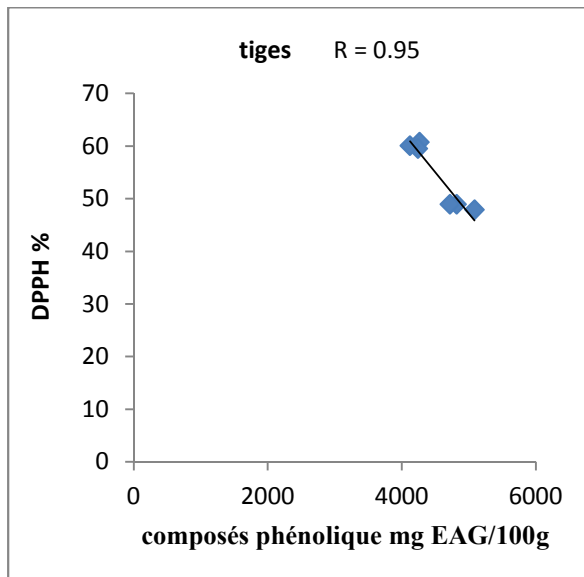
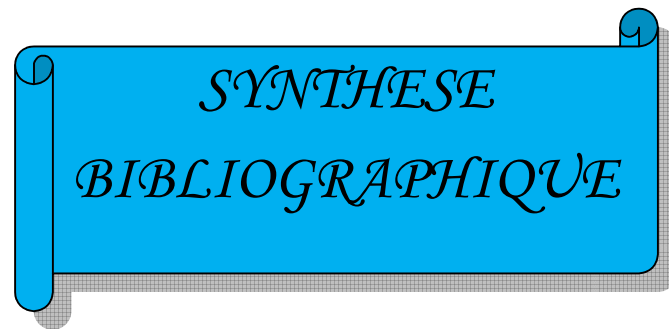


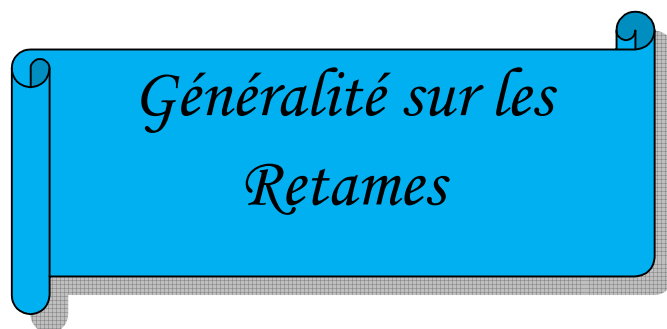
Figure 7 : Corrélation composés phénolique et DPPH



Introduction



*SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE*



*Généralité sur les
Retames*



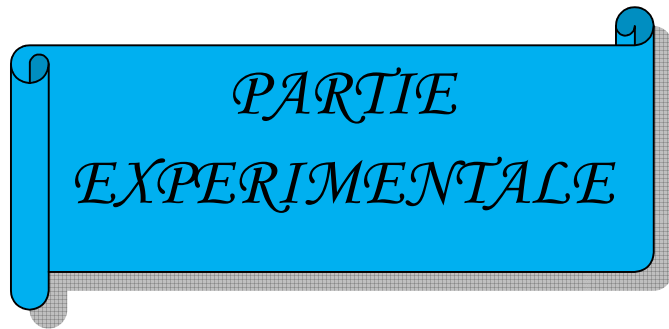
*MATÉRIELS ET
MÉTHODES*



*LES COMPOSES
PHENOLIQUES*



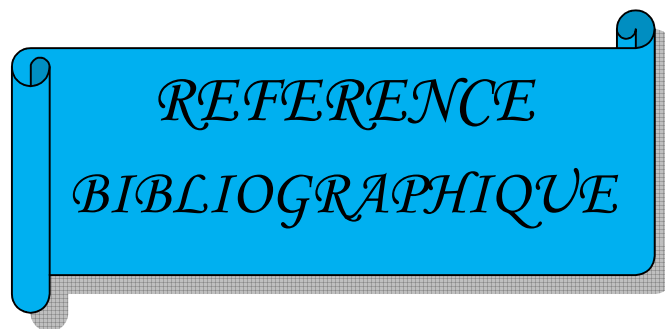
*RESULTATS ET
DISCUSSIONS*



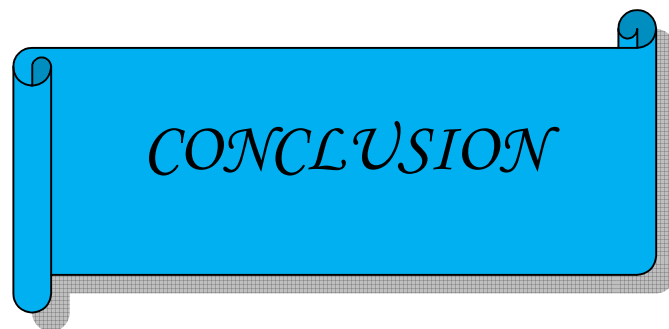
*PARTIE
EXPERIMENTALE*



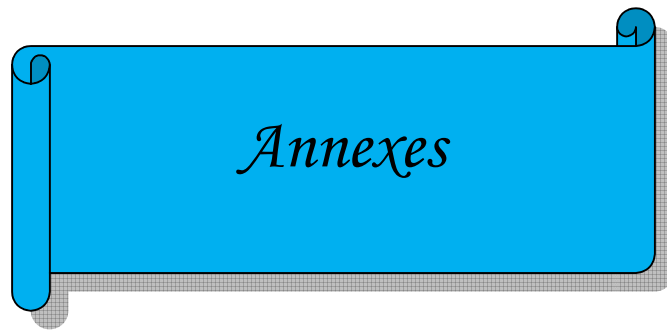
SOMMAIRE



*REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUE*



CONCLUSION



Résumé

La plante *Retama Sphaerocarpa* appartient à la famille des légumineuses qui sont reconnus pour leurs intérêts pharmacologiques et écologiques. La présente étude est entreprise dans le but d'évaluer la propriété antioxydante des extraits de grains et tiges de *R.Sphaerocarpa*.

L'extrait méthanolique des tiges de l'espèce *R.Sphaerocarpa* obtenu par la méthode d'extraction soxhlet est le plus riche en phénols totaux (4874,06 mg EAG/100 g d'échantillon) et en flavonoïdes (65,86 mg EQ/100 g d'échantillon) suivit de l'extrait de grains obtenu par soxhlet. Tous les extraits ont révélé une activité anti-radicalaire contre le radical libre DPPH allant de 60,76% jusqu'à 37,55% similaire à celle de la quercétine, et le pouvoir réducteur le plus élevé est enregistré au niveau de l'extrait des tiges obtenu par la méthode soxhlet avec une valeur de 2328,60 mg EQ/100g d'extrait, et le pouvoir réducteur le plus faible est de 370,46 mg EQ/100 g d'échantillon enregistré au niveau de l'extrait des grain obtenu par macération.

Mots clés : *Retama Sphaerocarpa*, polyphénols, macération, soxhlet, activité antioxydante.

Summary

The plant *Retama sphaerocarpa* belongs to the legume family, which is known for their pharmacological and ecological interests. This study was undertaken to evaluate the antioxidant property of the extracts of grain and stalks of *R.Sphaerocarpa*.

The méthanolique rods species *R.Sphaerocarpa* extract obtained by the Soxhlet extraction method is richer in total phenols (4874.06 mg EAG/100 g sample) and flavonoids (65.86 mg EQ / 100 g of sample) followed by the seed extract obtained by soxhlet. All extracts showed anti-radical activity against DPPH free radical ranging from 60.76% to 37.55% similar to quercetin, and the highest reducing power is stored in the extract rods obtained by the soxhlet method with a value of 2328.60 mg EQ/100g extract and the lowest reducing power is 370.46 mg eq/100 g sample recorded at the extracts grain obtained by maceration.