

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

N° d'ordre.....

Série.....

**THESE**

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)

En Chimie Organique

Option Phytochimie

Par

**MAANANI DJAMILA**

*Thème*

**Etude phytochimique et valorisation biologique  
de deux plantes, *Genista microcephala* Coss &  
Dur (Fabaceae) et *Jurinea humilis* DC  
(Asteraceae)**

**Soutenue publiquement le 20/12/2018**

*Membres du jury :*

**Pr. Salah AKKAL**

**U. Constantine Frères Mentouri**

**Président**

**Pr. Salah RHOUATI**

**U. Constantine Frères Mentouri**

**Directeur de thèse**

**Pr. Amar ZELLAGUI**

**U. Larbi Benmhidi- Oum El-Bouaghi**

**Co-encadreur**

**Pr. Noureddine GHERRAF**

**U. Larbi Benmhidi- Oum El-Bouaghi**

**Examineur**

**Mc. Ahmed TOUIL**

**U. Constantine Frères Mentouri**

**Examineur**

**2018/2019**

Ne laissez pas le comportement des autres détruire votre paix intérieure.

**Dalai Lama**



## **Remerciement**

*Ce travail de thèse, a été réalisé dans le Laboratoire des produits naturels d'origine végétale et synthèse organique (Physynor), Université Mentouri-Constantine 1 sous la direction du Professeur Salah RHOUATI.*

*A l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tout ceux qui ont contribué à sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.*

*Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Salah RHOUATI, de m'avoir accueillie et permis de réaliser mon travail de doctorat, dans son laboratoire. Aussi, je lui exprime mon immense reconnaissance pour sa confiance en m'offrant un grand espace de liberté dans mes recherches en m'accordant tout son attention et générosité.*

*Je remerci également, mon Co-encadreur Monsieur le Professeur Mr. Amar ZELLAGUI, professeur à l'Université Larbi Ben 'Mhid Oum El Bouaghi, pour ses précieuses conseils ainsi que sa patience, pour m'avoir fait confiance. Pour sa grande générosité, sa disponibilité et sa rigueur scientifique qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à témoigner de ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeure Salah AKKAL professeur à l'Université frères Mentouri Constantine 1. Merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique et merci pour votre aide précieuse lors de la rédaction de cette thèse. Vous avez toujours su vous montrer disponible quand j'en avais vraiment besoin, les remerciements exprimés ici donc ne seront jamais à la hauteur de votre implication dans la réalisation de ce travail de thèse.*

*Je remercie Melle le Docteur Narimane SAGUENI de l'Université de Constantine 3, pour les échanges scientifiques tout au long de la réalisation de l'article. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit agréée de ma profonde gratitude.*

*Je remercie de même Monsieur le Docteur Yavuz Selim ÇAKMAK et Madame docteur Maltem ASAN-OZUSAGLAM pour leurs accueils dans leurs Centre de recherche et d'application scientifique et technologique, Laboratoire de biotechnologie, Université Aksaray, Turquie, pour un stage d'un mois me permettant la réalisation des tests sur l'activité Antioxydant et antimicrobienne.*

*Je remercie vivement Monsieur le Professeur José Carlos MENENDEZ, Université Complutense, Madrid, Espagne, pour sa compétence et son Professionnalisme exemplaires qui m'ont permis, en presque trois mois de stage, s'avoir accès aux différents services de la*

*Faculté de Pharmacie de Madrid, de faire toute la gamme spectrale (RMN, MS) en se montrant disponible tout au long du stage, en particulier l'identification structural par RMN.*

*Je remercie Monsieur le Professeur Salah AKKAL encore une fois, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence du jury. Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Nouredine GHERRAF, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi, Monsieur le Professeur Ahmed TOUIL de l'Université de Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

## **Dédicaces**

***Louange et Gloire à Allah, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.***

♥ *A mes chers **parents** qui m'ont aidé à devenir ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection, je leurs dédie avec fierté ce travail qui reflète le fruit de l'attention, du sacrifice et de leurs soutiens moral qu'ils m'ont tant réservés, je leur suis très reconnaissante et j'aurais tant aimé partager la joie de ma réussite avec eux.*

♥ *A mon **mari** qui m'a aidé de passé les moments difficiles, pour sa patience et son soutien inconditionnel.*

♥ *A ma fille mon trésor que Allah m'a offert **Alaa**.*

♥ *A mes nièces **Anfel** et **Nihal** que dieux les protèges.*

♥ *A ma chère sœur **Ilef** pour son amour et soin.*

♥ *A mes chers frères: **Mustepha** et **Dhirar** pour leur amour.*

♥ *A mes chères amies : **Nadia**, **Wafiya** et **Roumaissa** pour leurs amour et soins.*

## *Liste d'abréviations*

### **Solvants:**

AcOEt : acétate d'éthyle  
AcOH : Acide acétique  
n-BuOH : butanol  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Dichlorométhane  
CH<sub>3</sub>OH : méthanol  
DMSO-d<sub>6</sub> : diméthylsulfoxyde deutéré  
EtOH : Ethanol  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : Acide borique  
HCl : Acide chlorhydrique  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : acide sulfurique  
MeOH : méthanol  
NaOAc : acétate de sodium  
NaOH : Hydroxide de sodium

### **Techniques chromatographiques :**

CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CC : Chromatographie sur Colonne  
CMS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse  
L : litre  
ml : millilitre  
min : minute  
SiO<sub>2</sub> : silice normale

### **Détermination structurale**

Gal : galactose  
Glu: glucose  
Rha: rhamnose  
COSY: Correlated SpectroscopY  
*d* : doublet  
*dd* : doublet de doublets  
HMBC: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity  
J (Hz) : constante de couplage exprimée en Hertz  
*m*: multiplet

ppm : parties par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

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

RMN1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

*s* : singulet

*t* : triplet

δC : Déplacement chimique du carbone en ppm

δH : Déplacement chimique du proton en ppm

UV : Ultra-violet

λ : Longueur d'onde

### **Activité biologique**

A: Absorbance

AFNOR: Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)

BHA: Butylhydroxyanisole

BHT: Butylhydroxytoluène

EMAG : Esters méthyliques d'acides gras

GN : La gélose nutritive

BST : bouillon de soja trypsique

LDP : La levure Dextrose Peptone

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Structures des isoflavonoïdes isolées dans le genre <i>Genista</i> (Fabaceae).	<b>10</b>
<b>Tableau 2</b> : Composition d'huile essentielle de <i>Genista microcephala</i> .	<b>15</b>
<b>Tableau 3</b> : L'activité antibactérienne des extraits aqueux et éthanoliques (50 mg / ml) de <i>Genista microcephala</i> .	<b>17</b>
<b>Tableau 4</b> : Les différents métabolismes secondaires isolé du genre <i>Jurinea</i> .	<b>21</b>
<b>Tableau 5</b> : Les résultats de l'activité antioxydant de <i>Jurinea humilis</i> DC.	<b>23</b>
<b>Tableau 6</b> : Les résultats de l'activité antimicrobienne de <i>Jurinea humilis</i> DC.	<b>25</b>
<b>Tableau 7</b> : l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R <sub>f</sub> .	<b>45</b>
<b>Tableau 8</b> : la relation entre La fluorescence sous lumière de Wood et la structure chimique flavonique.	<b>45</b>
<b>Tableau 9</b> : Bandes d'absorption caractéristique.	<b>47</b>
<b>Tableau 10</b> : les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs.	<b>49</b>
<b>Tableau 11</b> : La séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>G. microcephala</i> .	<b>62</b>
<b>Tableau 12</b> : La progression de la colonne polyamide de l'extrait n-butanolique.	<b>63</b>
<b>Tableau 13</b> : Les caractéristiques des produits purs obtenus du <i>Genista microcephala</i> .	<b>64</b>
<b>Tableau 14</b> : Donnée de la série spectrale UV-Visible de composé <b>1</b> .	<b>66</b>
<b>Tableau 15</b> : Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup> H (250 MHz), RMN <sup>13</sup> C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé <b>1</b> .	<b>70</b>
<b>Tableau 16</b> : Donnée de la série UV-Visible de composé <b>2</b> .	<b>73</b>
<b>Tableau 17</b> : Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup> H (250 MHz), RMN <sup>13</sup> C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé <b>2</b> .	<b>77</b>
<b>Tableau 18</b> : Donnée de la série UV-Visible du composé <b>3</b> .	<b>79</b>
<b>Tableau 19</b> : Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup> H (250 MHz), RMN <sup>13</sup> C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé <b>3</b> .	<b>87</b>
<b>Tableau 20</b> : Donnée de la série UV-Visible du composé <b>4</b> .	<b>89</b>
<b>Tableau 21</b> : Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup> H (250 MHz), RMN <sup>13</sup> C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé <b>4</b> .	<b>96</b>



<b>Tableau 22</b> : Données de la série UV-Visible du composé <b>5</b> .	<b>98</b>
<b>Tableau 23</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (250 MHz), RMN <sup>13</sup> C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé <b>5</b> .	<b>105</b>
<b>Tableau 24</b> : Les masses des extraits du <i>Jurinea humilis</i> DC.	<b>109</b>
<b>Tableau 25</b> : Résultats du fractionnement de l'extrait butanolique.	<b>109</b>
<b>Tableau 26</b> : Regroupement des sous fractions de la colonne de Sephadex LH 20	<b>110</b>
<b>Tableau 27</b> : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P1.	<b>113</b>
<b>Tableau 28</b> : Données relatives à la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé P1.	<b>115</b>
<b>Tableau 29</b> : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P2.	<b>118</b>
<b>Tableau 30</b> : Données relatives à la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé P2.	<b>122</b>
<b>Tableau 31</b> : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P3.	<b>126</b>
<b>Tableau 32</b> : données spectrales RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé P3.	<b>130</b>
<b>Tableau 33</b> : Teneur totale en phénol et flavonoïdes de <i>G. microcephala</i> .	<b>145</b>
<b>Tableau 34</b> : L'activité antimicrobienne des extraits de <i>G.microcephala</i> .	<b>148</b>
<b>Tableau 35</b> : L'activité antimicrobienne des acides gras de <i>G.microcephala</i> .	<b>152</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Carte de répartition de la famille de Fabaceae (Heywood, 1996).	<b>8</b>
<b>Figure 2</b> : Espèce <i>Genista microcephala</i> coss & dur.	<b>13</b>
<b>Figure 3</b> : Les métabolismes secondaires isoler et identifier dans <i>G.microcephala</i> ....	<b>15</b>
<b>Figure 4</b> : L'espèce <i>Jurinea humilis</i> DC.	<b>22</b>
<b>Figure 5</b> : Structures des flavonoïdes : enchaînement C6-C3-C6.	<b>33</b>
<b>Figure 6</b> : Structure des différentes sous-classes des flavonoïdes au sens strict.	<b>35</b>
<b>Figure 7</b> : Biosynthèse des flavonoïdes.	<b>36</b>
<b>Figure 8</b> : Structure des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes.	<b>40</b>
<b>Figure 9</b> : Biosynthèse des isoflavonoïdes.	<b>41</b>
<b>Figure 10</b> : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.	<b>47</b>
<b>Figure 11</b> : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Genista microcephala</i> .	<b>60</b>
<b>Figure 12</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1.	<b>65</b>
<b>Figure 13</b> : Série spectrale UV-Visible du composé 1.	<b>66</b>
<b>Figure 14 a</b> : Le spectre <sup>1</sup> H du composé 1 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>67</b>
<b>Figure 14 b</b> : L'étalement de spectre RMN <sup>1</sup> H du composé 1 entre (6-7.3 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>68</b>
<b>Figure 15</b> : Le spectre <sup>13</sup> C du composé 1 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>69</b>
<b>Figure 16</b> : Le spectre DEPT 135 du composé 1 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>70</b>
<b>Figure 17</b> : Structure du 4', 5, 7-tri-hydroxyisoflavone Génistéine.	<b>71</b>
<b>Figure 18</b> : Rayon X (RX) du 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone Génistéine.	<b>71</b>
<b>Figure 19</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 2.	<b>72</b>
<b>Figure 20</b> : Série spectrale UV-Visible du composé 2.	<b>73</b>
<b>Figure 21a</b> : Le spectre <sup>1</sup> H du composé 2 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>74</b>
<b>Figure 21b</b> : L'étalement de spectre RMN <sup>1</sup> H du composé 2 entre (6.80-7.05 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>75</b>

<b>Figure 22</b> : Le spectre $^{13}\text{C}$ du composé 2 enregistré dans DMSO-d6.	<b>76</b>
<b>Figure 23</b> : Le spectre DEPT 135 du composé 2 enregistré dans DMSO-d6.	<b>76</b>
<b>Figure 24</b> : Structure du <b>Daidzein</b> : 7, 4'- Dihydroxy isoflavone.	<b>77</b>
<b>Figure 25</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 3.	<b>78</b>
<b>Figure 26</b> : Série spectrale UV-Visible du composé 3.	<b>79</b>
<b>Figure 27</b> : Le spectre $^1\text{H}$ du composé 3 enregistré dans DMSO-d6.	<b>81</b>
<b>Figure 28</b> : Le spectre $^{13}\text{C}$ du composé 3 enregistré dans DMSO-d6.	<b>82</b>
<b>Figure 29</b> : Le spectre RMN DEPT 135 du composé 3 enregistré dans DMSO-d6.	<b>83</b>
<b>Figure 30</b> : Le spectre HMQC du composé 3.	<b>85</b>
<b>Figure 31</b> : Le spectre HMBC du composé 3.	<b>86</b>
<b>Figure 32</b> : Structure du 5-méthoxy Daidzein.	<b>87</b>
<b>Figure 33</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 4.	<b>88</b>
<b>Figure 34</b> : Série spectrale UV-Visible du composé 4.	<b>89</b>
<b>Figure 35a</b> : Le spectre $^1\text{H}$ du composé 4 enregistré dans DMSO-d6.	<b>91</b>
<b>Figure 35 b</b> : L'étalement de spectre RMN $^1\text{H}$ du composé 4 entre (6.4-8.9 ppm) enregistré dans DMSO-d6.	<b>91</b>
<b>Figure 35 c</b> : L'étalement de spectre RMN $^1\text{H}$ du composé 4 entre (3.2-5.6ppm) enregistré dans DMSO-d6.	<b>92</b>
<b>Figure 36</b> : Le spectre $^{13}\text{C}$ du composé 4 enregistré dans DMSO-d6.	<b>93</b>
<b>Figure 37</b> : Le spectre DEPT 135 du composé 4 enregistré dans DMSO-d6.	<b>93</b>
<b>Figure 38</b> : Le spectre HMQC du composé 4.	<b>95</b>
<b>Figure 39</b> : Structure de 7-O- $\beta$ -D-glucoopyranosylgenistein.	<b>97</b>
<b>Figure 40</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 5.	<b>97</b>
<b>Figure 41</b> : Série spectrale UV-Visible du composé 5.	<b>98</b>
<b>Figure 42 a</b> : Le spectre $^1\text{H}$ du composé 5 enregistré dans DMSO-d6.	<b>100</b>
<b>Figure 42 b</b> : Le spectre RMN $^1\text{H}$ du composé 5 entre (6.8-9.8ppm) enregistré dans DMSO-d6.	<b>100</b>

<b>Figure 42 c</b> : Le spectre RMN $^1\text{H}$ du composé 5 (3-5.6 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>101</b>
<b>Figure 43</b> : Le spectre $^{13}\text{C}$ du composé 5 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>102</b>
<b>Figure 44</b> : Le spectre DEPT 135 du composé 5 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>103</b>
<b>Figure 45</b> : Le spectre HMQC du composé 5.	<b>104</b>
<b>Figure 46</b> : Structure de 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoyranosyl daidzein.	<b>106</b>
<b>Figure 47</b> : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes et les racines de <i>Jurinea humilis DC</i> .	<b>108</b>
<b>Figure 48</b> : Série spectrale UV-Visible du composé P1.	<b>112</b>
<b>Figure 49 a</b> : Le spectre RMN $^1\text{H}$ à 250 MHz du composé P1 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub>	<b>114</b>
<b>Figure 49 b</b> : L'étalement de spectre RMN $^1\text{H}$ du composé P1 entre (4.5-7.5 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> à 250 MHz.	<b>114</b>
<b>Figure 50</b> : La co-chromatographie des sucres libérés de composé P1.	<b>116</b>
<b>Figure 51</b> : La structure du composé P1 : 5, 7,4'trihydroxy, 3'- <i>O</i> - $\beta$ -D- glucosyl flavonol (Luteolin 3'- <i>O</i> - $\beta$ -D- Glucoside).	<b>116</b>
<b>Figure 52</b> : Série spectrale UV-Visible du composé P2.	<b>117</b>
<b>Figure 53 a</b> : Le spectre RMN $^1\text{H}$ à 250 MHz du composé P2 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>119</b>
<b>Figure 53 b</b> : L'étalement de spectre RMN $^1\text{H}$ du composé P2 entre (6-8 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub> à 250 MHz.	<b>120</b>
<b>Figure 54 a</b> : Le spectre RMN $^{13}\text{C}$ à 250 MHz du composé P2 enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub>	<b>121</b>
<b>Figure 54 b</b> : Le spectre RMN $^{13}\text{C}$ à 250 MHz du composé P2 entre (15-80 ppm) enregistré dans DMSO-d <sub>6</sub>	<b>121</b>
<b>Figure 55</b> : La co-chromatographie des sucres libérés de composé P2.	<b>123</b>
<b>Figure 56</b> : La structure du composé P2 (Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside : 5, 7,4'trihydroxy, 3'methoxy, 3- <i>O</i> -rhamnoglucosyl-flavone).	<b>123</b>
<b>Figure 57</b> : Série spectrale UV-Visible du composé P3	<b>125</b>
<b>Figure 58 a</b> : RMN $^1\text{H}$ du composé P3 à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>127</b>

<b>Figure 58 b</b> : L'étalement de spectre RMN <sup>1</sup> H du composé P3 entre (6-8 ppm) à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d6.	<b>128</b>
<b>Figure 58 c</b> : L'étalement de spectre RMN <sup>1</sup> H du composé P3 entre (1-5.5 ppm) à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d6.	<b>128</b>
<b>Figure 59</b> : RMN <sup>13</sup> C du composé P3 à 75 MHz enregistré dans le DMSO-d6.	<b>129</b>
<b>Figure 60</b> : la Co-chromatographie des sucres libérés de composé P3.	<b>130</b>
<b>Figure 61</b> : Structure du composé P3 : la Rutine ( <b>Quercétine 3-O-rutinoside</b> ).	<b>131</b>
<b>Figure 62</b> : Courbe d'étannolage de l'acide gallique.	<b>138</b>
<b>Figure 63</b> : La courbe d'étalonnage de la quercétine.	<b>139</b>
<b>Figure 64</b> : Activité de réduction de l'activité de l'ion ferrique (FRP) de <i>G. microcephala</i> .	<b>147</b>
<b>Figure 65</b> : Activité de réduction de la puissance du Cupric ion (CUPRAC) de <i>G. microcephala</i> .	<b>147</b>
<b>Figure 66</b> : La capacité Antioxydante totale de <i>G. microcephala</i> .	<b>148</b>
<b>Figure 67</b> : L'activité antimicrobienne de l'extrait des acides gras.	<b>151</b>

## *Table de matière*

<b>Introduction Générale</b>	<b>1</b>
<b>Références bibliographique</b>	<b>4</b>
<b>PARTIE- A : ETUDE PHYTOCHIMIQUE</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique sur les Deux Plantes</b>	<b>6</b>
<b>I.1. La Famille des Fabaceae (Leguminosae)</b>	<b>7</b>
<b>I.1.1. Caractère botanique</b>	<b>7</b>
<b>I.1.2. Répartition géographique des Fabaceae</b>	<b>8</b>
<b>I.1.3. Le Genre <i>Genista</i></b>	<b>8</b>
<b>I.1.3.1. Quelques activités biologiques du genre <i>Genista</i></b>	<b>9</b>
<b>I.1.3.2. Caractère chimique du genre <i>Genista</i></b>	<b>9</b>
<b>I.1.3.2.1. La classe des isoflavonoïdes</b>	<b>9</b>
<b>I.1.3.2.2. Les acides gras</b>	<b>11</b>
<b>I.1.4. L'étude phytochimique et biologique de l'espèce <i>Genista microcephala</i></b>	<b>12</b>
<b>I.1.4.1. Rappels botaniques</b>	<b>12</b>
<b>I.1.4.2. Place dans la systématique</b>	<b>13</b>
<b>I.1.4.3. Répartition géographique</b>	<b>14</b>
<b>I.1.4.4. Utilisation en médecine traditionnelle</b>	<b>14</b>
<b>I.1.4.5. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Genista microcephala</i></b>	<b>14</b>
<b>I.1.4.5.1. L'étude phytochimique</b>	<b>14</b>
<b>I.1.4.5.2. L'activité Biologique</b>	<b>16</b>
<b>I.2. La Famille des Astéraceae</b>	<b>18</b>
<b>I.2.1. Caractère botanique</b>	<b>18</b>
<b>I.2.2. Répartition géographique des Asteraceae</b>	<b>19</b>
<b>I.2.3. Le Genre <i>Jurinea</i></b>	<b>19</b>
<b>I.2.3.1. Quelques activités biologiques du genre <i>Jurinea</i></b>	<b>19</b>
<b>I.2.3.2. Caractère chimique du genre <i>Jurinea</i></b>	<b>20</b>
<b>I.2.4. L'espèce <i>Jurinea humilis</i></b>	<b>22</b>
<b>I.2.4.1. Description botanique de l'espèce <i>Jurinea humilis</i> DC</b>	<b>22</b>
<b>I.2.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle</b>	<b>23</b>
<b>I.2.4.3. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Jurinea humilis</i></b>	<b>23</b>
<b>Références bibliographique</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre II : Présentation des flavonoïdes et des isoflavonoïdes</b>	<b>31</b>
<b>II.1.1. Présentation des Flavonoïdes</b>	<b>33</b>
<b>II.1.1.1. Définition</b>	<b>33</b>
<b>II.1.1.2. Classification</b>	<b>34</b>
<b>II.1.1.3. La Biosynthèse des Flavonoïdes</b>	<b>35</b>
<b>II.1.1.4. Le Rôle des Flavonoïdes dans la Plante</b>	<b>37</b>
<b>II.1.1.5. L'activités Biologique des Flavonoïdes</b>	<b>37</b>
<b>II.1.2. La Présentation des isoflavonoïdes</b>	<b>39</b>
<b>II.1.2.1. Définition et Classification</b>	<b>39</b>
<b>II.1.2.2. Biosynthèse des isoflavonoïdes</b>	<b>40</b>
<b>II.1.2.3. Le Rôle des isoflavonoïdes dans la Plante</b>	<b>41</b>
<b>II.1.2.4. L'activité biologique des isoflavonoïdes</b>	<b>41</b>
<b>II.1.3. L'étude Chimique des flavonoïdes et isoflavonoïdes</b>	<b>43</b>
<b>II.1.3.1. Extraction</b>	<b>43</b>
<b>II.1.3.2. Séparation et purification des flavonoïdes et isoflavonoïdes</b>	<b>44</b>
<b>II.1.3.2.1. La chromatographie préparatrice sur couche mince (CCM)</b>	<b>44</b>

II.1.3.2.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique	45
II.1.3.2.3. La fluorescence sous lumière de Wood	45
II.1.3.2.4. La chromatographie préparatrices sur papier (CP)	46
II.1.3.2.5. La chromatographie sur colonne ouverte sous pression atmosphérique (CC)	46
II.1.4. Méthodes Physico-chimiques d'identifiant des flavonoïdes et isoflavonoïdes	47
II.1.4.1. Spectrophotométrie UV-Vis	47
II.1.4.2. L'hydrolyse acide des hétérosides	50
II.1.4.3. Spectroscopie RMN	50
II.1.4.3.1. RMN Mono dimensionnelle (RMN – 1D)	50
II.1.4.3.2. RMN Bi dimensionnelles (RMN – 2D)	51
II.1.4.4. Spectrométrie de Masse (SM)	51
<b>Référence Bibliographiques</b>	52
<b>CHAPITER III : Travaux réalisés, résultats et discussions</b>	57
III.1. Investigation Phytochimique Du <i>Genista microcephala</i> Coss & Dur.	58
III.1.1. Chimie extractive	58
III.1.1.1. Matériel végétal	58
III.1.1.2. Extraction	58
III.1.1.3. Extraction des acides gras	58
III.1.2. Purification	61
III.1.2.1. Traitement de l'extrait Acétate d'éthyle	61
III.1.2.2. Traitement de L'extrait Butanolique	62
III.1.3. Détermination structurale des produits obtenus.	64
III.1.3.1. Détermination structurale du composé 1	65
III.1.3.2. Détermination structurale du composé 2	71
III.1.3.3. Détermination structurale du composé 3	78
III.1.3.4. Détermination structurale du composé 4	88
III.1.3.5. Détermination structurale du composé 5	97
III.2. Investigation Phytochimique du <i>Jurinea humilis</i> DC.	107
III.2.1. Chimie extractive	107
III.2.1.1. Matériel végétal	107
III.2.1.2. Extraction	107
III.2.2. Purification	109
III.2.2.1. Traitement de l'extrait butanolique	109
III.2.3. Détermination structurale des produits obtenus	111
III.2.3.1. Détermination structurale du composé P1	111
III.2.3.2. Détermination structurale du composé P2	116
III.2.3.3. Détermination structurale du composé P3	123
<b>Références Bibliographiques</b>	132
<b>PARTIE-B : L'évaluation de l'activité Biologique de <i>Genista microcephala</i> coss &amp; dur.</b>	134
<b>CHAPITER I : Aperçu théorique</b>	135
I.1. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux	136
I.1.1. Dosage des phénols totaux	136
I.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux	138
I.2.1. Activité Antioxydant	140
I.2.1. Activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	140
I.2.2. Activité de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	140
I.2.3. Activité de la capacité antioxydante totale (CAT)	141
I.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	141
I.3.1. Les souches microbiennes	141
I.3.2. Milieux de culture	142

<b>I.3.3. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)</b>	<b>142</b>
<b>I.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (MBC / MFC)</b>	<b>142</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>143</b>
<b>CHAPTER II : Résultats et Discussions</b>	<b>144</b>
<b>II.1. Totale Phénolique et Flavonoïdes Totaux</b>	<b>145</b>
<b>II.2. Activité antioxydante</b>	<b>145</b>
<b>II.2.1. Activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRP)</b>	<b>145</b>
<b>II.2.2. Activité de la capacité antioxydant de réduire l'ion Cuprique (CUPRAC)</b>	<b>146</b>
<b>II.2.3. Activité de la capacité antioxydant totale (CAT)</b>	<b>147</b>
<b>II.3. Activité antimicrobienne</b>	<b>148</b>
<b>II.3.1. L'activité antimicrobienne des extraits</b>	<b>148</b>
<b>II.3.2. Activité antimicrobienne des acides gras</b>	<b>149</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>154</b>
<b>Conclusion Générale</b>	<b>156</b>



# ***INTRODUCTION GENERALE***

## INTRODUCTION GENERALE

Depuis des siècles, l'homme s'applique à observer et à appréhender son univers, à discriminer et ordonner les divers éléments constitutifs de son environnement, qu'ils soient référencés dans la sphère minérale, animale ou végétale. Presque toutes les cultures et les civilisations, de l'antiquité à nos jours ont dépendues entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité, la faible toxicité et d'acceptabilité [1]. Cette connaissance des propriétés et usages des plantes médicinales sont transmises de génération en génération. Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions, infusions et autres; mais, la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse.

En générale ce travail constitue une modeste, mais efficace contribution à la valorisation de la Flore de notre pays qui possède une biodiversité immense et pour laquelle chaque espèce peut être considérée comme un réservoir important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques potentielles, qui ne demandent qu'à être exploitées et valorisées par les recherches.

Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation de nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, que nous allons recenser et corréler à des structures chimiques types [2].

En région méditerranéenne, la diversité biologique est élevée et elle en va de même du nombre d'endémiques qui représente près de 50% de sa flore totale. Cette richesse étant menacée, des efforts sont indispensables pour mieux la préserver et la valoriser [3].

Le présent travail destiné à la valorisation de la Flore algérien, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques [4].

La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phytochimique et biologique.

C'est dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique des deux espèces endémiques d'Afrique du Nord, l'une entre eux et une Fabaceae (*Genista microcephala* Coss. & Dur.), l'autre c'est une Asteraceae (*Jurinea humilis* DC.).

La première partie de notre travail résume les connaissances botaniques et phytochimiques des deux familles la famille Fabaceae et Asteraceae, et en particulier celle du genre *Genista* et *Jurinea* ainsi que leurs utilisations thérapeutiques.

## INTRODUCTION GENERALE

La seconde partie est une synthèse bibliographique portant sur les métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes. Cette étude inclura la définition et la classification de ces derniers, leur biosynthèse ainsi que leurs activités biologiques.

La troisième partie regroupant l'ensemble des résultats de l'extraction des deux plantes, ainsi que les résultats d'identification structurale des composés isolés et leur interprétation.

Dans la dernière partie on a représenté l'évaluation biologique des différents extraits et l'extrait des acides gras de l'espèce *Genista microcephala* avec une discussion des résultats obtenus.

## INTRODUCTION GENERALE

### **Références bibliographiques**

- [1] Akharaiyi F.C. & Boboye B., *Antibacterial and Phytochemical Evaluation of Three Medicinal Plants*. J. Nat. Prod, **2010**, 3: 27-34.
- [2] Anyinam, C., Ecology and ethnomedicine: *exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices*. Social Science and Medicine. **1995**, 4: 321-329.
- [3] Vela E. & Benhouhou S., *Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord)*. C.R. Biologies. **2007**, 330: 589-605.
- [4] Giachi I.: Manunta A.: Morelli I.: Pistelli L, *Flavonoids and isoflavonoids from Genista morisii*. Biochem. Syst. Ecol. **2006**, 30: 801-803.

**PARTIE- A**  
***ETUDE PHYTOCHIMIQUE***

***CHAPITRE I***  
***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR***  
***LES DEUX PLANT***

## I.1. La Famille des Fabaceae (Leguminosae) :

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, après les Astéraseae et les Orchidaceae, au sens étymologique, Fabaceae dérive de « Faba » (Fève, en latin) qui vient du grec "Phago" signifiant "manger". Range plus de 730 genres et 19 400 espèces [1].

### I.1.1. Caractère botanique :

La famille de Fabaceae comprennent des plantes herbacées, des arbustes ainsi que des plantes aquatiques, xérophytes et grimpantes [2], on observe aussi que cette famille possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. L'appareil végétatif et reproducteur de la famille de Fabaceae décrite comme suite :

**Les feuilles** sont généralement alternes mais parfois opposées à verticillées, stipulées et pennées à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliées.

**Le carpelle** composé d'un seul ovaire surmonté d'un stylet et d'un stigmate.

**Les inflorescences** sont des grappes plus ou moins allongées.

**Les fleurs** des Fabaceae sont cyclisées, hermaphrodites et hypanthé, solitaires ou rassemblées sous forme paniculée, ou fascicule, ou racèmeux, ou en épis ou en têtes axillaires et terminales, ou opposées aux feuilles. La particularité de cette famille et la formation d'une fleur zygomorphe par la corolle résultant de la réduction du nombre des étamines.

**Le réceptacle floral** composé de gynophore généralement cupuliforme.

**Le calice** est formé de 5 sépales valvaires ou imbriqués ascendants, libres ou soudés.

**La corolle** est caractéristique, généralement constituée de 5 pétales disposés en forme de papillon, libres ou plus ou moins connés, elle est zygomorphe.

**L'androcée** comprend 9 à 10 étamines, il y a deux types de l'androcée : quand toutes les étamines sont soudées (genre *Genista*) on dit androcée monadelph, et quand 9 des étamines sont soudées on dit didelphe [3].

**L'ovaire** est supère, uni carpellée et uniloculaire, rarement biloculaire, à placentation pariétale. Le carpelle antérieur est souvent allongé contient entre 2 et de très nombreux ovules.

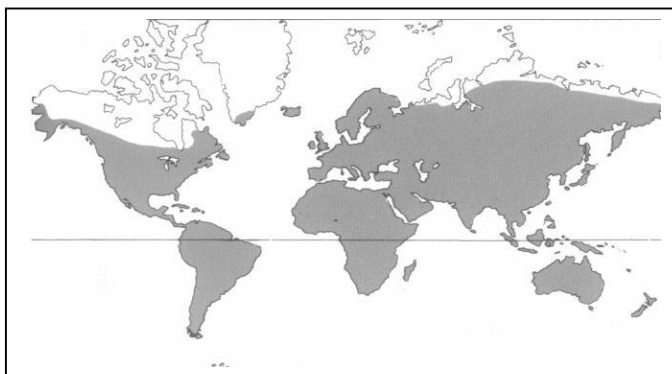
**Le fruit** est de type gousse présente plusieurs caractères : lomentacée, indéhiscente, charnue ou sèche, spiralée ou arquée, aplatie ou comprimée, drupe (à noyau) ou baie (à pépins et sans noyau). Sa taille et sa couleur sont variable [4]

**Les racines** sont généralement pivotantes. Elles comportent de nombreux nodules qui fixent L'azote par des bactéries (*Rhizobium*) [5,6].

### I.1.2. Répartition géographique des Fabaceae :

Le principal centre de diversité des Fabaceae est situé en Afrique et en Asie, D'autres centres de diversité sont localisés également en Amérique du centre et du sud [7]. En général, les Fabaceae sont distribuées dans tous les biomes terrestres (écosystèmes majeurs caractérisés par un climat, un type de sol, une flore et faune). Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille.

Les Fabaceae sont très cosmopolite et se retrouvent partout dans le monde. Dans les zones tropicales ils prédominent par les formes arborescentes (plantes ligneuses), et dans les zones subtropicales ou tempérées ils prédominent par les formes herbacées [5]. Néanmoins, ils sont répartis aussi bien en milieu tempéré que tropical [3] (Figure 1).



**Figure 1** : Carte de répartition de la famille de Fabaceae (Heywood, 1996) [8].

### I.1.3. Le Genre *Genista* :

Le genre *Genista* dont le nom paraît dériver de l'ancien mot Gaulois Gen, qui signifie arbuste, constitué d'arbustes épineux et non-épineux, il a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753 ; il appartient à la famille des Fabaceae, sous famille Papilionacées, la tribu des Genistées [9] , compte environs 150 espèces réparties en bassin méditerranéen en l'europe occidentale et centrale, il est également très répondu à l'ouest de la Russie, en Turquie, en Syrie et au Caucase [10]. Parmi les 23 espèces, existe en Algérie 11 espèces endémiques, localisées dans le sud-est et au grand Sahara [11].

*Genista* est un arbuste a un calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés ; les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents rarement profondes. Le calice campanulé à 5 dents subégales ; carène oblongue, droite ou presque bi gibbeuse latéralement étandard étroit, avec 10 étamines monadelphes en tube non fendu, 5 longues et 5 courtes stigmates obliques, gousse déhiscence, variable, arbrisseaux épineux ou parfois aphyllés et unciformes, feuilles avec 1-3 folioles stipulées ou non, graines non arillées [12].



**I.1.3.1. Quelques activités biologiques du genre *Genista* :**

Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Genista* qui renferme l'espèce végétale *Genista microcephala* que nous avons étudiée. Ce choix est justifié par le fait que ce genre est riche en composés phénoliques surtout les flavonoïdes et les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses. Le genre *Genista* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées : anti glycérimant, anti-inflammatoire, anti ulcère, spasmolytique, antioxydant et antiprolifératives (anti-tumorale, apoptotique, cytotoxique) [13].

Les extraits flavonoïques des deux plantes médicinales *Genista tinctoria*, et *Genista sessilifolia* ne sont pas toxiques à des doses inférieures ou égales 2g/kg, aucune action oestrogénique n'a pu être mise en évidence pour une dose de  $\leq 100$  mg/kg [14]. Le mélange flavonique de *Genista sessilifolia* à une forte activité anabolique et anti-inflammatoire alors que celui *Genista tinctoria* ne montre aucune action. L'extrait flavonoïque de l'espèce médicale *Genista tinctoria* provoque une augmentation de la thyroxine de 19 à 31% chez les rats sains pour une dose de 20 à 60 mg/Kg et garde un niveau normal chez les rats hypothyroïdiens [15].

L'extrait butanolique des parties aériennes de *G. tenera*, a montré une activité antihyperglycémique, antioxydante et antiacétylcholinestérase. Concernant l'activité Antihyperglycémique, les résultats ont révélés que l'extrait butanolique provoque une diminution de la concentration de glucose à 62.5% chez les rats traités par une dose de 200 mg/Kg, dès le 7ème jour de traitement [13].

**I.1.3.2. Caractère chimique du genre *Genista* :**

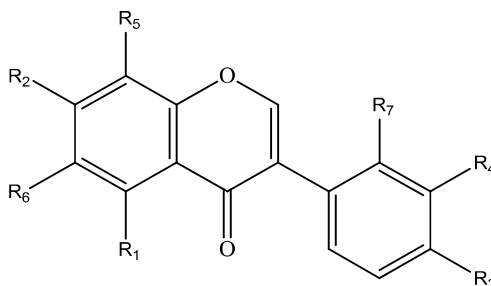
L'investigation phytochimique du genre *Genista* présente a décelé une richesse surtout par les flavonoïdes, les isoflavonoïdes [16] et les alcaloïdes [17]. Le paragraphe suivant présente un aperçu sur les isoflavonoïdes présents dans le genre *Genista*.

**I.1.3.2.1. Les isoflavonoïdes :**

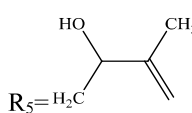
D'après la littérature les Fabaceae (Légumineuse) riches en flavonoïdes et isoflavonoïdes sur le plan quantitative et qualitative [16]. En considérant les isoflavones comme des biomarqueurs pour le genre, cette spécificité est probablement due à la présence de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone) [9]. Il est important de souligner que les isoflavonoïdes du type génistéine, daidzéine et isopruneatine s'y trouvent majoritairement dans ce genre [18].

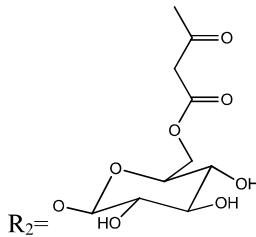
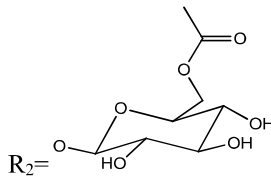
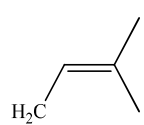
Voici quelques isoflavonoïdes isolés dans le genre *Genista* : Daidzéine (1), Formononétine (2), 8-Méthoxyformononétine (3), Génistéine (4), Isopruneatine (5), 3'-Hydroxyisopruneatine (6), Biochanine (7), 3'-O-Méthylorobol (8), Wightéone (9), Laburnétine (10), Daidzine (11), Ononin

(12), Génistine (13), 4'-O-Glucopyranoside génistéine (14), 7-O-(6''-Malonyl)-glucopyranoside génistéine (15), 7-O-(6''-Acétyl)-glucopyranoside génistéine (16), 7-O-Glucopyranoside 2'-hydroxygénistéine (17), Génistéone (18), 7-O-Glucopyranoside biochanine A(sissotrine (19), 7-O-β-Glucopyranoside isoprunétine (20), 7-O-Diglucopyranoside génistéine (21), 4',7-Di-O-glucopyranoside génistéine (22), 4',7-Di-O-glucopyranoside isoprunetine (23), 8-C-Glucopyranoside daidzéine (24), 8-C-Glucopyranoside génistéine (26), 4'-O-Méthyl-8-Cglucopyranoside génistéine (27), 8-C-Glucopyranoside 4'-O-glucopyranosyl-génistéine (28), 8-C-Glucopyranoside orobol (29), 5-O-Méthyl-8-C-glucopyranosylgénistéine (30), présentées dans le tableau 3, et tableau 1:



**Tableau 1 :** Structures des isoflavonoïdes isolées dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Isoflavonoïdes	Structures	Espèces	Structures	Espèces
Aglycones	1) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH	<i>G.acanthoclada</i> [19]	2) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>G.acanthoclada</i> [19]
	3) R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>G.halacsyi</i> [20]	4) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH	<i>G.halacsyi</i> [20]
	5) R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH	<i>G.aethnensis</i> [21]	6) R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH	<i>G. halacsyi</i> [20]
	7) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>G.halacsyi</i> [20]	8) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = O CH <sub>3</sub>	<i>G.tenera</i> [22]
	9) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH	<i>G.ephedroides</i> [23]	10) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH 	<i>G.ephedroides</i> [23]
	11) R <sub>2</sub> = OGlu, R <sub>3</sub> = OH	<i>G.aethnensis</i> [21]	12) R <sub>2</sub> = OGlu, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>G.aethnensis</i> [21]
	13) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlu, R <sub>3</sub> = OH	<i>G.aethnensis</i> [21]	14) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OGlu	<i>G.tricuspidata</i>

Hétérosides mono-O-glycosides	15) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, 	<i>G.aethnensis</i> [21]	16) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, 	<i>G.aethnensis</i> [21]
	17) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlu R <sub>3</sub> = OH, R <sub>7</sub> = OH	<i>G.aethnensis</i> [21]	18) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlu R <sub>3</sub> = OH, R <sub>6</sub> = 	<i>G.ephedroides</i> [23]
	19) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlu, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	<i>G.aethnensis</i> [21]	20) R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OGlu R <sub>3</sub> = OH	<i>G.cenerea</i> [25]
Hétérosides Di-O-glycosides	21) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = O(Glu) <sub>2</sub> R <sub>3</sub> = OH	<i>G.aethnensis</i> [21]	22) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlu R <sub>3</sub> = OGlu	<i>G.morsii</i> [26]
	23) R <sub>1</sub> = OGlu, R <sub>2</sub> = OGlu R <sub>3</sub> = OGlu	<i>G.aethnensis</i> [21]		
Hétérosides C-glycosides	24) R <sub>2</sub> = OGlu, R <sub>3</sub> = OH R <sub>5</sub> = Glu	<i>G.aethnensis</i> [21]	25) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>5</sub> = Glu	<i>G.cenerea</i> [25]
	26) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>6</sub> = Glu	<i>G.cenerea</i> [25]	27) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>6</sub> = Glu	<i>G.saharae</i> [27]
	28) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OGlu, R <sub>5</sub> = Glu	<i>G.halacsyi</i> [20]	29) R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>5</sub> = Glu	<i>G.cenerea</i> [25]
			30) R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>5</sub> = Glu	<i>G.saharae</i> [27]

**I.1.3.2.2. Les acides gras :**

Les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides, présents dans les graisses animales et les graisses végétales, les huiles végétales et les cires, sous forme d'esters. Ils sont des composés d'une chaîne hydrocarbonée qui donne à la molécule un caractère hydrophobe, comportant à une extrémité un groupement méthyle CH<sub>3</sub> et à l'autre extrémité un groupement carboxyle COOH. La grande majorité des acides gras des végétaux se répartit en deux groupes :

saturés et insaturés. Dans les deux groupes, les plus fréquents sont à 16 ou 18 atomes de carbone, ceux possédant moins de 12 atomes de carbone sont rares chez les végétaux [28]. Les esters d'acides gras peuvent être préparés à partir d'huiles végétales. Car les acides gras n'existent pratiquement pas à l'état libre dans les cellules et les tissus, mais combinés sous forme d'esters. Les méthodes d'extraction des acides gras sont nombreuses [29].

Les travaux dans cet axe de recherche restent toujours rares, cependant dans le genre *Genista* on peut dire qu'il n'y a aucune étude sur les acides gras dans le genre, sauf les acides gras identifiés dans les huiles essentielles par GCMS [30-34]. Le taux des acides gras dans toutes les huiles essentielles identifié dans le genre est considérable et varie entre 45.9% et 67.1%. Avec la remarque que les valeurs les plus élevées des pourcentages correspondent à l'acide palmitique, myristique et dodécanoïque triméthyl silyléster, respectivement, dans toutes les espèces étudiées.

#### **I.1.4. L'étude phyto chimique et biologique de l'espèce *Genista microcephala* :**

##### **I.1.4.1. Rappels botaniques :**

La plante *Genista microcephala* (Figure 2) est connue en Algérie sous le nom vernaculaire de Chedida ou bien Akssa [35].

C'est un arbrisseau éphéroïde, de 20 à 50 cm de hauteur, très rameux dès la base. Les rameaux verts sont pubescents-soyeux par des poils simples, peu feuillés.

**Les feuilles** sont toutes unifoliées, alternes, ou sub-opposées à la base des ramules jeunes ; elles sont sub-sessiles sur un coussinet peu saillant ; les folioles sont de 3-8 mm de long, obovales oblongues ou oblongue-linéaires, entières, atténuées à la base, densément poilues en dessous.

**Les stipules** sont très petites spinescentes aciculaires persistantes de 1 mm au plus.

**L'inflorescence** est en grappe capituliforme terminale, petite, 3-8-flores, de 1,5-1,8 cm de diamètre et hémisphérique. Les pédoncules florifères sont très courts (0,5-0,7 mm), poilus et pourvus à la base d'une bractée ovale et au sommet par de 2 bractéoles.

**Les fleurs** sont de 0,9-1,5 cm de long et d'un jaune d'or. Le calice est de 3-4 mm de long obconique-campanulé, bilabié, à lèvres subégales. Le calice, bractées et, bractéoles sont plus au moins villoses ou pubescents, à poils étalés ou dressés.

**L'étendard** est de 8 x 4,5 mm, égalant presque la carène. Un peu pubescent soyeux extérieurement au sommet, à limbe ovale, cordé à la base. Les ailes oblongues scutiformes, obtuses, plus au moins ciliées sur les marge antérieures à onglet grêle de 3 mm de long. La carène est de 9 x 2,5 mm, oblongue-scutiformes, droite ou presque droite, pubescente-soyeuse sur le dos.

**Les étamines** sont glabres et toutes concrescentes en gaine fendue en arrière ; les anthères jaunes, oblongues ou oblongues-linéaires, basifixes de 1 mm, et dorsi fixes de 0,5 mm.

**L'ovaire** est sessile, ovoïde-oblong et longuement villoses de 4-8 ovules.

**La gousse** est entourée par le calice et la corolle marcescents et dépassant peu le calice, sessile ou atténuée-substipitée, ovoïde, comprimée 7x3-3,5 mm, brune, villeuse, ordinairement monosperme. Graines lisses, luisantes, brunes, ovoïdes 2,5-3x2-2,5 mm

**Floraison:** Avril-Juin.

**Aire géographique:** Endémique Nord Afrique.

**Répartition géographique :** Les Hauts plateaux.



**Figure 2 :** Espèce *Genista microcephala* Coss & Dur. [36]

#### **I.1.4.2. Place dans la systématique:**

La place de l'espèce *Genista microcephala* dans la systématique, est présentée selon la classification APG III (2009) [37].

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** Spermatophytae

**Sous-embranchement :** Angiospermae

**Classe :** Equisetopsidae

**Sous-classe :** Magnoliidae

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae

**Sous-famille :** Faboideae

**Tribu :** Genisteae

**Sous-genre :** Spartocarpus

**Genre :** *Genista*

**Section:** Cephalospartum

**Espèce :** *Genista microcephala*

**I.1.4.3. Répartition géographique :**

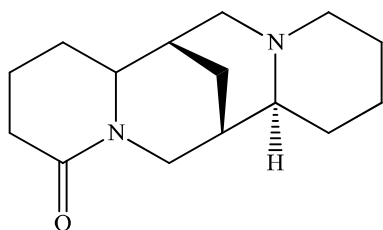
Cette espèce, endémique de l'Afrique du Nord, colonise les forêts claires, broussailles, rochers, pâturages rocailloux des collines et des basses montagnes, pâturage rocheux des collines et des basses montagnes dans les régions semi-arides et arides.

**I.1.4.4. Utilisation en médecine traditionnelle :**

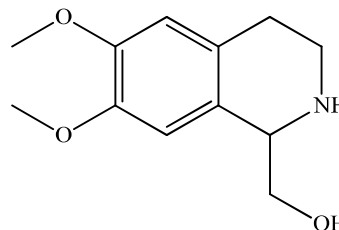
L'espèce *Genista microcephala* est utilisée en médecine traditionnelle dans les intoxications alimentaires, les infections microbiennes et comme vermifuge, des parties aériennes fleuries et non fleuries sous forme de décoction, par voie orale, aussi utilisées comme cicatrisant des blessures, et comme traitement des abcès par application locale de poudre de feuilles [38].

**I.1.4.5. Travaux antérieurs sur l'espèce *Genista microcephala*****I.1.4.5.1. L'étude phytochimique :**

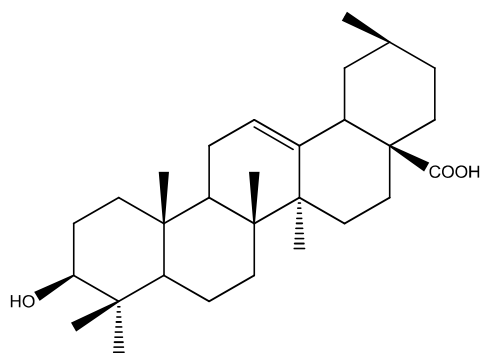
Une recherche bibliographique sur l'espèce *Genista microcephala* a montré qu'il n'existe en fait que très peu de travaux phytochimiques antérieurs concernant cette plante. Les produits isolés sont essentiellement deux alcaloïdes (2-oxosparteine et S-calycotomine) [39], un isoflavonoïde (alpinum isoflavone) et un triterpénoïde (acide oléanolique) [40] (figure 3), et quelques acides gras des huiles essentielles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse (CGMS). 26 Acides gras qui sont identifiés dans l'huile essentielle de *Genista microcephala*. On constate l'abondance des acides gras avec un taux de 67,1%, Les produits majoritaires sont l'acide n-héxadécanoïque (acide palmitique) avec 29,6% et l'acide dodécanoïque (acide laurique) avec 21,5%, l'acide tétradécanoïque (acide myristique) est moyennement abondant avec 8,7%, l'acide octadéca-9,12-diénoïque (acide linoléique) est représenté par 2,5% et l'acide octadécanoïque (acide stéarique) est très faiblement présent à 0,2%. Les terpènes sont qualitativement et quantitativement pauvres. L'alcool diterpénique (trans phytol) représente plus de la moitié des terpènes (6,3%). Les terpènes irréguliers représentent 4% avec l'abondance du géranyl acétone (2,1%). Les monoterpènes et les nérisoprénoïdes sont très faiblement abondants avec 0,6 et 0,8% respectivement, alors que les sesquiterpènes avec 3,2%, représentés par deux composés, l'oxyde de caryophyllène et l' $\alpha$ -cadinol, à 1,2% pour chaque composant [34].



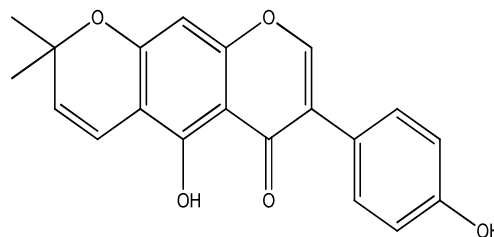
Lupanine (2-oxosparteine)



S-calycotomine



Acide oléanolique



Alpinum isoflavone

**Figure 3** : Les métabolismes secondaires isoler et identifier dans *G. microcephala*.**Tableau 2** : Composition d'huile essentielle de *Genista microcephala*.

Classe	Composés	%	KI	Total
<b>Acides gras Saturés et insaturés</b>	Acide décanoïque (acide caprylique)	0.8	1370	67.1
	Acide dodécanoïque (acide laurique)	21.1	1579	
	Acide tétradécaoïque (acide myristique)	8.7	1772	
	Acide 1,2-Benzène dicarboxylique, dibu	2.7	1952	
	Acide n-héxadécanoïque (acide palmitique)	29.6	1989	
	Octadécan-9,12-diénoate de méthyle	1.1	2131	
	Acide octadéca-9,12-diénoïque (acide linoléique)	2.5	2138	
	Acide octadécanoïque (acide stéarique)	0.2	2171	
<b>Alcane</b>	Unéincosane	1	2009	3.3
	n-pentacosane	0.9	2501	
	Héptacosane	1.4	2700	
<b>Aldéhyde</b>	Nonanal	1.9	1104	3.6
	Décadéanal <2E,4E>-	0.8	1320	
	Pentadécanal	0.9	1715	
<b>Diterpène</b>	Trans phytol	6.3	2110	6.3
<b>Terpènes irréguliers</b>	Géranyl acétone	2.1	1447	4
	Fanésyl acétone	1.9	1908	
<b>Monoterpène</b>	(E)-β-ionone	0.6	1480	0.6

<b>Nerisoprenoïde</b>	Théaspirane A	0.8	1301	0.8
<b>Sesquiterpènes</b>	oxyde de caryophyllène	1.2	1586	3.2
	$\gamma$ -muurolol (1-Naphthalénol, 1,2)	0.8	1657	
	$\alpha$ -cadinol	1.2	1660	
<b>Phénols</b>	4-vinyl-2-méthoxy-phénol	0.6	1313	0.6
<b>Autres</b>	2-penthyl furane	1.1	990	10.3
<b>Composés</b>	Benzène, triméthyl (1-méthyl éthyl)-	1.2	1429	
	6, 10,14-triméthyl-pentadécane-2-one	8	1841	
				98.4

#### I.1.4.5.2. L'activité biologique :

L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait alcaloïde a montré une forte sensibilité pour divers bactéries et champignons : *Rhizoctomia solani*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus remosus*, *Rhizopus Sp*, *E. coli* (1,95 mm), *Staphylococcus blanc* (1,45 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (1,60mm), *Enterobacter Sp.* (1,05 mm), *Proteus merabilis* (1,15 mm), *Serratia Sp* (1,05 mm), *Proteus vulgaris* (1,15 mm) [39].

L'huile essentielle de *Genista microcephala* montre une activité antibactériennes plus importante avec des zones d'inhibition de 12,6 mm et 10,4 mm pour les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* respectivement et de 7,1 mm pour *Staphylococcus aureus* pour une dilution de 1/2. Aux dilutions 1/4 et 1/8, les 3 bactéries restent sensibles montrant des zones d'inhibition comprise entre  $13 \text{ mm} \geq D > 6 \text{ mm}$  (sensibilité intermédiaire) [34].

Les activités antibactériennes des extraits aqueux et éthanoliques de *G.microcephala* ont été étudiées par la méthode de diffusion sur disque contre les souches bactériennes suivantes : Trois souches bactériennes à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*) et deux souches à Gram positif (*Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermis*) (tableau 3) [41].



**Tableau 3 :** L'activité antibactérienne des extraits aqueux et éthanoliques (50 mg / ml) de *Genista microcephala*.

<b>Bacteria Strains</b>	<b>Aqus. Extr. (mm)</b>	<b>Et.OH Extr. (mm)</b>	<b>Antibiotic <i>Gentamicin</i></b>
<i>E. coli</i>	0	0	11
<i>P.aeruginosa</i>	8	9	15
<i>Salmonella</i>	7	8	17
<i>S.saprophyticus</i>	9	10	18
<i>S. epidermidis</i>	7	11	12

## **I.2. La famille des Asteraceae :**

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Les Asteraceae (anciennement appelées Composées) sont une famille appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25 000 espèces décrites dont 750 endémiques. C'est la famille la plus nombreuse et l'une des plus diversifiées sur le plan biologique (des herbes minuscules aux grands arbres) avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes [42]. En Algérie elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [8].

### **I.2.1. Caractères botaniques :**

**Les feuilles** Alternes, opposées ou basilaires, simples ou composées ; généralement pourvues de stipules [43].

**Les fleurs** sont épigynes (au dessus de l'ovaire), hermaphrodites, plus rarement unisexuées, Chez les Asteroideae [44].

**La corolle** est gamopétale (une seule pièce), tubulée ou ligulée. Dans le premier cas, cinq lobes réduits sont visibles ; dans le deuxième, seuls trois lobes vestigiaux subsistent.

**Le calice** est gamosépale (une seule pièce) à limbe nul ou formant un Pappus au-dessus de l'ovaire. Le Pappus est composé d'écailles, de soies capillaires, lisses, sabres (Carduus) ou plumeuses, unisériées (Carlina) ou bisériées (Centaurea).

**Les étamines** sont épigynes, au nombre de cinq, parfois quatre, insérées sur le tube de la corolle et alternes à ses divisions. Elles sont absentes ou non fonctionnelles dans les fleurs pistillées ou stériles. Les filets sont ordinairement libres mais les anthères biloculaires, introrsées sont cognées par leur bord en un tube entourant le style.

**L'ovaire** infère est composé de deux carpelles. Il est uniloculaire et uniovulé. L'ovule est anatrope et uni téguminé. Le style est entier dans les fleurs staminées ; dans celles pistillées et staminées, il est bifide.

**Les fruits** est un akène indéhiscent, couronné, ou non, par le limbe du calice. La graine est dressée et son tégument est souvent soudé avec l'ovaire. Elle est ex albuminée. Souvent munie d'un Pappus plus ou moins dures.

**Les racines** pivotantes (dicotylédones) à ramifications peu nombreuses.

### **I.2.2. Répartition géographique des Asteraceae :**

Les Asteraceae connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de L'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la

forêt tropicale. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes [45].

### **I.2.3. Le Genre *Jurinea* :**

Le genre *Jurinea* est l'un des genres les plus importants au sein d'Asteraceae, comprenant environ 250 espèces. Naturellement distribué en Asie centrale, en Iran, en Turquie et dans la région méditerranéenne [46]. Le genre appartient à la tribu monophylétique Cardueae, qui contient les sous-tribus Carduinae, Centaureinae, Carlininae, Cardopatiinae et Echinopinae, *Jurinea* étant placé dans Carduinae [47]. *Jurinea* a 19 espèces en Méditerranée, en Algérie, il existe une seule espèce dont le nom *Jurinea humilis* DC [48].

Le caractère botanique de genre *jurinea* est défini comme suit : L'involucre, plus long que large, est formé de nombreuses bractées étroites, allongées, aiguës, sans appendice à leur sommet. Chaque anthère porte à la base deux étroits prolongements qui sont fendus chacun à son extrémité inférieure, Les fruits ressemblent un peu à un cône renversé ; ils sont à 4 angles bien marqués. Il est remarquable que l'ovaire porte une cupule interposée entre l'aigrette et la corolle, qui s'accroît beaucoup après la floraison, et se détache enfin du fruit avec l'aigrette qui lui est adhérente. Cette cupule pappifère constitue le caractère essentiel de ce genre [49].

#### **I.2.3.1. Quelque activité biologique du genre *Jurinea* :**

Le genre *Jurinea* (Compositae) a été examiné pour ses constituants chimiques et sa signification biologique, y compris ses utilisations traditionnelles. Le genre a été connu pour ses nombreuses activités biologiques comme antioxydant, antimicrobien, anti cholinestérase, peroxydation anti lipidique, activité antitoxique, anti leishmaniale [50].

L'activité antileishmanienne a été réalisée contre *Leishmania promastigote* KWH23 tropica des différents extraits du *Jurinea dolomiaea*, la meilleure activité est présentée par l'extrait acétate d'éthyle avec valeur de  $IC_{50}$  ( $5,3 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ).

Cependant, pour estimer la toxicité des extraits de *Jurinea dolomiaea*, l'extrait méthanoïque a montré une  $LC_{50}$  de ( $733,0 \pm 15,1\text{g} / \text{ml}$ ) avec les fractions dérivées.  $CL_{50}$  la plus basse a été montrée par l'acétate d'éthyle tandis que la plus élevée présentée par la fraction aqueuse. Les valeurs  $IC_{50}$  des anti-lipides par l'activité d'oxydation des extraits de *Jurinea dolomiaea* minimale a été observée par l'acétate d'éthyle et la plus élevée par l'hexane avec ( $54,3 \pm 1,6$ ) et ( $2075,0 \pm 10,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), respectivement. L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux et des extraits des solvants suivants : méthanol, éthanol, acétate d'éthyle et chloroforme, des feuilles de *Jurinea dolomiaea* a été déterminée par la méthode de diffusion du disque sur milieu gélosé nutritif, contre les bactéries cliniques (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et des bactéries phytopathogène (*Xanthomonas vesicatoria* et *Ralstonia solanacearum*).

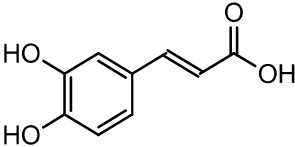
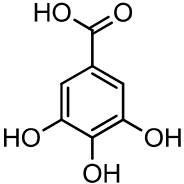
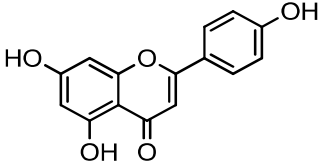
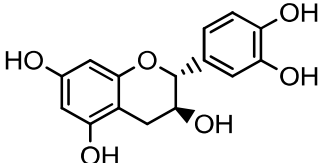
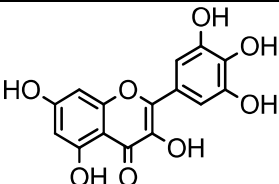
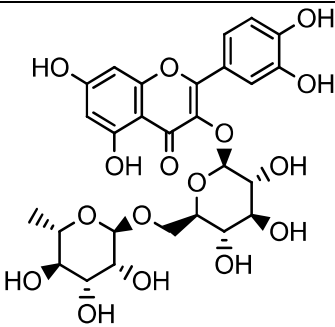
L'extrait méthanoïque du *Jurinea dolomiaea* a été fractionné en n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux, pour déterminer l'activité antioxydant par différentes méthodes (DPPH radical Piéger activité, activité piégeage peroxyde d'hydrogène, activité de piégeage des radicaux hydroxyles, ABTS activité de piégeage des radicaux cations, activité de peroxydation anti lipide, Activité de blanchiment de l'a-carotène, activité de *scavengue* des radicaux et activité de piégeage des radicaux d'oxyde nitrique). Tous les extraits ont montré une bonne activité antioxydants [50].

#### **1.2.3.2. Caractère chimique du genre *Jurinea* :**

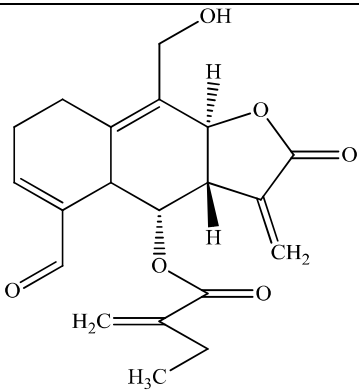
Les études phytochimique effectuées sur le genre *Jurinea* révèlent la présence des huiles essentielles, et surtout des lactones sesquiterpéniques et des triterpènes pentacycliques, Il est important de mentionner que très peu d'investigations phytochimique sur les flavonoïdes et ces dérivés ont été effectuées, par contre les études biologiques sur le genre sont très développées [50]. En plus il y a d'autre étude phytochimique montre la présence des polyphénols [51, 52], et des sesquiterpènes lactones [53] (Tableau 4).

Récemment une étude publiée par Shah en 2014, dans la recherche de l'analyse des racines médicinales de *Jurinea dolomiaea* a permis d'identifier deux acides phénoliques et quatre flavonoïdes par HPLC (tableau 4). L'analyse de l'extrait méthanoïque brut a illustré deux composés connus : l'acide caféique et l'apigénine avec une quantité maximale d'acide caféique (1,9 µg / mg échantillon sec) et (0.7 µg / mg échantillon sec) de l'apigénine, respectivement. Tandis que la phase butanolique a montré 5 composés de référence. La teneur maximale était montrée par la catéchine (178,3 µg / mg d'échantillon sec) suivi par la rutine (quercetin-3-O-rutinoside) (73,8 µg / mg d'échantillon sec), l'acide caféique (4.59 µg / mg d'échantillon sec), Myricetin (3.54 µg / mg d'échantillon sec) et l'acide gallique (0.77 µg / mg d'échantillon sec), respectivement [100].

Tableau 4 : Les différents métabolismes secondaires isolé du genre *Jurinea*.

Classe	Le nom	La structure	Référence
<b>Acide phénolique</b>	L'acide caféique		[51], [52]
	L'acide Gallique		[51]
<b>Flavonoïde</b>	Apigénine		[51]
	Catéchine		[51], [52]
	Myricétin		[51]
	Rutin		[51], [52]

Suite de tableau 4 :

<p><b>Sesquiterpène lactone</b></p>	<p>Alatolide</p>		<p>[53]</p>
-------------------------------------	------------------	--	-------------

#### I.2.4. L'espèce *Jurinea humilis* DC :

##### I.2.4.1. Description botanique de l'espèce *Jurinea humilis* DC.

Dans la flore de l'Algérie, le genre *Jurinea* est représenté par une seule espèce, *Jurinea humilis* DC (figure 4).

*Jurinea humilis* ; Plante vivace à souche courte, ligneuse, acaule ou à tige très courte, feuilles verdâtres en dessus, blanches-tomenteuses en dessous, roulés en dessous par les bords. Le capitule assez gros, solitaire au centre de la rosette des feuilles, l'involucre sub globuleux à folioles extérieures tomenteuses étroitement lancéolées, courbées en dehors au sommet ou appliquées, les intérieures glabres, scarieuses, acuminées. Les akènes fortement rugueux, papilleux au sommet, à aigrette blanchâtre 4-5 fois plus longue avec des fleurs purpurines [54].



Figure 4 : L'espèce *Jurinea humilis* DC. [55].

##### I. 2.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle

On ne connaît pas d'usage en médecine traditionnelle de *Jurinea humilis*.

**I.2.4.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *Jurinea humilis* :**

*Jurinea humilis* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique. Mais elle fait l'objet d'une seule étude biologique illustrée dans l'activité antioxydante et antimicrobienne. L'activité antioxydante déterminée par deux méthodes : phospho-molybdène et DPPH. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion du disque.

Les dosages des phénols et des flavonoïdes totaux des extraits de *J.humilis* variés significativement (p 0,05), avec une prédominance marquée de dosage phénolique totale dans tous les extraits. En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle présentait les plus haut taux des composés polyphénoliques. Les résultats indiquent que La concentration des composés phénoliques totaux était de (169,14 ± 7,22 mg GAE / g poids sec) pour l'extrait acétate d'éthyle, alors que la plus faible valeur de dosage phénolique totale était obtenu à partir de l'extrait de dichlorométhane (59.04 ± 9,26 mg GAE /g poids sec). De plus, la plus haute valeur de dosage flavonoïdes totaux était de (104,91 ± 0,22 mg RE / g poids sec) pour l'extrait acétate d'éthyle par rapport à les extraits dichlorométhane et méthanol (56,67 ± 0,14 et 49,54 ± 1,94 mg RE / g de poids sec), respectivement.

Tous les extraits marquent une importante capacité antioxydant totale variante entre 182,23 et 337,62 mgAAE / g. La plus grande efficacité antioxydant (337,62 ± 11,42 mg AAE / g) a été observée avec l'extrait acétate d'éthyle, suivi par les extrais dichlorométhane et méthanol (290,23 ± 9,16 et 182,62 ± 12,51 mg AAE / g) respectivement [56]. Tous les résultats sont regroupés dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Les dosages des phénols et flavonoides totaux et l'activité antioxydant de *Jurinea humilis* DC.

<b>Extrait</b>	<b>DPC</b>	<b>DFC</b>	<b>CAT</b>
	<b>(mg GAE/g)</b>	<b>(mg RE/g)</b>	<b>(mg AAE/g)</b>
Extrait dichlorométhane	59.04±9.26	56.67±0.14	290.23±9.16
Extrait méthanolique	124.4±4.24	49.54±1.94	182.23±12.51
Extrait acétate d'éthyle	169.14±7.22	104.91±0.22	337.62±11.42
BHT	-	-	-

**DPC :** Dosage des phénols totaux.

**DFC :** Dosage des flavonoïdes totaux.

**CAT :** La capacité antioxydant total.

Concernant l'activité antimicrobienne, les diamètres des zones d'inhibition pour les souches bactériennes étaient dans l'intervalle [7,48-22,55] mm. Sauf pour l'extrait méthanolique, l'effet antibactérien contre les micro-organismes pathogènes des poissons était mieux que les micro-organismes pathogènes humains.

Dans le tableau 6, les meilleures zones d'inhibition *in vitro* avec un nombre maximal des bactéries testées ont été obtenues avec l'extrait acétate d'éthyle (22,55 mm) contre *V. anguillarum* A4 suivi de 17,71 mm contre *Y. ruckeri*, et 16,17 mm contre *L. garvieae*. Globalement, l'extrait acétate d'éthyle et dichlorométhane ont démontrés la plus grande efficacité antibactérienne contre les microorganismes pathogènes des poissons et contre les bactéries à Gram négatif (-), comparées avec de la gentamicine (CN, 10 ug / disque) [56].



Tableau 6 : L'activité antimicrobienne de *Jurinea humilis* DC.

les Microorgan isms	CMB (mg/ml)			Le diameter des zones inhibitions (mm)			Le diameter des zones inhibitions des antibiotiques (mm)		
	MeO H-E	DCM -E	EtoA C-E	MeOH-E (2000 µg/disc)	DCM-E (2000 µg/disc)	EtoAC- E (2000 µg/disc)	Amp	CN	FCA
<i>L. garvieae</i>	60.00	15.00	15.00	8.77±0.76	14.39±1.06	16.17±0.81	30.17±2.39	11.77±1.48	-
<i>V.anguillar um A4</i>	60.00	30.00	1.88	9.46±1.25	15.79±0.25	22.55±0.99	29.72±1.51	10.76±0.66	-
<i>B.cereus RSKK 863</i>	7.50	7.50	7.50	10.46±0.57	11.43±0.40	11.70±0.61	37.23±0.21	13.89±0.68	-
<i>E. coli O157:H7</i>	30.00	15.00	3.75	8.48±0.26	11.09±0.52	11.39±0.71	26.54±0.89	12.27±1.25	-
<i>M. luteus NRRL B- 4375</i>	30.00	15.00	30.00	8.80±0.58	10.06±0.44	11.02±0.49	26.25±0.26	13.85±0.21	-
<i>Y. enterocolitica NCTC 11175</i>	15.00	15.00	7.50	8.36±0.15	11.09±0.92	11.82±0.39	25.25±0.29	22.13±0.07	-
<i>E. coli ATCC 11229</i>	30.00	15.00	7.50	9.25±0.47	9.55±0.30	9.82±0.36	24.72±0.15	12.32±0.61	-
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	15.00	1.88	1.88	11.17±0.59	13.23±0.39	15.23±0.27	24.93±1.34	14.65±0.19	-
<i>E.coli ATCC 35218</i>	30.00	15.00	3.75	9.19±0.68	9.40±0.63	11.00±0.32	24.03±0.42	13.73±0.49	-
<i>L. monocytogen es ATCC 7644</i>	60.00	30.00	30.00	7.48±0.31	10.82±0.41	10.48±0.59	26.75±0.66	14.77±0.05	-
<i>C. albicans ATCC 10231</i>	30.00	15.00	15.00	9.51±0.23	10.68±0.11	11.77±0.63	-	-	21.85 ±1.76
<i>C. glabrata RSKK 04019</i>	30.00	15.00	15.00	10.91±0.28	11.99±1.58	14.20±2.05	-	-	25.06 ±1.92

**CMB:** La concentration minimale bactéricidale.

**MeOH-E:** L'extrait méthanolique.

**DCM-E:** L'extrait dichlorométhane.

**EtOAC-E:** L'extrait acétate d'éthyle.

**Amp:** Ampiciline.

**CN:** Gentamicine.

**FCA:** Fluconazole.

**Références Bibliographiques**

- [1] Wojciechowski M.F.; Lavin M. & Sanderson M.J., *A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family*. American Journal of Botany. **2004**, 91: 1846-1862.
- [2] Harborne, J.B., *Phytochemistry of the Leguminosae*. In: Bisby, F.A., Buckingham, J. & Harborne, J.B. (eds.), *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae - Vol. I Plants And their Constituents*. **1994**, Chapman & Hall, Cambridge.
- [3] DeWIT H., *Les plantes du monde*. Edition Hachette. **1963**, Paris, 308-323.
- [4] Spichiger R.E.; Savolainen V.V.; Figeat M.; Jeanmoned D., *Botanique Systématique des plantes à fleur*. **2002**, Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH - Lausanne.
- [5] Dupont F. & Guignard J.L., *Abrégé de Botanique* 14<sup>ème</sup> édition. **2007**, Editions Masson, Paris; P285.
- [6] Lejoly J., *Biologie végétale. Systématique des plantes à fleurs, en relation avec les principales plantes médicinales*. Université libre de Bruxelles. **2004**, Volume II. 151p.
- [7] William, N.H.; Whitten, W.M., *Orchid floral fragrances and male euglossine bees: Methods and Advance in the last ses-qui-decade*. Biol. Bull. **1983**, 164: 355-95.
- [8] Heywood, V.H., *Flowering Plants of the World*. 3<sup>th</sup> edition, Oxford University Press, Oxford. **1996**. pp141-145, 149-152.
- [9] Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3<sup>ème</sup> édition, **1999**, Editeur Technique et Documentation. Paris.
- [10] Gibbs, P.E.; *A revision of the genus Genista L*. Notes Royal Botanic Garden, Edinburgh. **1996**, 27 (1) , 11-99.
- [11] Quezel, P.; Santa, S., *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*. **1962**, Tome I, 463 - 485, CNRS, Paris.
- [12] Quezel, P., Santa, S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. 1963. Tome II, C.N.R.S. Paris.
- [13] Rauter, A.P.; Martins, Al.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L.M.; Araujo, M.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F.; Goulart, M.; Thomas-Oates.; Rodrigues, J.A.; Edwards, E.; Noronha, J.; Helder Mota-Filipe, R.P, *Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant Genista tenera*. Journal of Ethnopharmacology. **2009**, 122: 384 - 393.

- [14] Harionov, I., *Pharmacologic effects on the reproductive system and anti-inflammatory action of the Total flavonoides mixtures contained in G.tintoria and G. Sessilifolia*. Farmatsiya (Sofia Bumgaria). **1988**, 38 (1), 47-51.
- [15] Korpachov, V.V.; Lifvinenko, O.O. & Paster, I. P., *Effect of Genista tinctoria extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism*. Ukraine, farmatsevtichnii zhurnal (Kiev). **1995**, 5: 82-86.
- [16] Harborne, J.B., *Chemosystematics of the Leguminosae flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genisteae*. Phytochemistry. **1969**, 8: 1449-1456.
- [17] Greinwald, R.; Van Rensen, I. ; Veit, M. ; Canto, P., & Witte, L., *A chemical dichotomy in quinolizidine alkaloid accumulation within the section Spartioides of the genus Genista (Fabaceae: Genisteae)*. Biochemical Systematics and Ecology, **1995a**, 23(1), 89-97. [18] Harborne, J.B.; Turner, B.L., *Plant Chemosystematics*. **1984**, Academic Press, London
- [19] Luczkiewicz, M. & Glod, D., *Callus cultures of Genista plants-in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity*. Plant Science. **2003**, 165: 1101-1108.
- [20] Fokialakis, N.; Aligiannis, N.; Alexi, X.; Alexis, M.N.; Pratsinis, H.; Kalpoutzakis, E. & Skaltsounis, A.L., *Isolation of bioactive compounds from Genista halacsyi (Leguminosae) and evaluation of their estrogenic activity*. **2012**, Planta Medica, Congress abstract: 78-PI361.
- [21] Pinto, B.; Bertoli, A.; Noccioli, C.; Garritano, S. & Pistelli, L., *Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants*. Phytotherapy Research. **2008**, 22 (3), 362-366.
- [22] Martins, A.; Almoester-Ferreira, M.A.; Borges, C.; Rauter, A.P.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F.; Gonzalez, A.G. & Bermejo, J., *Flavonoids from Genista tenera*. *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, Rauter et al. (Eds.). **2002**, 111-117.
- [23] Pistelli, L.; Bertoli, A.; Giachi, I. & Manunta, A., *Flavonoids from Genista ephedroides*. Journal of Natural Products. **1998**, 61, 1404-1406.
- [24] Boumaza, O.; Mekkiou, R.; Seghiri, R.; Sarri, D.; Benayache, S.; Garcia, V.P.; Bermejo J. & Benayache, F., *Flavonoids and isoflavonoids from Genista tricuspidata*. Chemistry of Natural Compounds. **2006**, 42 (6) , 730-731.
- [25] Van Rensen, I.; Veit, M.; Wray, V. & Czygan, F.C., *Genistein-C-glucosides from Genista cinerea*. Natural Product Letters. **1995**, 6 (3) , 203-207.
- [26] Giachi, I.; Manunta, A.; Morelli, I., Pistelli, L., *Flavonoids and isoflavonoids from Genista morisii*. Biochemical Systematics and Ecology. **2002**, 30: 801-803.
- [27] Abdel-Halim, O.B.; Abdel-Fattah, A.; Halaweis, F.T. & Halim, A.F., *Isoflavonoids and Alkaloids from Spartidium saharae*. Natural Product Sciences. **2000**, 6 : 189-192.

- [28] Karleskind A., *Manuel des corps gras*, tomes 1 & 2, Technique et Documentation. **1992**, Lavoisier, Paris.
- [29] Cocallemen, S.; Farines, M.; Faill, H.; Soulier, J. & Morin, O., "*Study of the seed oil of eggplant, Solanum melongena (L), Solanaceae*", *Revue Française des Corps Gras*. **1988**,35 (3), 105-10.
- [30] Rigano, D.; Cardile, V.; Formisano, C.; Maldinic, M.T; Piacente, S.; Bevilacqua, J.; Russo, A.; Senatore, F., *Genista sessilifolia, and Genista tinctoria L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth*. *ChemicoBiological Interactions*. **2009**, 18: 211 - 219.
- [31] Lograda, T.; Chaker, A.N.; Chalard, P.; Ramdani, M.; Chalchat, J.C.; Silini, H. & Figueredo, G., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Genista numidica Spach. and G.saharae Coss et Dur*. *Asian Journal of Plant Sciences*. **2009**, 8 (7), 495-499.
- [32] Lograda, T.; Chaker, A.N.; Chalchat, J.C.; Ramdani, M.; Silini, H.; Figueredo, G. & Chalard, P, *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Genista ulicina. and G. vepres*. *Natural Product Communications*, **2010**, 5 (5), 835-838.
- [33] Lograda, T.; Chaker, A.N.; Chalchat, J.C.; Ramdani, M. & Figueredo, G., *Composition of the essential oil of Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*. **2011**, 46 (6), 992-994.
- [34] Lograda, T.; Ramdani, M.; Figueredo, G.; Chalchat, J.C. & Chalard, P., *Essential oil composition and antimicrobial activity of Genista microcephala Coss. Et Dur*. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. **2012**, 2 (1), 75-79.
- [35] Maire, R. *Flore de l'afrique du nord, Encyclopedie biologique*. **1957**. Edition Paul Lechevalier.
- [36] Disponible à partir de Tela botanica : <http://www.biusante.pariscartes.fr/> [consulté le 08/09/2018].
- [37] *Angiosperm Phylogeny Group, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*, *Botanical Journal of the Linnean Society*. **2009**, 161 : 105 - 121.
- [38] El Rhaffari L.; Zaid A. & El Alami F., *Valorisation et protection de la flore utilisée en médecine traditionnelle dans le Tafilalet et cesenvirons*, *Minbar Al-Jaiâa*. **1999**, 1: 183-189.
- [39] Zellaghi, A.; Rhouati, S.; Creche, J.; Toth, G.; Ahmed, A.A.; Pare, P.W., *Anti-microbial activity of the alkaloid extract of Genistamicrocephala*. *RevistaLatino. Amer .Quim*. **2004**, 32: 109-114.

- [40] Bouakaz I.; Beggour L.; Dibi A.; Georges M. & Hamada H., *Isoflavone and triterpenoid isolated from an endemic plant Genistamicrocephala Coss et Dur.* JPharm & Pharmacogn Res **2015**, 3 (1), 1-5.
- [41] Edrah S.M.; Alafid F.; Imramovský A.; Altwair K.; Alkhumsi S.I. & Hrdina R., *Phytochemical Screening And Antibacterial Activity Of Genista Microcephala And Rosmarinus Officinalis Extracts From Libyan's Regions.* Int J. Res. Ayurveda Pharm. **2017**, 8 (4), 52-56.
- [42] Crete P., *Précis de botanique.* Masson, Paris, édition 2. **1965**, P 429.
- [43] Usher, G., *A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics.* **1966.** Constable & Co Ltd, London.
- [44] Bonnier, *Flore complète de France, Suisse et Belgique.* Edition 10, **1934**, P 118.
- [45] Gaussen, H.; Leroy, F., *Précis de botanique (Végétaux supérieurs)*, 2<sup>ème</sup> édition. **1982**, 424-426.
- [46] Quezel, F.; Santa, S., *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1-2. **1963**, Ed. CNRS, Paris France. p1170.
- [47] Picman, A.K., *Biological activities of sesquiterpene lactones.* Biochemical Systematics and Ecology. **1986**, 14 (3), 255-81.
- [48] Susanna, A.; Garcia-Jacas, N.; Hidalgo, O.; Vilatersana, R. & Garnatje, T., *The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from its, trnL-trnF, and matK nuclear and chloroplast DNA analysis.* Annals of the Missouri Botanical Garden. **2006**, 93: 150 – 171.
- [49] *Dictionnaire des sciences naturelles*, Volume 41, Eds 2 Par Frédéric Cuvier, page 321, Strasbourg, Paris, F. G. Levrault; Le Normant, **1816-30.**
- [50] Dogan, B.; Duran, A. & Hakki, E.E., *Phylogenetic analysis of Jurinea (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification.* — Annales Botanici Fennici. **2007**, 44: 353 - 358.
- [51] Shah, N.A.; Khan, M.R.; Naz, K.; Khan, M.A., *Antioxidant Potential, DNA Protection, and HPLC-DAD Analysis of Neglected Medicinal Jurinea dolomiaea Roots.* Biomed Research International, **2014**. Article ID 726241, 10 pages.
- [52] Rustaiyun, A. & Ganji M., *Germacranolides from Jurinea eriobasis*, Phytochemistry; **1988**, 27: 2991-2992.
- [53] Drozd, B.; Samek, Z.; Holub, M. & Herout, V., *Collec., Über die Struktur von Schkuhriolid. Lactones from two newly-described species of Vernonia: V. Jones II and V. pooleae.* Czech. Chem. Commun. **1973**, 27: 2991-2992.
- [54] Pratap, Singh; Rajendra, Singh; Nitin, Sati; Om Prakash, Sati; Naresh, Kumar,; *A Review of Genus: Jurinea.* Int. J. Life. Sci. Scienti. Res., VOLUME 2, ISSUE 1, **2016**, p: 23-30.

[55] <http://www.tela-botanica.org>.

[56] Ayad, R.; Cakmak, Y.S.; A. Ozusaglam, M.; Medjroubi, K.; Akkal, S., *In vitro antioxidant and antimicrobial activities of aerial parts of Algerian Jurinea humilis DC (Asteraceae)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. **2017**, 16 (12), 2903-2909.

**CHAPITER II**

**PRESENTATION DES**

**FLAVONOIDES ET DES**

**ISOFLAVONOIDES**



II.1.1. PRESENTATION DES FLAVONOIDES :

II.1.1.1. Définition :

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols : ce sont des molécules aromatiques poly substituées ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes. Plus de 9 000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées. La diversité structurale des flavonoïdes est maximale chez les Angiospermes. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophile), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) [1]. Ces composés sont réputés pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte [2]. La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3- diphenylpropane C6-C3-C6 (Figure 5), décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés cycle A et cycle B. Le chaînon propyle C3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C.

Grâce à des réactions enzymatiques dans les plantes les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Figure 8). Par ailleurs, au sein d'une même sous-classe, les possibilités de substitution des cycles A et B sont multiples : onze carbones du squelette flavonoïde peuvent porter un substituant de type hydroxyle, méthoxyle, méthyle, isoprényle ou benzyle. Chaque groupement hydroxyle, ainsi que certains carbones, peuvent être conjugués avec un sucre et le glycoside correspondant peut être acylé à partir d'un acide phénolique ou aliphatique [3, 4]. A cette multiplicité de structures, s'associent les différentes propriétés bio-physicochimiques des flavonoïdes.

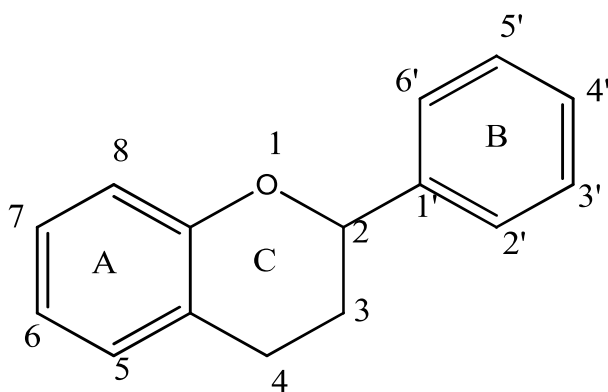


Figure 5 : Structures des flavonoïdes : enchaînement C6-C3-C6.

### II.1.1.2. Classification :

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut-être ouvert et recyclé en un motif furanique (dihydrofuranone). La Figure 5 illustre les principales classes de flavonoïdes.

De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6' (suivant la numérotation présentée pour les flavones). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C-ou O-glycosylés. Les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou aglycones [1]. En plus il y a les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les flavanones, les dihydroflavonols et les anthocyanidols (structures encadrées dans la Figure 6).

- **Les flavones :**

Caractérisés par une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> avec une liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> est insaturé et une fonction cétone.

- **Les flavanes :**

Ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé. Les flavanes sont réponsus dans les écorces des végétaux [5]. Ces composés sont connus sous forme de monomères ou polymères.

- **Les flavanones :**

Ce sont des flavones dont l'hétérocycle central C est saturé.

- **Les flavonols :**

Ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central.

- **Les anthocyanes :**

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C. Ce sont des composés responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violet et bleu observées dans la nature [6].

- **Les chalcones et les aurones :**

Les chalcones sont des composés phénoliques dépourvus de cycle pyranique central C.

Ainsi, ces composés présentent deux cycles aromatiques A et B reliés par une chaîne tri carbonée cétonique  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturé.

En ce qui concerne les aurones, il s'agit des isomères structuraux des flavones. Ces molécules dérivent des chalcones.

Les isoflavonoïdes faisant l'un de l'objet de ce travail, seront d'avantages détaillés.

• Les flavonoïdes :

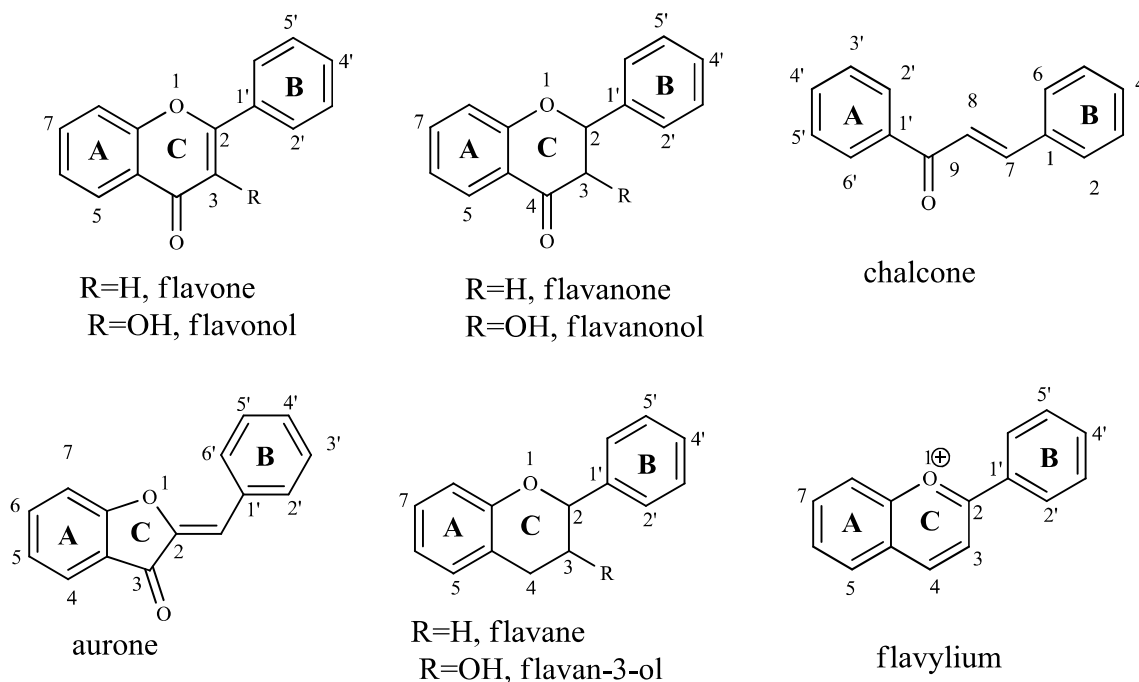
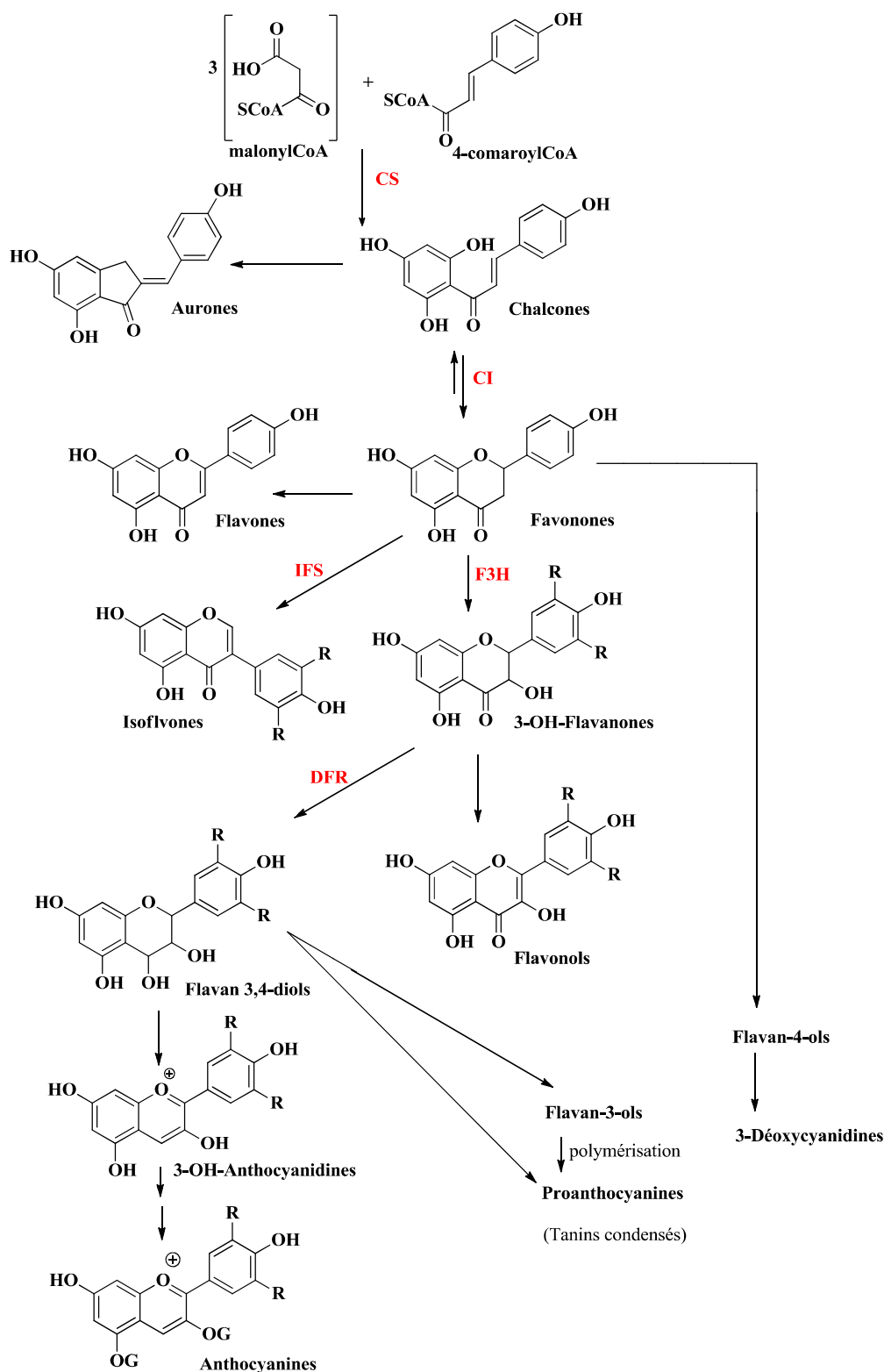


Figure 6: Structure des différentes sous-classes des flavonoïdes au sens strict.

II.1.1.3. La Biosynthèse des flavonoïdes :

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydro xycinnamique, en règle générale le 4 coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6'-tetrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthèse). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Ces derniers vont subir soit une oxydation par la flavone synthase (FS) et donnent les flavones, soit une réduction par la flavanone réductase (FNR) et donnent des flavanols. Tandis que l'hydroxylation des flavanones par la flavanone-3-hydroxylase (F3H) donne des dihydroflavonols qui peuvent s'oxyder en flavonols par la flavonol synthase (FLS), toutes les étapes de la biosynthèse et illustré dans la figure 7 [7].



**Figure 7:** Biosynthèse des flavonoïdes. CS : chalcone synthase ; CI : chalcone isomérase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; IFS : isoflavone synthase ; DFR : dihydroflavonolreductase ; FS : flavonol synthase ; AS : anthocyanin synthase. R=H, -OH ou -OCH<sub>3</sub> et OG= -O-sucrose [7].

### II.1.1.4. Le rôle des flavonoïdes dans la plante :

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des fleurs, des fruits, des feuilles et des graines d'un grand nombre de végétaux. Leur accumulation confère des avantages écologiques et physiologiques majeurs [8, 9, 10]. Cette accumulation peut être induite par divers agents biotiques ou abiotiques. Ils assurent en premier lieu une protection contre un éventail de stress abiotiques. En effet, les flavones, les flavonols, de même que les anthocyanes, sont synthétisés en réponse aux UV-B dans les cellules épidermiques des feuilles, mais également dans les cires épicuticulaires de ces cellules et les trichomes. Du fait de leur spectre d'absorption dans les UV, les flavonoïdes agissent ainsi comme des filtres, mais ils peuvent aussi agir en se liant directement à l'ADN pour le protéger [9, 10]. Certains flavonoïdes sont également synthétisés par les plantes soumises à une carence en minéraux et nutriments [11], ou à des températures froides [12].

D'autre part, les pigments absorbant dans la lumière visible, comme les anthocyanes, les flavonols et les aurones, sont en outre responsables de la coloration du pollen, des fleurs et des fruits [128], donc de l'attraction des insectes pollinisateurs et de la dispersion des graines [13]. Les flavonoïdes peuvent également conditionner la fertilité du pollen et moduler le transport des auxines [14].

### II.1.1.5. L'activités biologique des flavonoïdes :

En plus de leurs fonctions biologiques chez la plante, les flavonoïdes possèdent une pléthore de propriétés médicinales régulièrement actualisée.

- **Protection vasculaire**

Une étude menée aux Pays-Bas (l'étude Zutphen) a mis en évidence, le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres [15]. Ainsi, grâce à l'effet synergétique des flavonoïdes, de nombreuses plantes remarquables sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires : ginkgo, hamamélis, cyprès, noisetier, petit houx, marron d'Inde, sarrasin. Certains flavonoïdes de l'orange ont fait preuve d'activités vasodilatatrices, qui pourraient être mises à profit au cours de processus ischémiques. La puerarine, extraite du *Radix pueriae*, une herbe traditionnelle chinoise, est employée depuis des décennies en Orient, dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'angine de poitrine.

- **Protection des neurones**

Les flavonoïdes sont en effet connus pour être des agents protecteurs contre la dégénérescence des neurones. Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson. De nombreuses études suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, un flavonoïde possédant diverses

activités et notamment des effets anti-inflammatoires, sur la diminution du captage de la dopamine et la perte de neurones dans les cultures mésencéphaliques gliales [16].

- **Activité antimicrobienne**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés anti microbiennes, des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux : le cycle B jouerait un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN des micros organismes, ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* [17]. Certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2, 4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase [18].

- **L'activité antioxydant**

La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère anti oxydant en raison de leur faible potentiel redox, qui peut réduire les radicaux libres très oxydés comme les super oxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène. Ces pour ces raisons nous avons expliqué le stress oxydative des flavonoïdes ci-dessous.

- **Le Stress oxydative des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés anti oxydantes des flavonoïdes, qui seraient attribuées à:

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir chélateur des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR).
- leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne. Certains flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques de transition responsables de la formation de ERO et ainsi, inhiber la réaction de la lipo oxygénase.

Ils exercent leur capacité antioxydant au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydant leurs permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier. Les flavonoïdes jouent un rôle dans l'inhibition des lipo-oxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipo-oxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés. Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, la double liaison C2-C3 est indispensable à cette activité. Les composés dont la liaison C2-C3 est saturée et ils sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position méta d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase, enzyme clé du stress oxydatif [19].

### II.1.2. La Présentation des isoflavonoïdes :

#### II.1.2.1 : Définition et classification :

Les isoflavonoïdes se différencient des flavonoïdes par la position C3 sur l'hétérocycle pyranique central C du noyau aromatique B. Ce sont des composés à 15 atomes de carbones comme les flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2- diphenylpropane [20]. Les isoflavonoïdes sont connus essentiellement chez les fabales et surtout la famille des Fabaceae [21].

Ces composés sont classés en fonction du degré d'oxydation et de l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires. Ainsi, on trouve les iso flavones, les isoflavanones, les iso flavanols, les isoflavanes, les roténoïdes, les ptérocarpanes, les coumaranochromones et les 3-arylcoumarines [6] (Figure 8).

Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les iso flavones glycosylées quant à elles, existent mais sont plus rares (O-glycosylées et exceptionnellement C-glycosylées). Certains isoflavonoïdes possèdent un cycle supplémentaire résultant de la cyclisation du dérivé 2'-hydroxylé. Les ptérocarpanes et leurs dérivés ainsi que les coumaronochromones en font partie. D'autres ont une structure de type coumarinique induite par l'oxydation d'une isoflavène. C'est le cas par exemple des coumestanes et de leurs dérivés. Un dernier groupe d'isoflavonoïdes possède non seulement un cycle, mais en plus un carbone supplémentaire. C'est le cas des roténoïdes qui proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone. On note également la présence fréquente de dérivés prénylés. Le terme « prénylé » est utilisé au sens large

désignant ainsi le substituant prényle et ou isopentényle, les dérivés furano et diméthylpyrano ou encore le substituant géranyle (Figure 8).

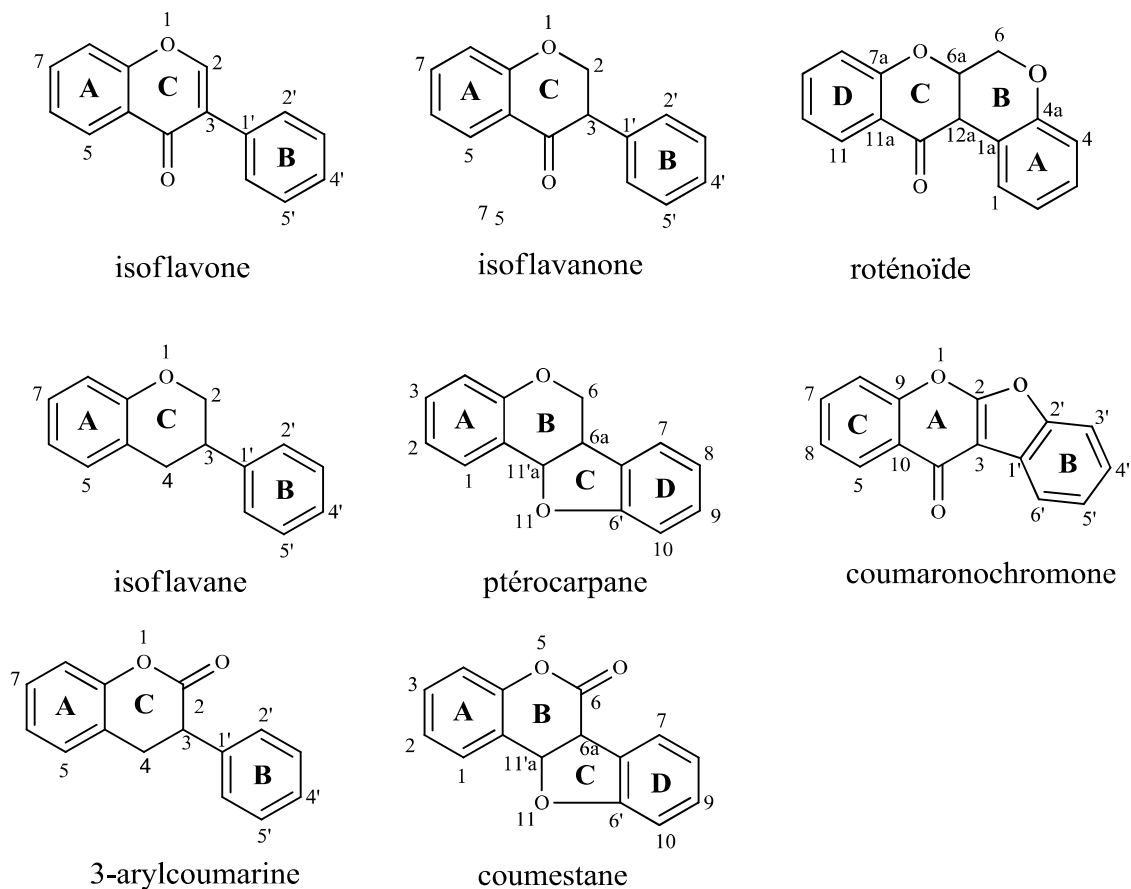


Figure 8 : Structure des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes.

### II.1.2.2. Biosynthèse des isoflavonoïdes :

Des progrès remarquables ont été fournis ces quelques dernières années dans le but d'élucider la biosynthèse des isoflavones [22, 23]. Le mécanisme proposé pour la biosynthèse des isoflavonoïdes forme une branche de la voie biosynthétique des flavonoïdes.

Les isoflavonoïdes proviennent de la flavanone intermédiaire centrale « naringénine (4', 5, 7-trihydroxyflavanone) dans le cas de la genistéine » et « liquiritigénine (4', 7dihydroxy-flavanone) dans le cas de la daidzéine » qui sont omniprésentes dans les plantes. Pour entrer dans la voie biosynthétique des isoflavonoïdes, la flavanone subit en premier lieu le départ d'un radical hydrogène à C-3 suivi de la migration du cycle B sous forme radicalaire de C-2 à C-3 et l'hydroxylation du radical C-2. L'enzyme responsable de cette transformation est l'iso Flavone synthase (IFS) Figure 9 [24,25].



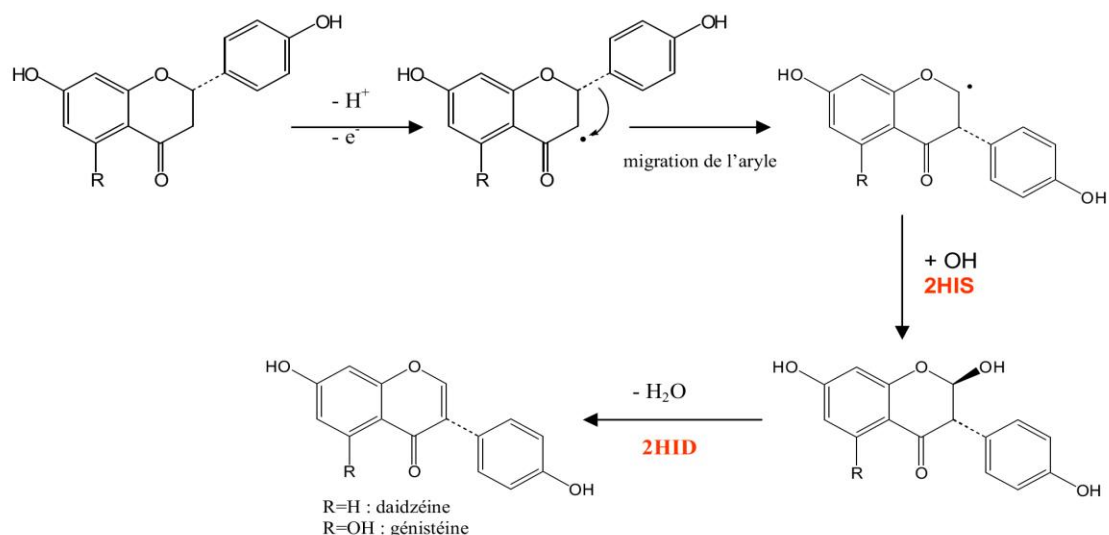


Figure 9 : Biosynthèse des isoflavonoïdes.

### II.1.2.3. Le Rôle des isoflavonoïdes dans la plante :

Les isoflavonoïdes, les flavanes et les flavanones sont essentiellement synthétisés comme des phytoalexines en réponse à des attaques microbiennes [26], et présentent également des propriétés antibactériennes, antivirales et pesticides [27, 28]. La concentration et la nature des flavonoïdes (notamment les proanthocyanidines) dans les feuilles déterminent leur nature amère et astringente, et influencent ainsi la nutrition des herbivores [9, 29]. Leur activité biologique peut être modifiée par leur décoration. Ainsi la galloylation de catéchines et oligomères de flavanols augmente les propriétés antibactériennes, antivirales et antioxydants de ces molécules [30, 31, 32]. Enfin, les tanins condensés (Pro anthocyanines) s'accumulent dans les téguments des semences, jouent un rôle crucial dans la dormance et la germination [33].

### II.1.2.4. L'activité biologique des isoflavonoïdes :

Les isoflavones du soya interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des œstrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée. Pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-œstrogènes.

- **Les actions membranaires**

Liu et collaborateurs ont montré que la génistéine activait la nitric oxyde synthétase endothéliale (eNOS), via une série de phosphorylations et une augmentation de l'AMPC, après une courte stimulation (à partir de 10 min) Ces effets ne sont pas inhibés par des antagonistes spécifiques des mécanismes génomiques des œstrogènes [34].

La daïdzéine, à faible concentration (100 pM), induit une réorganisation rapide (en 1 min) du cytosquelette d'actine des ostéoblastes, impliquée dans la migration cellulaire. Cette action est

due à la liaison de la daïdzéine à une protéine membranaire dont la structure est proche d'ER $\beta$  dans la mesure où certains anticorps anti ER $\beta$  peuvent inhiber les effets rapides de la daïdzéine. [35].

- **Activité anti-tyrosine kinase**

Les isoflavones peuvent exercer des effets sur plusieurs enzymes cellulaires et donc, interférer avec les voies de signalisation intracellulaire. Le plus connu est l'effet anti-tyrosine kinase de la génistéine. In vitro, la génistéine à 2,6  $\mu$ M inhibe l'action de la tyrosine kinase par inhibition compétitive [36]. De plus, 7,4  $\mu$ M de génistéine inhibent de 50 % l'action de l'ADN top isomérase et 110  $\mu$ M de génistéine inhibent 50 % de l'activité des protéines kinases C. La daïdzéine présente moins d'activité inhibitrice ; 10  $\mu$ M de daïdzéine inhibent tout de même 50 % de l'activité des MAP kinases [37]. D'autre part, les isoflavones inhibent également l'action des  $\alpha$ -réductases [38] et des aromatasés [39].

- **Activité transcriptionnelle**

Il a été aussi montré que les isoflavones induisent l'activité transcriptionnelle des ERs, à l'aide de systèmes des gènes rapporteurs [40]. Là encore, la transcription passe préférentiellement par l'ER $\beta$  pour la génistéine, la daïdzéine et l'équol (racémique ou l'énantiomère S) et elle est effective à partir de 10<sup>-8</sup> M pour ces trois composés.

- **Activité Ostrogénique et Anticancéreux**

La génistéine est reportée comme étant un phyto-œstrogène étudié comme molécule alternative aux composés synthétiques œstradiol et éthynyl-œstradiol qui jouent un rôle dans le développement normal des voies reproductives chez les humains et sont impliqués dans le cancer de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme [36].

Les phyto œstrogènes interfèrent avec l'activité ostrogénique soit par une interaction directe avec les récepteurs ostrogéniques, soit indirectement en régularisant la concentration des œstrogènes endogènes [41]. A cet effet, il a été reporté que les isoflavones génistéine et daïdzéine inhibent la formation et la prolifération des tumeurs cancérogènes du sein chez la femme [42].

D'autre part, la génistéine in vitro, est l'inhibiteur le plus efficace de l'activité excessive de la 5 $\alpha$ -réductase qui catalyse la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, un androgène puissant qui est considéré comme un facteur de risque du cancer de la prostate [43]. Comparée au 17- $\beta$ -œstradiol, la génistéine présente de grandes similitudes structurelles, particulièrement le poids moléculaire, le noyau phénolique A et les hydroxyles en positions C-7 et C-4' [44]. L'hydroxyle en position C-7 est nécessaire pour lier la génistéine au récepteur œstrogène (ER) en mimant le noyau A de l'œstrogène stéroïdique (17- $\beta$ -œstradiol).

- **Activité L'ostéoporose**

Des études, menées à Hong-Kong, ont également montré une association positive entre la consommation d'isoflavones et la DMO (Densité Minérale Osseuse) d'un ou de plusieurs sites du tissu osseux. L'étude de Mei et collaborateurs, par exemple, a classé les femmes selon leur consommation en isoflavones en trois catégories. Les 325 femmes recrutées consommaient en moyenne 25,8 mg d'isoflavones totales. Après ajustement des variables, le groupe des femmes qui consomment le plus d'isoflavones a une DMO lombaire plus forte que celles en consommant le moins ( $0,820 \pm 0,145$  vs  $0,771 \pm 0,131$  g.cm<sup>-2</sup>,  $p < 0,05$ ). De plus, cette étude a montré l'existence de cette corrélation seulement sur des patientes post-ménopausées et ces résultats n'ont pas été obtenus dans la population de femmes pré-ménopausées [45].

- **Activité Antibactérienne**

Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes après injection du sophora isoflavone par voie intra-péritonéale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium* [17]. De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram positive [46], pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité. Il a été démontré que les 5-hydroxy-flavanones et les 5 hydroxy-isoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.* L'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'.

- **Activité antioxydant :**

La génistéine a démontré son effet inhibiteur sur l'hémolyse globules rouges par l'acide dialurique ou par le peroxyde d'hydrogène, en raison de sa propriété antioxydant [47, 48]. La génistéine inhibait également Fe<sup>2+</sup>, complexe d'adénosine diphosphate (ADP) et induit par le NADPH peroxydation des lipides microsomaux [49], NADH oxydase et chaîne dans les mitochondries du foie de rat [50].

### II.1.3. L'étude chimique des flavonoïdes et isoflavonoïdes :

#### II.1.3.1. Extraction :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [51, 52]. La méthode souvent utilisée sera détaillée selon les étapes suivantes :

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydro alcoolique (méthanol ou éthanol).

- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Ce processus physique permet de purifier des molécules ou de fractionner des extraits en utilisant les différences de solubilités de certains solvants. L'opération s'effectue dans une ampoule à décanter sachant que le volume de celle-ci doit être égal à 2 ou 3 fois le volume à extraire. Le système choisi peut être bi phasique ou tri phasique. Le soluté, solubilisé dans un des liquides, se répartit en fonction de son affinité propre pour l'une ou pour l'autre des phases liquides non miscibles : c'est le phénomène du partage.
- Les extraits obtenus ont été concentrés à siccité, sous pression réduite, dans des évaporateurs rotatifs. Les extraits secs pesés sont ensuite conservés à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

### II.1.3.2. Séparation et purification des flavonoïdes :

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques.

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile.

#### II.1.3.2.1. La chromatographie préparatrice sur couche mince (CCM)

Très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification. La phase stationnaire, pré-appliquée en fine couche sur des plaques d'aluminium, est constituée de silice traitée par un agent chimique émettant une fluorescence à 254 nm, et une phase mobile en utilisant les divers systèmes de solvants appropriés.

#### • Révélateurs chimiques :

- **Réactif à la vanilline sulfurique** : Réactif dit « universel » ; donne une vision globale et non spécifique du contenu des dépôts [53].

Composition : - 1 g de vanilline,

- 2 ml d'acide sulfurique concentré,
- q.s.p. 100 ml d'éthanol à 95 %.

Après pulvérisation, le chromatogramme est chauffé dans une étuve à 105-110°C pendant 5 min. Une large gamme de colorations apparaît suivant le type de composé. Le bleu ou le violet est souvent caractéristique des composés terpéniques.

- **L'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)** : Après pulvérisation ou bien l'exposition des vapeurs (NH<sub>3</sub>), le chromatogramme est laissé sécher après on le met sous la lampe UV. Une coloration marron jaunâtre apparaît indique la présence des différentes classes de flavonoïdes.

**II.1.3.2.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique :**

Ce facteur symbolisé par  $R_f$  est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. Le facteur de retardement ( $R_f$ ) avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même  $R_f$ ). La valeur du  $R_f$  varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de la phase stationnaire, et structure de flavonoïde lui-même (aglycone, glycosylé, différence de disposition des substituant sur le squelette flavonique) [54, 55] le tableau 7 ci-dessous montre les relations entre flavonoides et  $R_f$ .

**$R_f$  = hauteur de la tache/hauteur du front du solvant**

**Tableau 7 :** l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du  $R_f$ .

Structure flavonique	$R_f$
<b>Augmentation des groupes Hydroxyles</b>	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvant organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux
<b>Méthylation des hydroxyles</b>	$R_f$ augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux
<b>Glycosylation</b>	$R_f$ diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

**II.1.3.2.3. La fluorescence sous lumière de Wood :**

Les chromatogrammes sont observés en lumière naturelle, sous lumière de Wood, aux longueurs d'onde de 254 et 365 nm (Tableau 8), avant et après pulvérisation de révélateurs chimiques appropriés plus ou moins spécifiques [54].

**Tableau 8 :** la relation entre La fluorescence sous lumière de Wood et la structure chimique flavonique.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7,8 trihydroxyflavonol Avec 3-OR Chalcones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.

Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune –verte	Aurones
Bleue –verte	Flavone sans 5-OH

**II.1.3.2.4. La chromatographie préparatrices sur papier (CP)**

Basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont :

- L'acide acétique **15 %** et autre constitue le système aqueux.
- Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) **4 /1/ 5** constitue le système organique [54].

L'étude chromatographique retenue permettra alors une approche de la composition flavonique de l'échantillon à analyser.

**II.1.3.2.5. Chromatographie sur colonne ouverte sous pression atmosphérique (CC)**

Les chromatographies sur colonne ouverte sont souvent employées lors des tous premiers stades de purification d'un extrait. Les colonnes utilisées sont en verre et munies de robinets en téflon à leur extrémité inférieure. Les proportions des colonnes (diamètre et hauteur) varient en fonction de la quantité d'échantillon à fractionner et de la résolution souhaitée. L'élution est réalisée par simple gravité à un débit d'environ 1 ml par minute. La quantité de la phase stationnaire est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. La hauteur de silice ou de Sephadex est au moins dix fois supérieure au diamètre intérieur de la colonne. L'échantillon est adsorbé au sommet de la colonne après dilution dans un minimum de solvant d'élution ou bien après « pastillage » avec de la silice. Dans le cas de la silice, la séparation repose sur un principe d'adsorption des échantillons sur le support. La silice est un support polaire et la séparation s'effectue en fonction de la polarité des molécules. La silice doit être préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110-120°C. Après refroidissement, la silice est mise en suspension dans le solvant d'élution puis versée dans la colonne et tassée par le passage de solvant dans la colonne [55].

Lorsque le support est le Sephadex, le travail s'opère sur un principe de chromatographie d'exclusion. Ce support est en réalité un système de billes poreuses (dont le diamètre des pores est défini) et qui forme un tamis séparant les molécules en fonction de leur taille [56].

II.1.4. Méthodes physico-chimiques d'identifiant des flavonoïdes et isoflavonoïdes

II.1.4.1. Spectrophotométrie UV-Visible:

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol). Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales (Tableau 9, Figure 10).

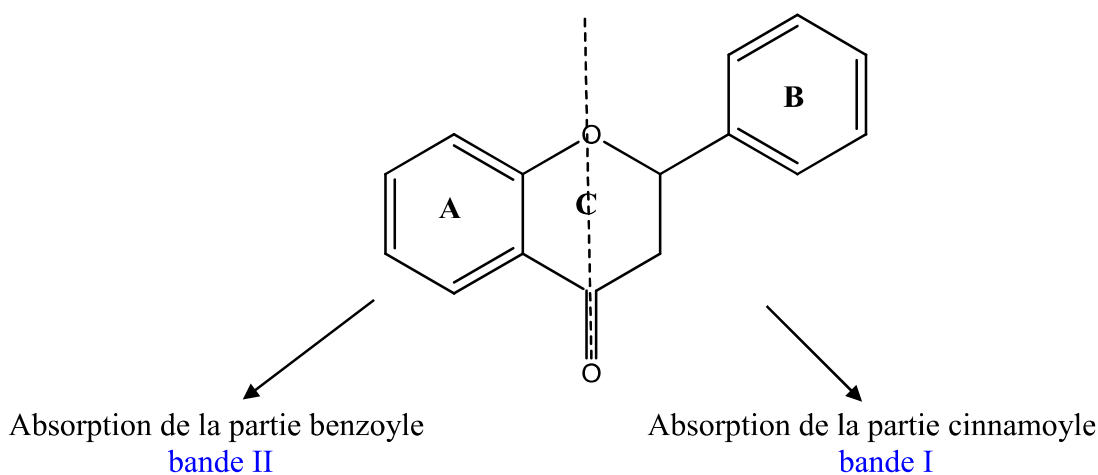


Figure 10 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

Tableau 9: Bandes d'absorption caractéristique.

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	310-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavonone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330 (épaulement)	245-275

Les réactifs de déplacement utilisés pour la confirmation partielle de la structure des flavonoïdes par spectrophotométrie UV sont : **NaOH**, **NaOAc**, **AlCl<sub>3</sub>**, **H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** et **HCl**. Ces Réactifs réagissent avec les groupements hydroxyles qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes I et II, permettant la localisation des hydroxyles libres, sur le squelette flavonique le détail de l'ajoute des réactifs et présenté ci-dessous (tableau 10).

- **NaOH** ou (**NaOMe**)

**NaOH** ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7. Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylés sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [54]

- **NaOAc (base faible)**

L'acétate de sodium, **NaOAc**, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7. Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [54].

- **NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système *orthodihydroxyle* sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) [54].

- **AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>/ HCl**

La présence du chlorure d'aluminium (**AlCl<sub>3</sub>**) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles *ortho* du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le **MeOH**. Les complexes formés entre **AlCl<sub>3</sub>** et les groupes *orthodihydroxyles* des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de **HCl** [57], par contre, ceux formés entre **AlCl<sub>3</sub>** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [58, 59]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de **AlCl<sub>3</sub>** et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le **MeOH**.



## CHAPITER II PRESENTATION DES FLAVONOIDES ET DES ISOFLAVONOIDES

**Tableau 10** : Les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs.

Réactifs	Déplacement nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavone
	330-360	250-280	Flavonol (3OR)
	350-385	250-280	Flavonol (3-OH)
NaOH	+44 à +65		OH en 4'
	1- Stabilité d'intensité /MeOH		
	2- diminution d'intensité		OR en 4' et OH en 3
	3- intensité diminue avec le temps (décomposition)		<i>Ortho</i> di OH sur A OU <i>ortho</i> di OH sur B
	Nouvelle bande / MeOH 320-335		OH en 7
NaOAc		+5 à +20	OH en 7
		Déplacement faible	OH en 7 avec substituant en C6 ou C8
		Pas de déplacement	OR en 7
NaOAc + H3BO3	+12 à +36		<i>Ortho</i> di OH sur B
	+05 à +10		<i>Ortho</i> di OH sur A (6,7) ou (7,8)
AlCl3	Une seule bande entre 420-430		<i>Ortho</i> di OH sur B avec 5-OH 5(flavone)
	Une seule bande entre 440-460		<i>Ortho</i> di-OH sur B avec 5-OH (flavonol)
M MeOH/ (AlCl3+HCl)	+17 à +20		5-OH avec une 6-OR
	+35 à +55		5-OH
	+50 à +60		3-OH avec ou non 5-OH

A AlCl <sub>3</sub> /(AlCl <sub>3</sub> +H Cl)	à -40 avec sommet Ou éqaulement entre (350- 360)		<i>Ortho</i> di-OH sur B
	- -20 à 25 nm		<i>Ortho</i> di OH sur A et <i>ortho</i> di OH sur B ou tri -OH sur B

#### II.1.4.2. L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne beaucoup plus les flavonoides O-glycosylés. Elle renseigne sur la position et la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché, d'une part, et la structure de l'aglycone d'autre part. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoides glycosides. La méthode d'hydrolyse acide est présentée comme de suite :

Le composé glycosylé chauffé à reflux en présence de 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 ml) dans de l'eau pendant 1 h. Après la solution a été diluée avec de l'eau et extraite par de l'acétate d'éthyle, ensuite la phase organique a été chromatographiée sur couche mince (CCM) en utilisant des standards authentiques. Chaque solution aqueuse a été ajustée à pH 7 avec du NaHCO<sub>3</sub> et filtrée. Le filtrat et les sucres concentrés ont été développés sur une chromatographie sur couche mince de gel de silice, en utilisant un mélange acétone: H<sub>2</sub>O (90:10, v / v).

#### II.1.4.3. Spectroscopie RMN:

La Résonance Magnétique Nucléaire est la technique la plus efficace et la plus précise des méthodes spectroscopiques couramment utilisées de nos jours par l'ensemble des chimistes. Cette dernière permet une détermination aisée des structures les plus complexes en combinant bien sur ses différents procédés. Les principaux noyaux étudiés sont le proton <sup>1</sup>H, le carbone <sup>13</sup>C [60].

##### II.1.4.3.1. RMN Mono dimensionnelle (RMN – 1D)

###### a) RMN proton (<sup>1</sup>H) et RMN carbone (<sup>13</sup>C)

Ces spectres sont des méthodes puissantes utilisées dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Ils fournissent de nombreuses informations. Le spectre RMN du proton fournit des informations telles que les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

Le spectre RMN du carbone permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone [54, 60, 61].

### b) Expérience DEPT 135°

Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH<sub>3</sub>), secondaires (CH<sub>2</sub>), tertiaires (CH). Les carbones quaternaires ne sont pas détectés avec le DEPT.

### II.1.4.3.2. RMN Bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [62].

#### a) Corrélations homonucléaires

- **COSY** (Corrélation Spectroscopie) (<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H) : cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires <sup>2</sup>J ou <sup>3</sup>J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

#### b) Corrélations hétéronucléaires

- **HMBC** (Hétéro nucléaire Multiple Bond Corrélation) (<sup>2</sup>J<sub>H-C</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-C</sub>): cette technique permet la détection des couplages longue distance <sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons voisins.
- **HSQC** (Hetero nuclear Single Quantum Coherence) (<sup>1</sup>J<sub>H-C</sub>): cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

### II.1.4.4. Spectrométrie de Masse (SM)

C'est une technique très répandue dans les domaines nécessitant une détermination structurale. La spectrométrie de masse permet de donner des informations telles que le poids moléculaire du composé ainsi que des informations sur la fragmentation de molécules. Les progrès de la spectrométrie de masse ont été extrêmement rapides durant la dernière décennie : production, séparation et détection d'ions, acquisition et réduction des données résultantes ont conduit au développement d'instruments entièrement nouveaux [63].

### Références bibliographiques

- [1] Harborne, J.B.; Baxter, H. & Moss, G.P., *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* **1999**, Second Edition, Taylor & Francis, Chapter 28.
- [2] Raskin, I.; Ribnicky, D.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D.; Ripoll, C.; Yaboki, N.; O'Neal, J.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B.; *Trends Biotechnol.* **2002**, 20: 522-531
- [3] Williams, C.A.; Grayer, R.J. *Anthocyanins and other flavonoids.* Nat. Prod. Rep. **2004**, 21: 539-573.
- [4] Heller, W.; Forkmann, G.; *The flavonoids. Advances in research since 1986*; Chapman & Hall: London, **1994**.
- [5] Jakupovic, J.; Paredes, L.; Bohlmann, F.; Watson L., *Prenyl flavanes from Marshallia species.* Phytochemistry. **1988**, 27 (10) , p 3273.
- [6] Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., *American Society of Plant Physiologists.* chapitre 24, **2000**, p 1250-1318.
- [7] Iwashina Tsukasa, *The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants.* J. Plant Res. **2000**, 113: 287-299.
- [8] Shirley, B.W., *Flavonoid biosynthesis: a new function for an old pathway.* Trends in plant science. **1996**, 1: 377-382.
- [9] Harborne, J.B.; Williams, C.A., *Advances in flavonoid research since 1992.* Phytochemistry. **2000**, 55: 481-504.
- [10] Dixon, R.A.; Xie, D.Y.; Sharma, S.B., *Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?.* New Phytologist. **2005**, 165: 9-28.
- [11] Atkinson, D., *Some General Effects of Phosphorus Deficiency on Growth and Development.* New Phytologist. **1973**, 72: 101-111.
- [12] Christie, P.J.; Alfenito, M.R.; Walbot, V., *Impact of Low-Temperature Stress on General Phenylpropanoid and Anthocyanin Pathways - Enhancement of Transcript Abundance and Anthocyanin Pigmentation in Maize Seedlings.* Planta. **1994**, 194: 541-549.
- [13] Faegri, K.; Van der Pijl, L., *The principles of pollination ecology.* 2<sup>nd</sup> rev. Ed. **1971**. Pergamon Press, New York, NY. p 291.
- [14] Downey, M.O.; Dokoozlian, N.K.; Krstic, M.P., *Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research.* American Journal of Enology and Viticulture. **2006**, 57: 257-268.

- [15] Burda, S.; Oleszek, W., *Antioxydant and antiradical activities of flavonoids*; J. Agric. Food Chem. **2001**, 49 (6), 2774-9.
- [16] Chen, H.Q.; Jin, Z.Y.; Wang, X.J.; Xu, X.M.; Deng, L.; Zhao, J.W., *Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation*. Neurosci. Lett. **2008**, 448 (2), 175-9.
- [17] Cushnie T.P.T., Lamb & A.J., *Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in Staphylococcus aureus by measuring potassium loss*. Journal of Ethnopharmacology. **2005b**, 101: 243 - 248.
- [18] Wu, T.; Zang, X.; He, M.; Pan, S. & Xu, X., *Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase*. Journal of food chemistry. **2013**, 61 (34), 8185-8190.
- [19] Haleng J.; Pincemail J.; Defraigne J.O.; Charlier C.; Chapelle J.P., *Le stress oxydant*. Rev. Méd. Liège. **2007**, 62 (10), 628-638.
- [20] Schwarz, H.; Liebhard, P.; Ehrendorfer, K.; Ruckenbauer, P., *Potential growth and biomass productivity of Miscanthus giganteus as affected by plant density and N-fertilization in central Greece*. Biomass Bioenerg. **2007**, 31: 145 - 152.
- [21] Pistelli, L.; Giachi, I.; Potenza, D. & Morelli, I, *A new isoflavone from Genista corsica*. Journal of Natural Products. **2000**, 63 (4) , 504-506.
- [22] Murkies A.L.; Wilcox G.; Davis S.R., *Phytoestrogens*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **1998**, 83, (2), 297-303.
- [23] Reynaud J., *La Flore du pharmacien*. Paris: Tec & Doc, **2002**. Cachan: Ed. Médicales Internationales.
- [24] Bruneton.J., *Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. 2<sup>ème</sup> édition. **2001**, éditeur technique et documentation, Paris.
- [25] K.A. Kidd.; D.B. Orr, *Comparative Feeding and Development of Pseudoplusia includens (Lepidoptera: Noctuidae) on Kudzu and Soybean Foliage*. Ann. Entomol. Soc. Am. **2001**, 94 (2), 219-225.
- [26] Hipskind, J.; Wood. K.; Nicholson, R.L., *Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to Bipolaris maydis race O*. Physiological and Molecular Plant Pathology. **1996**, 49: 247-256.
- [27] Stone, B.C., *Protective Coloration of Young Leaves in Certain Malaysian Palms*. Biotropica. **1979**, 11: 126-126.

- [28] Cesar Costa-Arbulu; Ernesto Gianoli; Wilfredo L. Gonzales & Hermann M. Niemeyer, *Feeding by the aphid siphia flava produces a reddish spot on leaves of sorghum halepense: an induced defense?*. Journal of Chemical Ecology. **2001**, 27 (2).
- [29] Aron, P.; Kennedy, J., *Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity*. Molecular Nutrition and Food Research. **2008**, 52 (1): 79 - 104.
- [30] Kajiya, K.; Kumazawa, S.; Nakayama, T., *Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. **2001**, 65: 2638-2643.
- [31] Kajiya, K.; Kumazawa, S.; Nakayama, T., *Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. **2002**, 66: 2330-2335.
- [32] Da Silva Porto, P.A.; Laranjinha J.A.; De Freitas V.A., *Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships*. Biochemical pharmacology. **2003**, 66: 947-954.
- [33] Debeaujon, I.; Peeters, A.J.M.; Leon-Kloosterziel, K.M.; Koornneef, M.; *The Transparent Test A12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium*. Plant Cell. **2001**, 13: 853-871.
- [34] Liu, D.; Homan, L.L. & Dillon, J.S., *Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism*. Endocrinology. **2004**, 145, 5532-5539.
- [35] Belcher, S. M. & Zsarnovszky, A., *Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms*. J Pharmacol Exp Ther. **2001**, 299, 408-414.
- [36] Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Watanabe, S.; Itoh, N., *et al.*, *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. The Journal of Biological Chemistry. **1987**, 262 (12) , 5592-5595.
- [37] Dubey, R.K.; Gillespie, D.G.; Imthurn, B.; Rosselli, M.; Jackson, E.K. & Keller, P.J., *Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells*. Hypertension. **1999**, 33, 177182.
- [38] Adlercreutz, H.; Bannwart, C.; Wahala, K.; Makela, T.; Brunow, G.; Hase, T.; Arosemena, P.J.; Kellis, J.T.; Jr. & Vickery, L.E., *Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens*. J Steroid Biochem Mol Biol. **1993**, 44, 147-153.
- [39] Evans, B.A.; Griffiths, K. & Morton, M.S., *Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids*. J Endocrinol. **1995**, 147, 295-302.

- [40] Muthyala, R.S.; Ju, Y.H.; Sheng, S.; Williams, L.D.; Doerge, D.R.; Katzenellenbogen, B.S.; Helferich, W.G. & Katzenellenbogen, J.A., *Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta*. *Bio-org Med Chem.* **2004**, *12*, 1559-1567.
- [41] Makela, S.; Hyder, S.M. & Stancel, G.M., *Environmental estrogens*, in: Oettel M., & Schillinger E. (Eds.) , *Estrogens and Antiestrogens II. Handbook Exp. Pharm.*, Vol. 135 (II) , Springer-Verlag, Berlin. **1999**, pp.613-663.
- [42] Matsumura, A.; Ghosh, A.; Pope, G.S. & Darbre, P.D., *Comparative study of estrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells*. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* **2005**, *94*, 431-443.
- [43] Evans, B.A.J.; Griffiths, K. & Morton, M.S., *Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids*. *Journal of Endocrinology.* **1995**, *147* (2) , 295-302.
- [44] Dixon, R.A. & Ferreira, D., *Molecule of interest, Genistein*. *Phytochemistry.* **2002**, *60*, 205-211.
- [45] Mei, J.; Yeung, S.S. & Kung, A.W., *High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women*. *J. Clin Endocrinol Metab.* **2002**, *86*, 52175221.
- [46] Jimenez-Gonzalez, L.; Alvarez-Corral, M.; Munoz-Dorado, M., & Rodriguez-Garcia, I., *Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties*. *Phytochemistry Reviews.* **2008**, *7*: 125-154.
- [47] Gyorgy P.; Murata K. & Ikehata H., *Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh)*, *Nature.* **1964**, *203*, 870 - 872.
- [48] Pratt D.E.; Di Pietro C.; Porter W.L.; Giffie J.W., *Phenolic antioxidants of soy protein hydrolyzates*, *J. Food Sci.* **1981**, *47*, 24 - 25.
- [49] Jha H.C.; Von Recklinghausen G.; Zilliken F., *Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids*, *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 1367 - 1369.
- [50] Lundh T.J.O.; Lundgren B.O., *Uncoupling and inhibition of the respiratory chain in rat liver mitochondria by some naturally occurring estrogens and their metabolites*, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 736 - 739.
- [51] Korpachov, V.V.; Lifvinenko, O.O. & Paster, I. P., *Effect of Genista tinctoria extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism*. *Ukraine, farmatsevtichnii zhurnal (Kiev).* **1995**, *5*, 82-86.

- [52] Ribereau-Gayou, J.B., *The phenolic compounds of vegetals*, Edition Dundo, **1968**, Paris.
- [53] Le Rosen, A.L.; Moravek, R.T.; Carlton, J.K., *Ana. Chem.* **1962**, 24: 1335 dans Stahl.
- [54] Mabry, T.J.; Markham, K.R. & Thomas, M.B., *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. **1970**, P 254.
- [55] Markham, K.R., *Technique of flavonoides identification*, **1982**. Academic press, London.
- [56] ROLETTTO, E. ; BARBERIS, R. & ZELANO. V., *Gel filtration and absorption spectroscopic investigations on humic substances from organic fertilizers*. Plant and Soil. **1982**, 66 (3), 383-390.
- [57] Markham, K.R. & Mabry, T.J., *Phytochemistry*. **1968**, 7, 1197.
- [58] Horhammer, L. & Hänsel, R., *Arch. Pharm.* **1952**, 285, 438.
- [59] Jurd, L. & Geissman, T.A., *J. Org. Chem.* **1956**, 21, 1395.
- [60] Markham, K.R. & Geiger, H., *The Flavonoids Advances in research since 1986*. Edited by J. B. Harborne. **1993**, Chapman & Hall. London.
- [61] Markham, K.R., *<sup>13</sup>C NMR of flavonoides-II, Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones*. Tetrahedron, **1976**, 32. 2607-2612.
- [62] Croasmun, W.R. & Carlson, R.M.K., *Two-dimentional NMR spectroscopy: Application for chemists and biochemists*. Wiley-VCH. **1994**.
- [63] De Hoffmann, E.; Charrette, J. & Stroobant V., *Spectrométrie de masse*. **1994**, Paris, Masson.



**CHAPTER III**

**TRAVAUX REALISES,**

**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### III.1. INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DU *GENISTA*

#### *MICROCEPHALA* COSS & DUR.

##### III.1.1. Chimie extractive

##### III.1.1.1. Matériel végétal :

*Genista microcephala* Coss et Dur. (1,7 kg) a été récoltée en pleine floraison (Mai-Juin) en 2011 et puis séchée à l'air libre à la lumière. La récolte de la plante effectuée aux environs de la ville de Khenchela, exactement à la montagne de Chillia (35 ° 19 '05 "nord, 6 ° 38' 13" est), c'est une montagne s'élevant à 2 328 mètres d'altitude du niveau de la mer. L'authentification faite par le Prof. Mohamed Kaabache (Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbass, Sétif, Algérie). Un spécimen de référence (RS / 71) a été déposé au laboratoire PHYSYNOR. Département de Chimie. Université de Mentouri-Constantine 1.

##### III.1.1.2. Extraction :

Les parties aériennes broyées (1.7 kg) ont été macérées à température ambiante par un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/Eau : 70 : 30 V/V), puis fractionnées par extraction liquide/liquide successives au dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol, selon la figure 11. Cette opération a été répétée trois fois pour chaque solvant. Cependant, la couleur verte très foncée de l'extrait (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) est un indicateur de la présence d'une quantité significative de la chlorophylle. Les mélanges hétérogènes ont été filtrés sur papier Wattman (N° 3) et les filtrats ont été évaporés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 45 °C. Les résidus ont ensuite été pesés.

- Extrait dichlorométhane : 1.5 g.
- Extrait acétate d'éthyle : 2.8 g.
- Extrait *n*-butanolique : 57g.

##### III.1.1.3. Extraction des acides gras :

Il faut mentionner que l'extraction des acides gras est faite pour évaluer l'activité antimicrobienne.

##### • Extraction des huiles essentielles

L'extraction se fait par l'éther diéthylique de différentes parties de la plante (fleurs (30g), feuilles et branches (30g) et le mélange des fleurs, feuilles et branches (30g)). Dans un Soxhlet la plante broyée est placée dans une cartouche qui sera exposée au solvant d'extraction à température (34 °C). Après environ 6 cycles d'extraction, la cartouche est retirée et le solvant chargé d'huile essentielle est récupéré, puis concentré par le rotavapeur sous vide [1, 2].

- **Préparation des esters méthylique des acides gras**

Nous avons déterminé la composition de l'huile en acides gras par la méthode de L'IUPAC [3]. Nous avons réalisé la saponification directement sur l'huile brute puis estérification des acides gras par le trifluorure de bore ( $\text{BF}_3$ ) dans le méthanol.

- **Saponification**

Dans un ballon on pèse 0.2 g d'huile, on ajoute 10 ml de solution de KOH (2%) préparé dans le méthanol, et porté à une ébullition à reflux pendant 15 à 20 min.

- **Estérification**

L'estérification est réalisée en ajoutant à l'extrait par le haut du réfrigérant 5ml d'une solution de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3$ ) (20%) préparée dans le méthanol. Le mélange est maintenu encore à reflux pendant 10 min. Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau distillée. Les esters méthyliques sont récupérés par extraction liquide- liquide en utilisant l'hexane. La phase organique est lavée plusieurs fois par de l'eau jusqu'à neutralisation. Après séchage de l'extrait par le sulfate de sodium anhydre, le solvant est évaporé sous pression réduite [3].

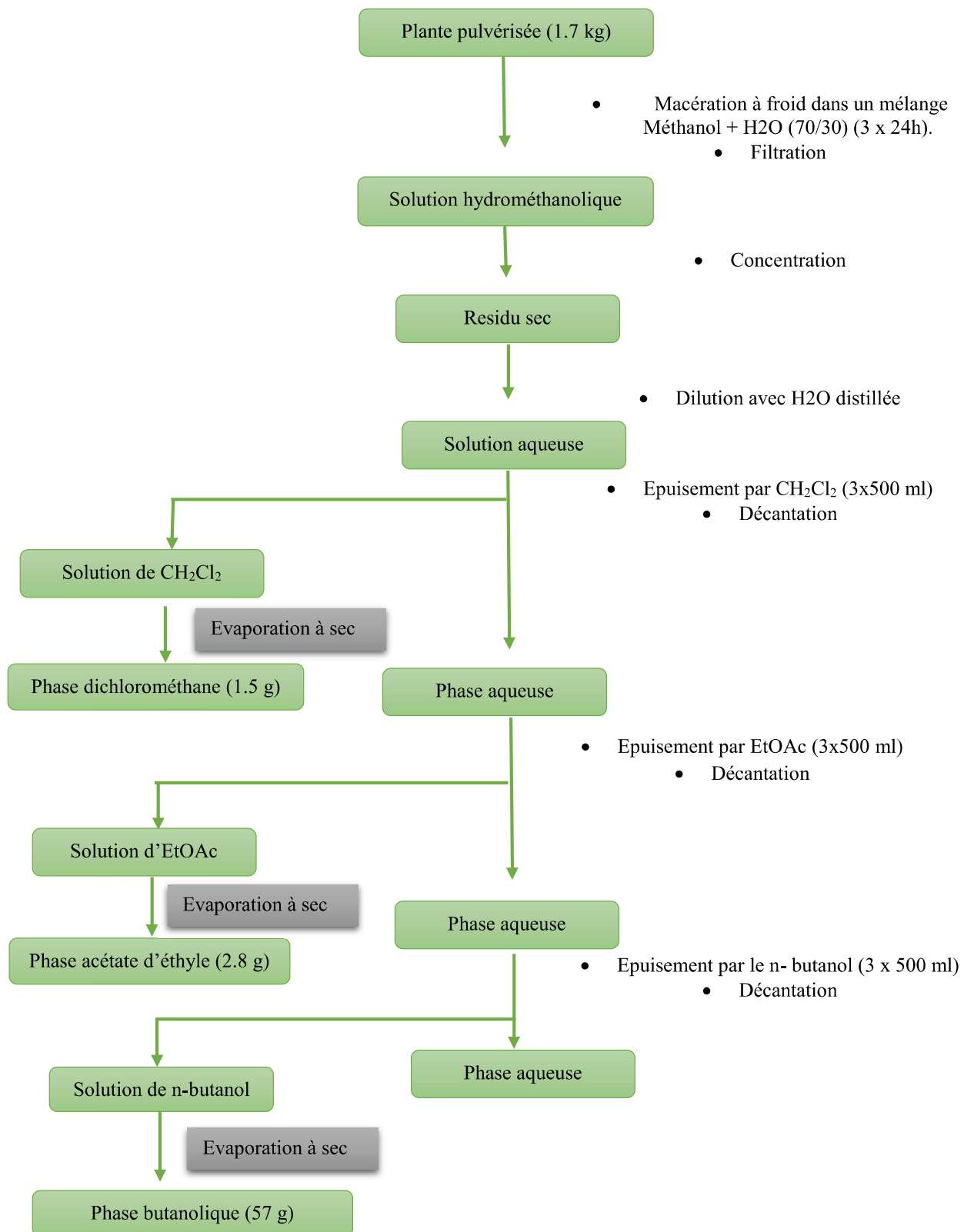


Figure 11 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Genista microcephala*.

### III.1.2. Purification

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice et cellulose déposée sur une feuille d'Aluminium pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats. Les résultats de nos travaux analytiques nous ont poussés à sélectionner l'extrait acétate d'éthyle (2.8 g) et butanolique (57 g) en raison de leurs richesses en flavonoïdes, leurs masses importantes et l'absence de chlorophylle.

Les phases mobiles utilisées pour l'analyse d'extrait acétate d'éthyle (EtOAc) sont les suivantes:

- Cyclohexane/EtOAc : 20/80 (V/V/V).
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/MeOH: 20/30/2.5 (V/V/V).
- AcOH 15%
- AcOH 30%

#### III.1.2.1. Traitement de l'extrait acétate d'éthyle :

L'extrait acétate d'éthyle est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures.

Un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *G. micropcephala* a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice.

L'extrait acétate d'éthyle (2.8 g) est dissout dans le méthanol et mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 210 g de gel de silice (0,063- 0,200 m, Merck) préparée dans le méthanol, l'élution est réalisée avec un gradient dichlorométhane - acétate d'éthyle - méthanol, commençant par dichlorométhane pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle puis de méthanol. Des fractions de 25 ml ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince. Les plaques ont été examinées à lumière UV (254 et 365 nm) et révélées à l'aide des vapeurs de l'ammoniaque. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.

**Tableau 11.** La séparation par chromatographie de colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *G. microcephala*.

Lots de fractions	Système d'élution (%)		
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	EtOAc	MeOH
<b>1-4</b>	100	0	0
<b>5-32</b>	95	5	0
<b>33-43</b>	90	10	0
<b>44-52</b>	85	15	0
<b>53-98</b>	40	60	0
<b>101-118</b>	30	70	0
<b>119-137</b>	20	80	0
<b>138-145</b>	0	100	0
<b>146-170</b>	0	75	25
<b>171-222</b>	0	50	50
<b>223-252</b>	0	25	75
<b>253-230</b>	0	10	90
<b>231-240</b>	0	0	100

Les fractions (44-52) éluee par le système (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc : 85/15 (V/V)) après séchage lent à l'air libre, des cristaux sous forme d'aiguilles orange sont formés (**produit 1**).

Les fractions (70-98), (119-137) et (223-252) éluee par les systèmes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc : 40/60 (V/V) - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc : 20/80 (V/V) - EtOAc/ MeOH: 25/75 (V/V)), respectivement, donnent des précipités de couleur blanc. Après la récupération des précipités, ont les lavé par le méthanol. Nous avons obtenus trois poudres blanches pur (**produits 2, 3 et 4**).

Les produits obtenus testé sur une plaque CCM et révélée par les vapeurs d'ammoniac, absorbe sous UV 356 nm d'une couleur orange des produits **1,2** et **3** caractéristique d'un isoflavonoïde, et de couleur bleu violette du produit **4**. Les caractéristiques des produits purs sont données dans le tableau 13.

#### III.1.2.2. Traitement de l'extrait *n*-butanolique :

L'extrait *n*-butanolique a été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM), sur papier Wattman (N<sup>o</sup> 3) afin d'avoir une idée sur la nature et le nombre des produits à séparer. Un premier fractionnement de l'extrait butanolique (21 g) a été réalisé par chromatographie liquide sur polyamide (600 g) comme phase stationnaire, dans le but de fractionné l'extrait à des sous

fractions pour faciliter leur séparation à cause du nombre élevé des produits contenus dans l'extrait brute, dont majoritairement sont des flavonoides, nous avons utilisées le mélange toluène/MeOH. L'éluion est réalisée avec un gradient de 10% (méthanol), commençant par toluène pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive de méthanol. Pour donner 19 fractions, chaque sous fraction contient 8 lots. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions, ont été effectués sur la base d'analyses des fractions présentant des profils identiques sont réunies ensemble. Les résultats de la progression de cette colonne est illustré dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** La progression de la colonne polyamide de l'extrait *n*-butanolique.

N° DE LA FRACTION	LOT DE FRACTIONS	SYSTEME D'ELUTION		Poids de la fraction (g)
		Toluène (%)	Méthanol (%)	
E1	1-8	100	0	0.020
E2	1-8	90	10	1.048
E3	1-2	80	20	2.142
E4	3-4	80	20	1.205
E5	5-6	80	20	2.252
E6	7-8	80	20	1.902
	1-2	70	30	
E7	3-4	70	30	1.982
E8	5-6	70	30	1.202
E9	7-8	70	30	1.253
	1-4	60	40	
E10	5-6	60	40	1.775
E11	7-8	60	40	1.340
E12	1-5	50	50	1.707
E13	6-8	50	50	1.274
E14	1-2	40	60	0.017
E15	3-8	40	60	0.207
E16	1-8	20	80	0.024
E17	1-8	30	70	0.120
E18	1-8	10	90	0.020
E19	1-8	0	100	0.159

Les sous fractions sont été ensuite testés sur papier Wattman (N° 3), dans l'éluant acide acétique à des pourcentages variés entre 15%- 30%, pour permettre une première orientation des classes des composés présents. Les informations recueillies ont permis de mettre en évidence la présence probable des différentes classes de flavonoïdes (flavonone, flavonol, chalcone ....ect), la fluorescence orange sous lumière de Wood confirme le squelette de type isoflavone, et la coloration bleue violette à fluorescence 365 nm semblent contenir des flavonoïdes glycosides.

Plusieurs procédés de purification ont été employés concernant essentiellement des techniques chromatographiques sur colonne, sur des plaques préparatives de gel de silice en utilisant le système d'éluion isocratique CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O avec des pourcentages proportionnelles différents pour chaque sous fraction. Les fractions purifiées contiennent soit un mélange des produits avec des petites quantités, soit un mélange des produits ayant des polarités très proche, dans les deux cas ne permettant pas leur séparation.

Nous avons opté pour la sous fraction **E6** une première séparation sur couche mince de gel de silice en utilisant le système éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O : 8/1/1 : (V/V/V), a menée à la purification du produit pur (5,5 mg) donne une coloration bleu violette sous UV à 365 nm soit le produits **5** (Tableau 13).

**Tableau 13** : Les caractéristiques des produits purs obtenus du *Genista microcephala*.

Produit	Masse (mg)	Forme	Observation sous UV (365 nm)
1	4	Cristaux orange	Orange
2	6	Poudre blanc	Orange
3	30	Poudre blanc	Orange
4	12	Poudre blanc	Bleue violette
5	5.5	Poudre blanc	Bleue violette

### III.1.3. Détermination structurale des produits obtenus :

L'étude chromatographique des phases acétate d'éthyle et butanolique des parties aériennes de *G. microcephala* (Coss & Dur) a mené à l'isolement et à la purification de cinq produits.

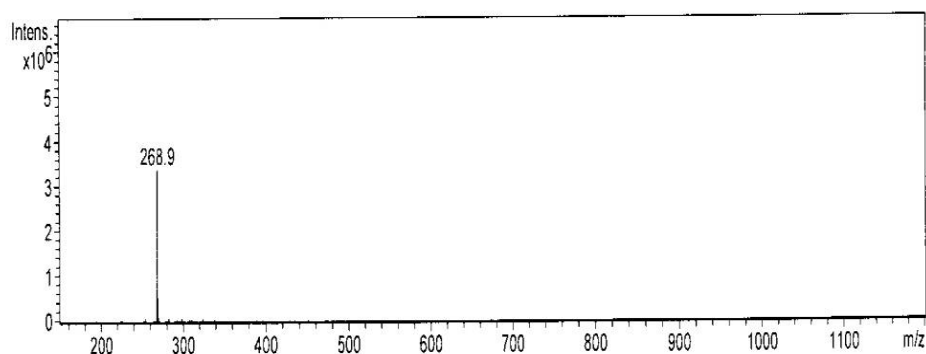
Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des différentes méthodes, UV, RX, RMN (250 MHz) (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, HMQC et HMBC), aussi par spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI, et par comparaison avec les données de la littérature.



### III.1.3.1. Détermination structurale du composé 1 :

La spectrométrie de masse est une technique très sensible qui permet de connaître la masse moléculaire exacte des composés flavoniques. C'est une technique de choix pour l'analyse structurale. Elle utilise de très faible quantité de produit (< 1mg) et apporte des renseignements structuraux très précis.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS réalisé en électrospray (ESI) en mode négatif (Figure 12) de composé 1, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire  $m/z = 268.9$   $[M - H^+]$ , correspondant à une formule brute  $C_{15}H_{10}O_5$  [4].



**Figure 12 :** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1.

Les données de la série spectrale UV (Figure 13, Tableau 14) montrent :

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 323 nm et la bande II à 261 nm ainsi que la fluorescence orange sous lumière de Wood indique le squelette de type isoflavone.
- Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = +35$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande II en comparant les spectres NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système *ortho*-OH sur le noyau A.

- Le déplacement bathochrome de la bande II enregistré après addition d'AlCl<sub>3</sub>+HCl comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5 ( $\Delta\lambda = + 12$  nm).

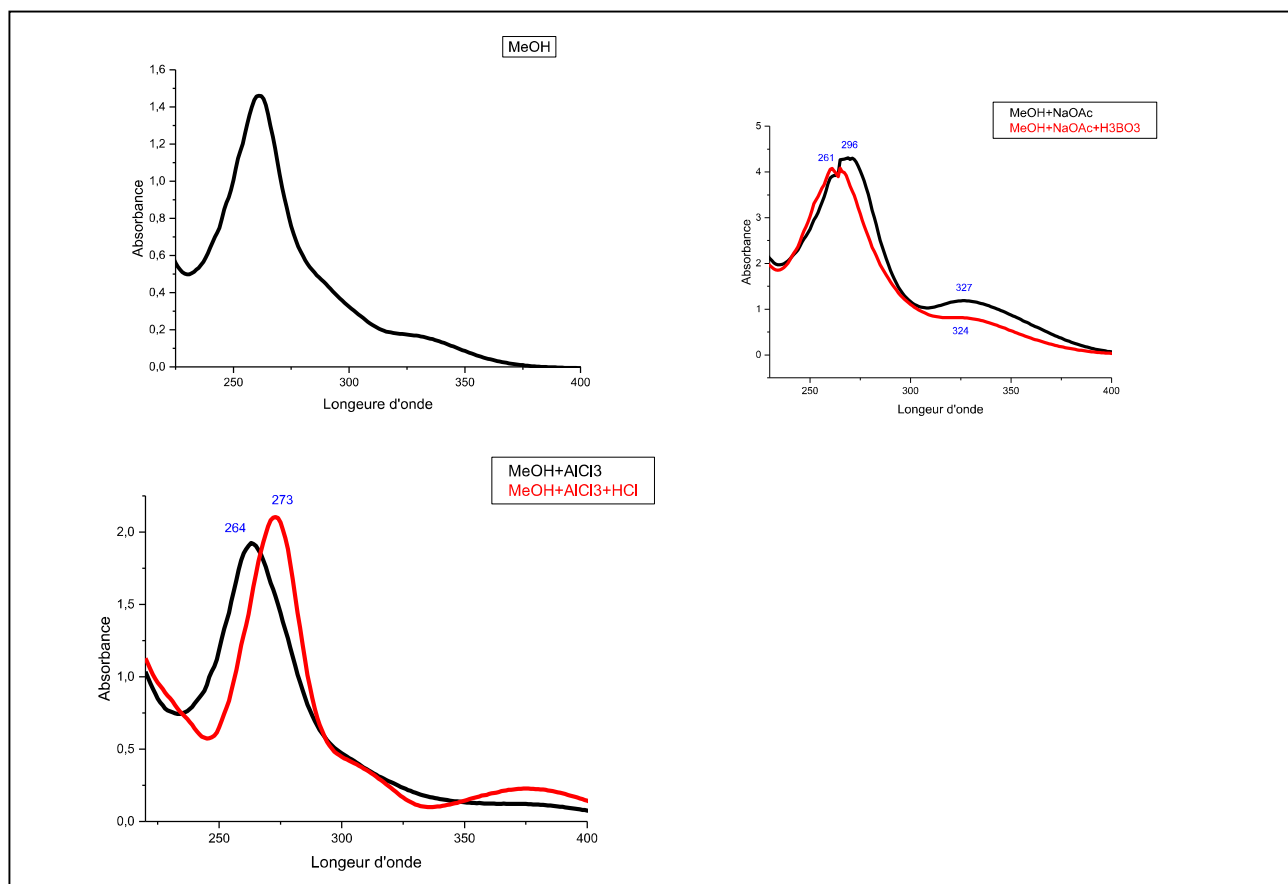


Figure 13 : Série spectrale UV-Visible du composé 1.

Tableau 14 : Donnée de la série spectrale UV-Visible du composé 1.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	323 (épaulement)	261	Isoflavone
NaOAc	327	296	OH libre en 7
NaOAc+ H3BO3	324	261	-
AlCl <sub>3</sub>	328	264	-
AlCl <sub>3</sub> +HCl	322	273	OH libre en 5

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H réalisé dans le DMSO-d<sub>6</sub> (figure 14 a,b , Tableau 15) révèle clairement la présence de :

- Trois singulets d'intégration 1H à déplacement chimique 12.80, 10.77 et 9.48 ppm respectivement, correspondant à proton de OH libre dans les positions 5, 7, et 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à déplacement chimique 8.17 ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets à 7.23 et 6.67 ppm ( $J = 7.5$  Hz) d'intégration 2H chacun sont caractéristiques des protons en couplage *ortho*, attribués aux protons H-2', 6' et H-3', 5' respectivement.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, à 6.24 ppm, et à  $\delta = 6.07$  ppm, ( $J = 2.5$  Hz), attribuables à H-8, H-6 respectivement. indiquant ainsi la substitution des positions 5 et 7.

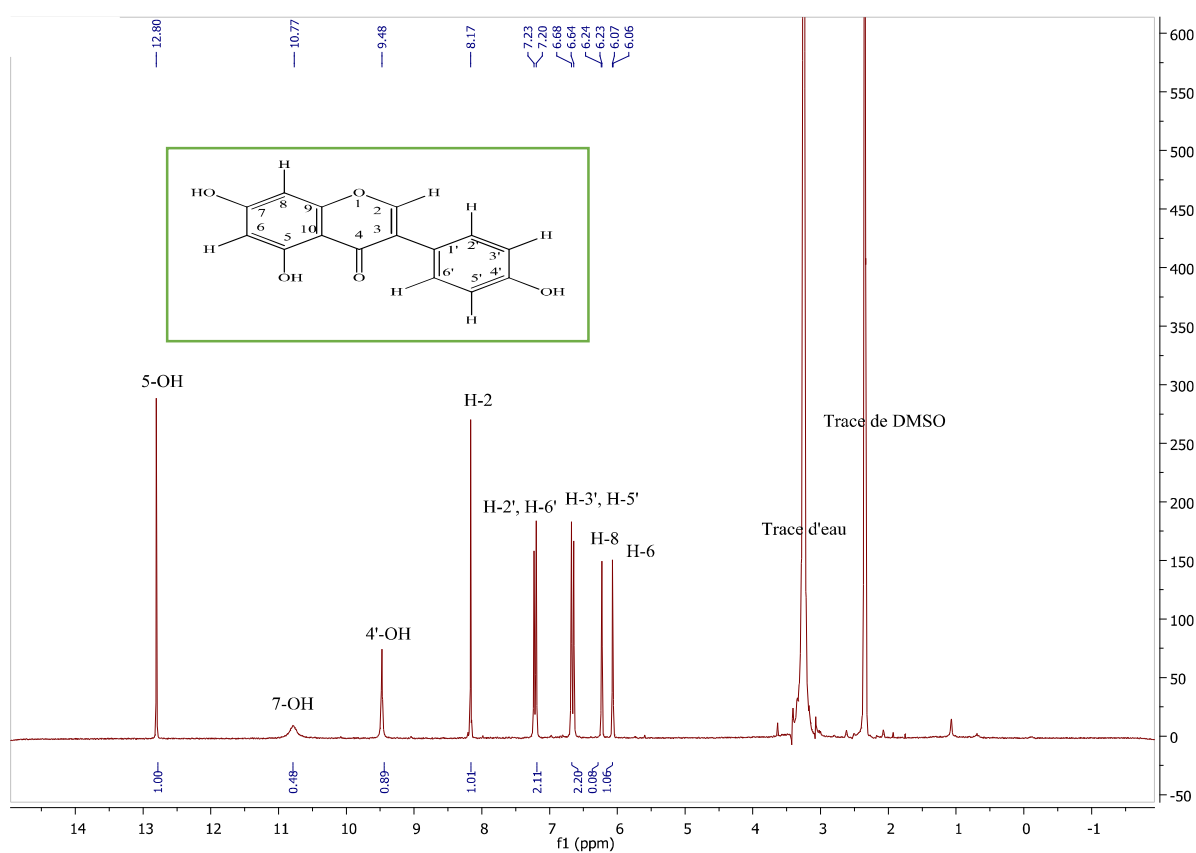
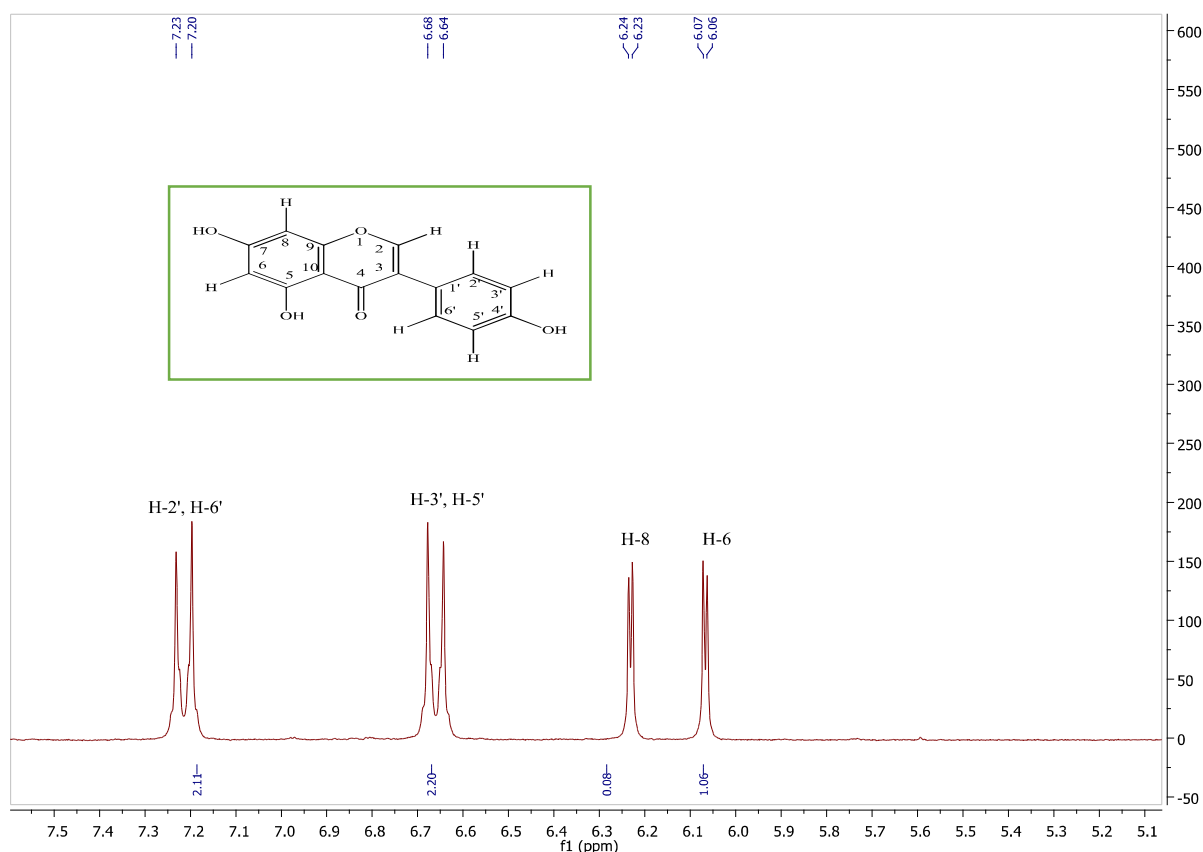


Figure 14 a : Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 1 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure 14 b :** L'étalement de spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 1 entre (6-7.3 ppm) enregistré dans DMSO- $d_6$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 (figure 15 et 16) confirme les données des analyses précédentes de RMN  $^1\text{H}$ , treize signaux sont distingués.

- Six carbones quaternaires deux situés à 180.6 et 157.7 ppm pour le carbone de groupe carbonyle en C-4 et le carbone en position 4' (C-4'), et à 157.9, 104.8 ppm les deux carbones de jonction entre cycle A et C (C-9, C-10), plus les carbones (C-1', C-3) situés à 121.4, 122.5 ppm.
- Deux carbones de groupement hydroxyle à 164.7 et 162.4 ppm correspondant au C-7, C-5.
- Cinq carbones secondaires quatre de cycle B (C-2' et C-6'), (C-3' et C-5') situés à 130.5 – 115.4 ppm respectivement, et l'un de cycle A en position 2 (C-2) à 154.3 ppm.
- Deux carbones en position 6 et 8 (C-6, C-8) situés à 99.3 et 94.0 ppm.

Le spectre de DEPT 135 (Figure 16) confirme les données de spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , cinq signaux apparaissent (C-4, C-2' et C-6', C-3' et C-5', C-6, C-8) avec les mêmes valeurs de déplacement chimique de carbone dans le spectre  $^{13}\text{C}$ . Tous les résultats des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT135 sont reportés dans le tableau 15.

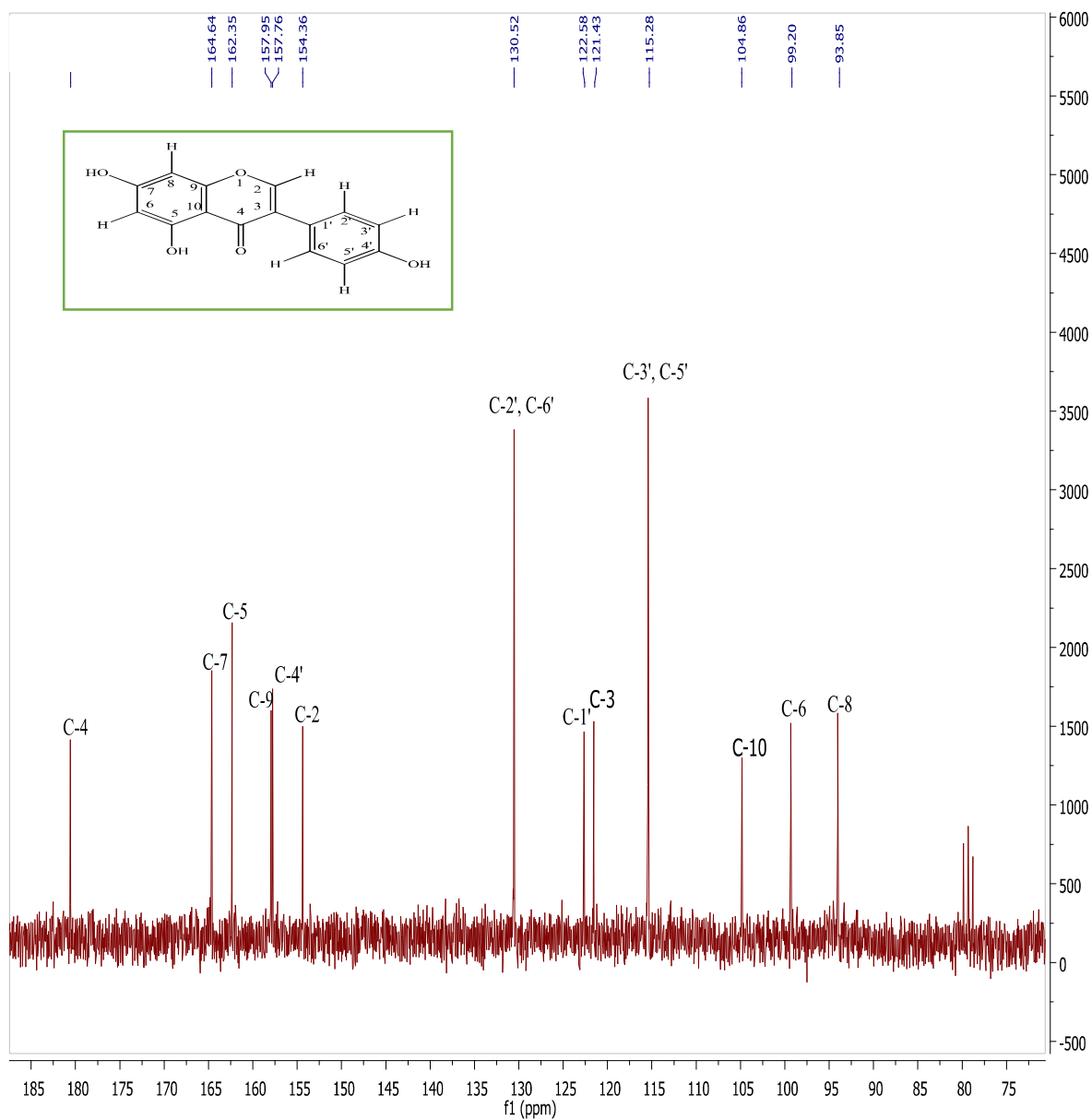


Figure 15: Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 1 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

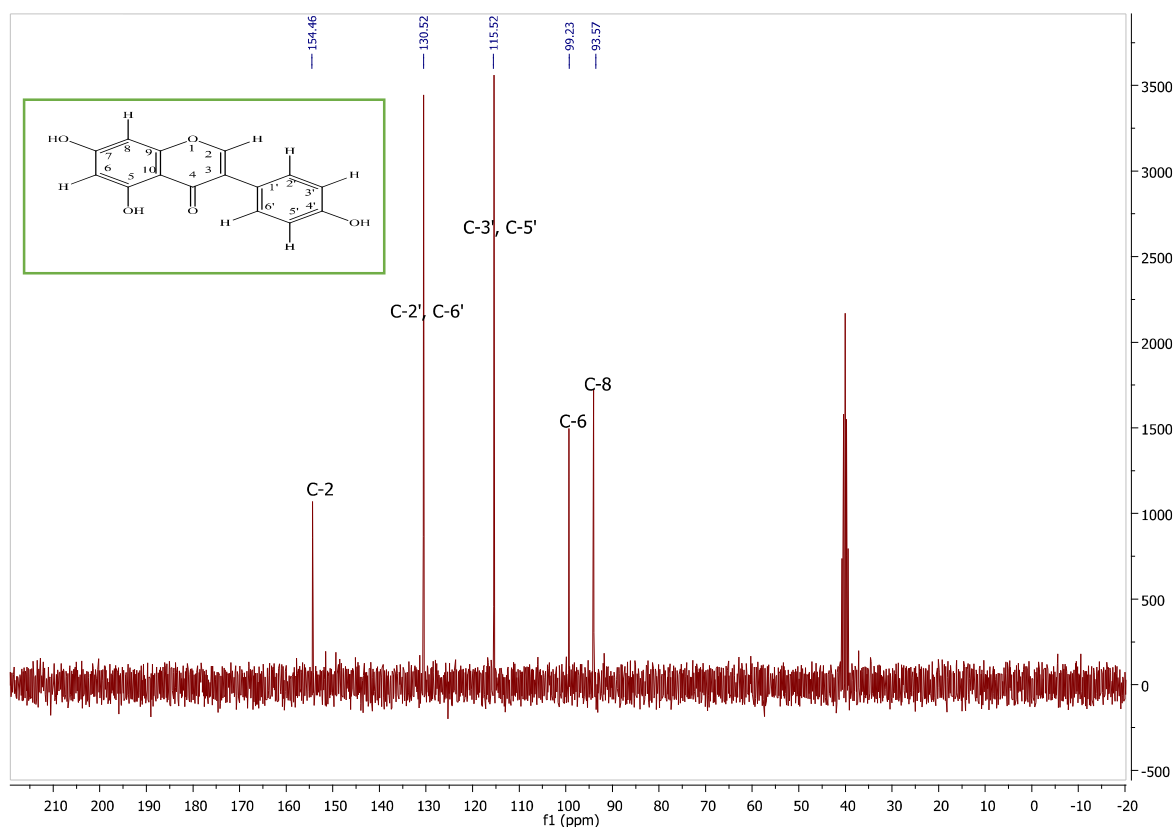


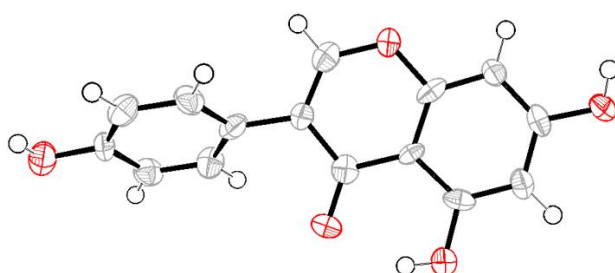
Figure 16: Le spectre DEPT 135 du composé 1 enregistré dans DMSO-d6.

Tableau 15: Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup>H (250 MHz), RMN <sup>13</sup>C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé 1 dans le DMSO.

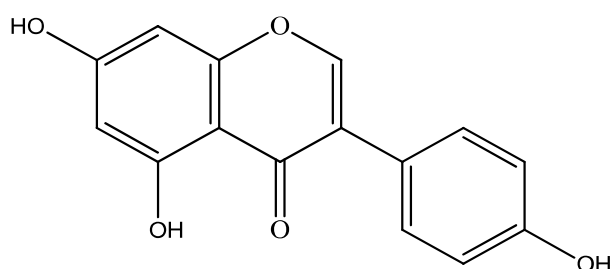
Intégration	( <i>m</i> , <i>J</i> Hz)	Proton	$\delta_H$	Carbone	$\delta_C$	$\delta_{DEPT}$
				C-4	180.6	
1H	S	7-OH	10.77	C-7	164.6	
1H	S	5-OH	12.80	C-5	162.3	
				C-9	157.9	
1H	S	4'-OH	9.48	C-4'	157.7	
1H		H-2	8.17	C-2	154.3	154.3
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-2', H-6'	7.23	C-2', C-6'	130.5	130.5
				C-1'	122.5	
				C-3	121.4	
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-3', H-5'	6.67	C-3', C-5'	115.2	115.2

				C-10	104.8	
1H	d, $J = 2.5$	H-6	6.07	C-6	99.2	99.2
H	d, $J = 2.5$	H-8	6.40	C-8	93.8	93.8

Toute ces analyses spectrale permet d'attribuer la structure du composé 1 (**Genistein** : 4',5,7-Trihydroxyisoflavone) (figure 17), confirmé par le rayon (RX) (figure 18). Ces données sont identique à celles indiquées par la littérature [5, 6, 7].



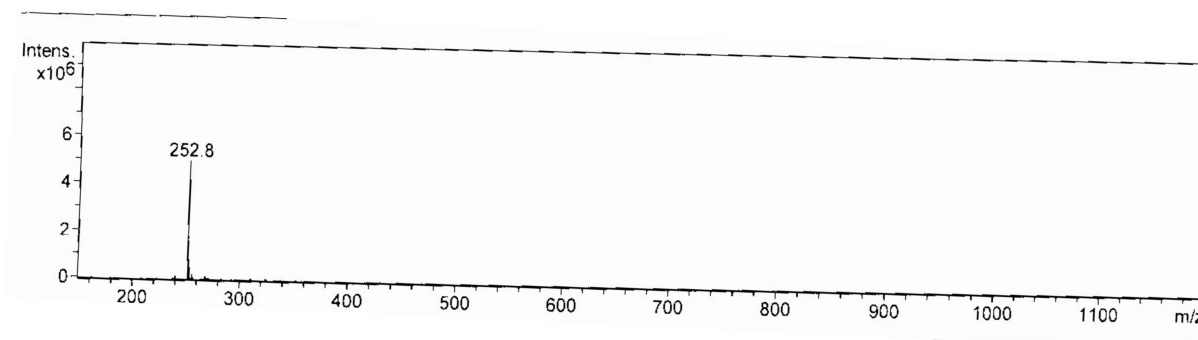
**Figure 18** : Rayon X (RX) de **Genistein** : 4',5,7-Trihydroxyisoflavone



**Figure 17** : Structure de **Genistein** : 4',5,7-Trihydroxyisoflavone

### III.1.3.2. Détermination structurale du composé 2 :

Le composé 2 présente une formule brute  $C_{15}H_{10}O_4$ . Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 19) réalisé en électrospray (ESI) en mode négatif, qui montre un pic pseudo moléculaire  $[M - H]^-$  correspondant à une masse moléculaire égale  $m/z = 252.8$  [4].



**Figure 19:** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 2.

Les données de la série spectrale UV (Figure 20, Tableau 16) montrent :

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 305 nm et la bande II à 250 nm ainsi que la fluorescence orange sous lumière de Wood indique le squelette de type isoflavone.
- Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = +5$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande II en comparant les spectres NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système *orthodi*-OH sur le noyau A.



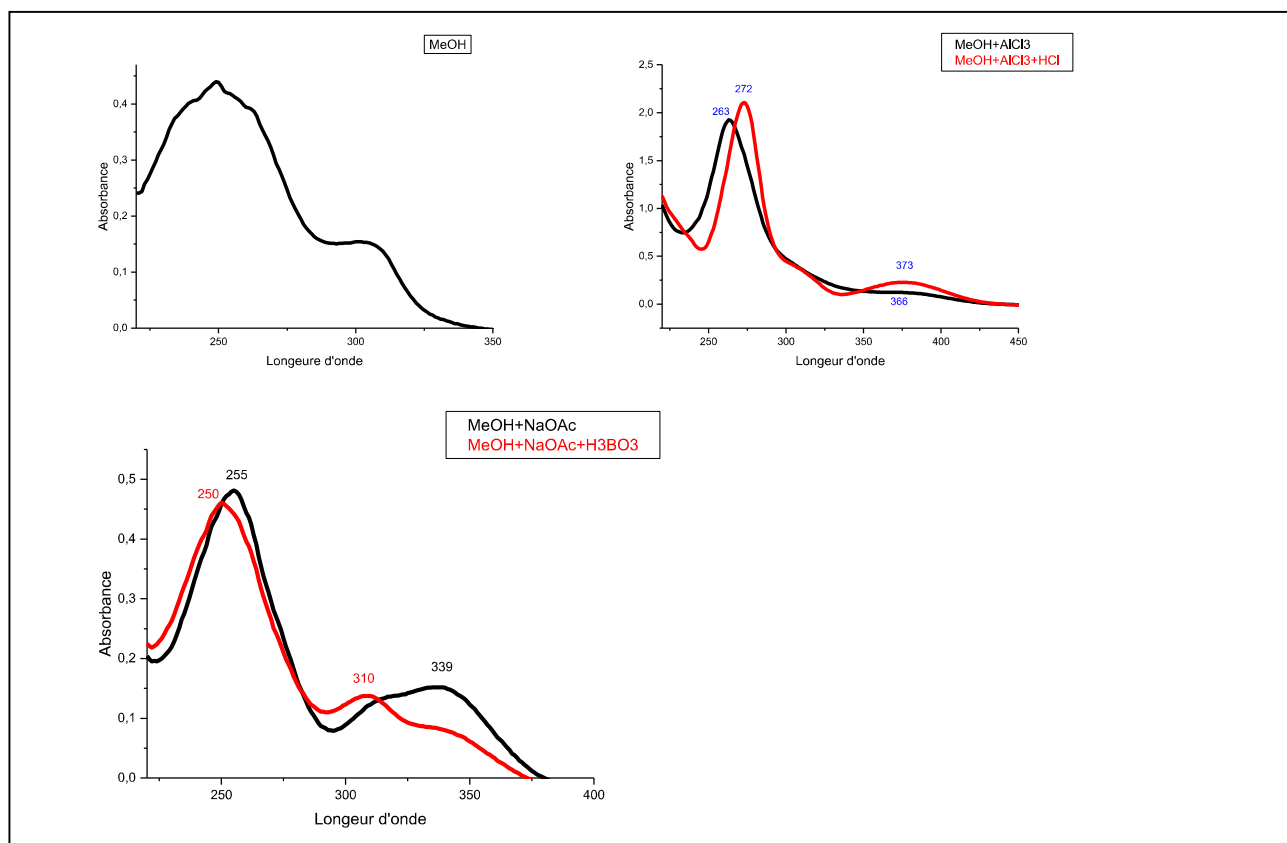


Figure 20: La série UV-Visible du composé 2.

Tableau 16: Donnée de la série UV-Visible du composé 2.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	305 (épaulement)	250	Isoflavone
NaOAc	339	255	OH libre en 7
NaOAc+ H3BO3	310	250	-
AlCl3	366	263	-
AlCl3+HCl	373	272	-

Le spectre de RMN  $^1H$  du composé 2 (figure 21 a, b) est très proche de celui du composé 1. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé 1: les signaux hydroxyles (OH), les signaux des protons aromatique, et on observe la disparition du signal correspondant à 5-OH et l'apparition d'un signal à 8.04 ppm sous forme de doublet.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure 21 a, b, Tableau 17) indique la présence des protons suivants :

- Deux singulets larges d'intégration 1H à déplacement chimique 10.88, 9.63 ppm respectivement, correspondant à proton d'OH libre dans les positions 7, 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à déplacement chimique 8,36 ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Un doublet d'intégration 1H résultant d'un couplage *ortho* avec (H-6) à déplacement chimique 8.04 ppm ( $J = 8,8$  Hz) attribuable à H-5.
- Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi deux doublet d'intégration 2H à 7,46, 6.89 ppm ( $J = 8,7$  Hz), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6'.
- Un doublet dédoublet d'intégration 1H à 7,02 ppm ( $J = 8,8 ; 2.2$  Hz), attribuable à H-6, caractéristiques des protons en couplage *ortho* et *mé*ta (couplé avec les deux protons en position 5 et 8).
- Un doublet d'intégration 1H résultant d'un couplage *mé*ta avec (H-6) à déplacement chimique 6.93 ppm ( $J = 8,8$  Hz) attribuable à H-8.

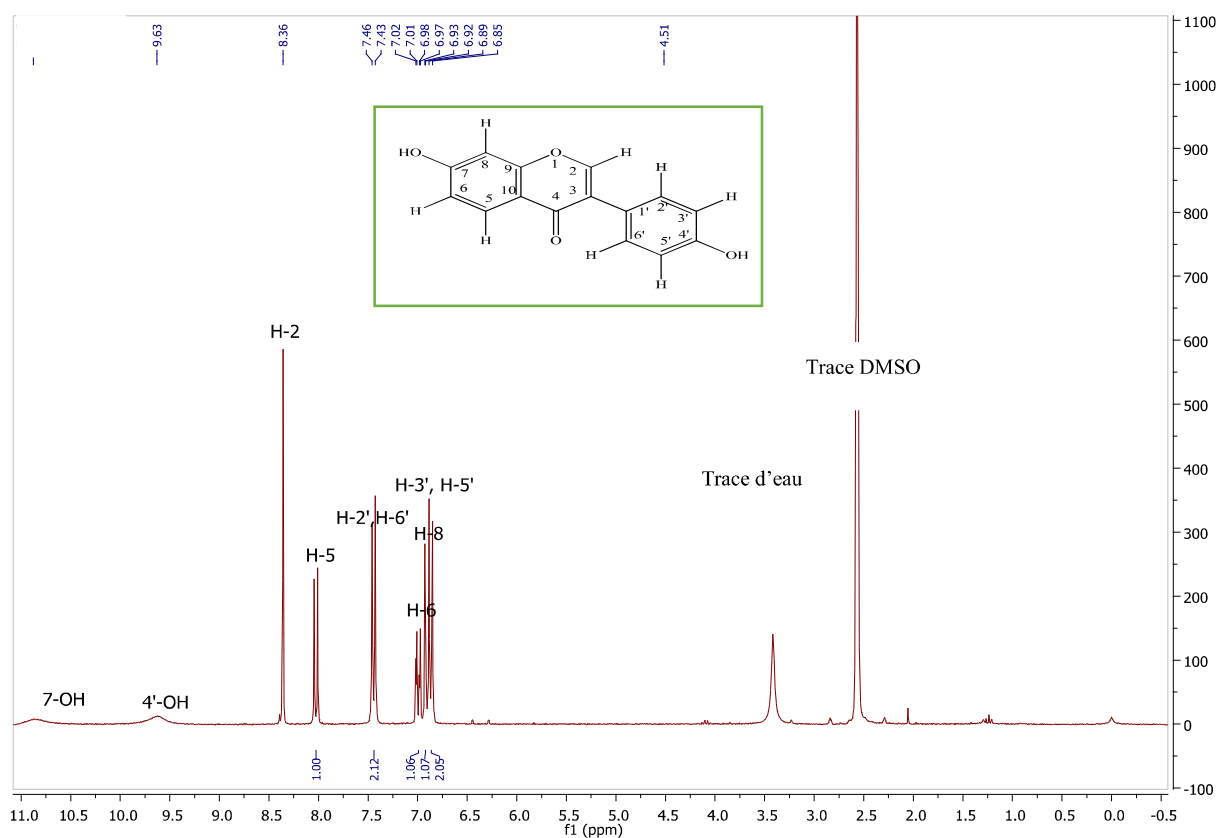
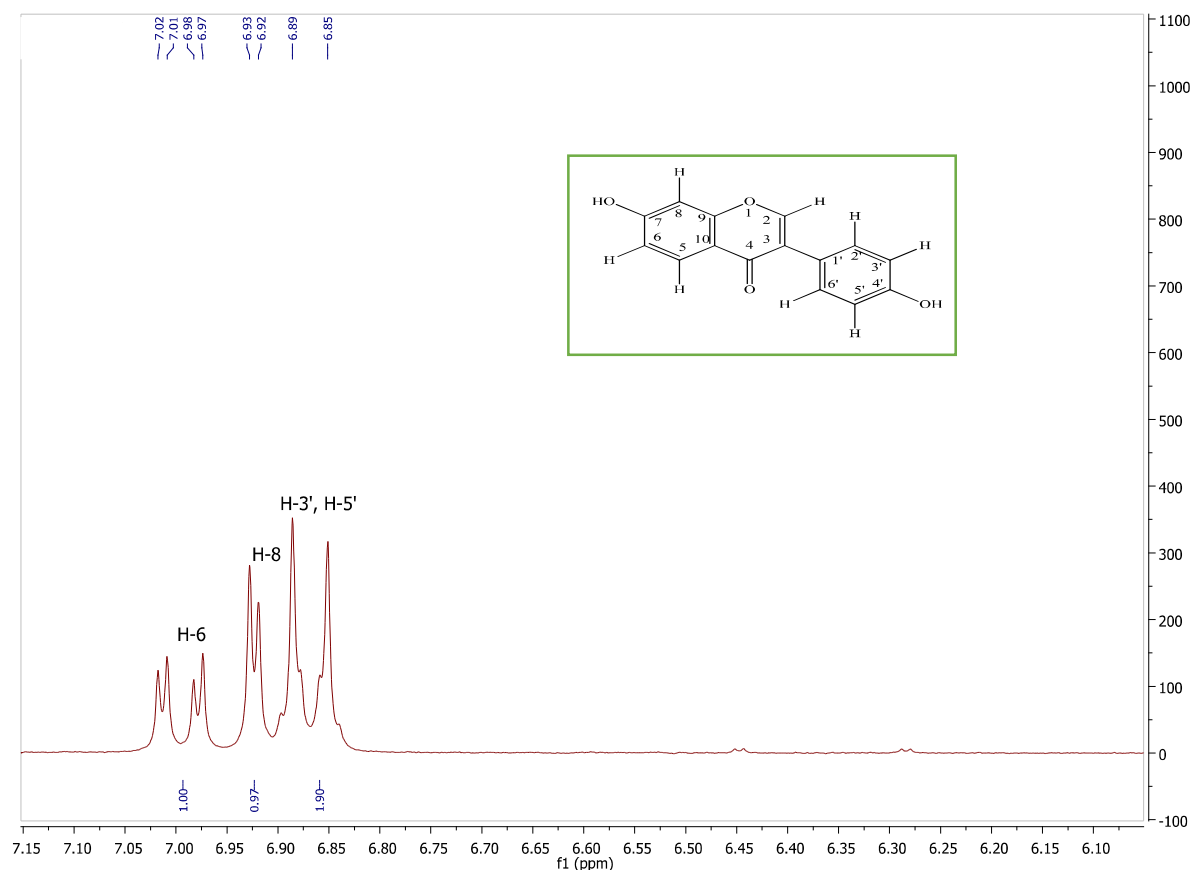


Figure 21a : Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 2 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure 21b** : L'étalement de spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 2 entre (6.80-7.05 ppm) enregistré dans DMSO- $d_6$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 (Figure 22, 23) confirme les données des analyses précédentes de RMN  $^1\text{H}$ , treize signaux sont distingués :

- Cinq carbones quaternaires l'un du groupement carbonyle en C-4 situés à 174.7 ppm, deux carbones de jonction entre cycle A et C et à 157.7, 115.5 ppm (C-9, C-10), et deux autres carbones C-3, C-1' situés à 123.8 à 122.5 ppm.
- Deux carbones (C-7 ; C-4') à 162.4 et 157.4 ppm qui portent la fonction hydroxyle,
- Cinq carbones aromatiques (C-H) quatre de cycle B (C-2' et C-6'), (C-3' et C-5') situés à 130.1-115.2 ppm respectivement, et l'un de cycle C en position 2 (C-2) à 154.3 ppm.
- Trois carbones aromatiques de cycle A en position 5, 6 et 8 (C-5, C-6, C-8) situés à 127.8, 116.8 et 102.2 ppm.

Le spectre de DEPT 135 (Figure 23) confirme les données de spectre  $^{13}\text{C}$ , permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones suivants : C-2, C-5, C-2' et C-6', C-3' et C-5', C-6, C-8. Tous les résultats des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT135 sont présentés dans le tableau 17.

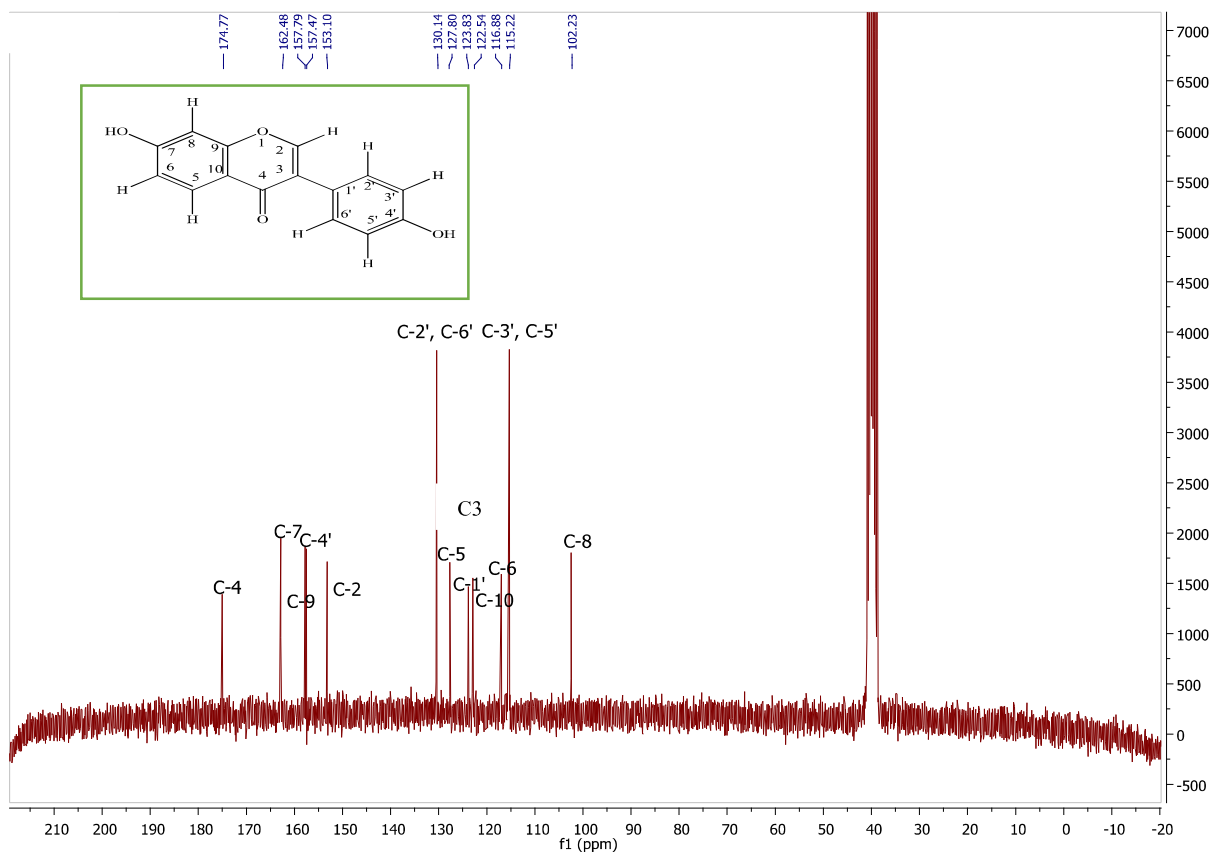


Figure 22: Le spectre RMN <sup>13</sup>C du composé 2 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

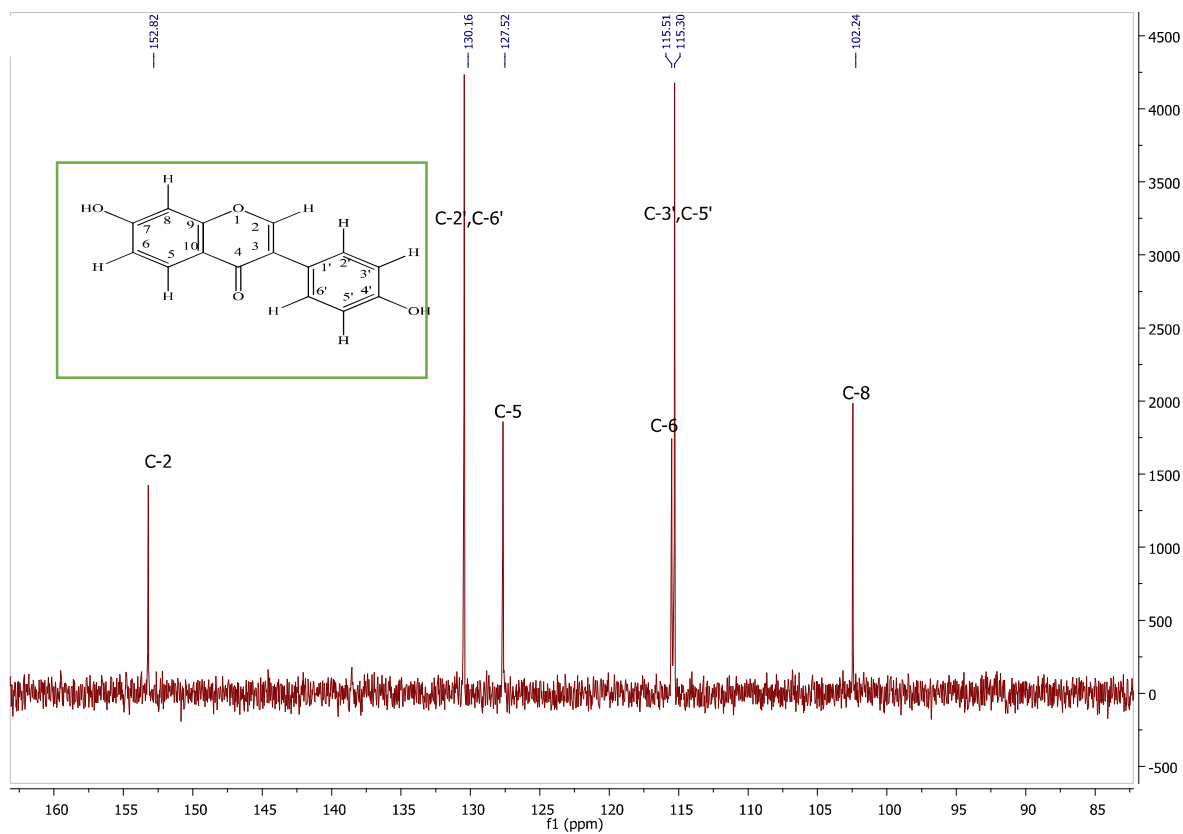
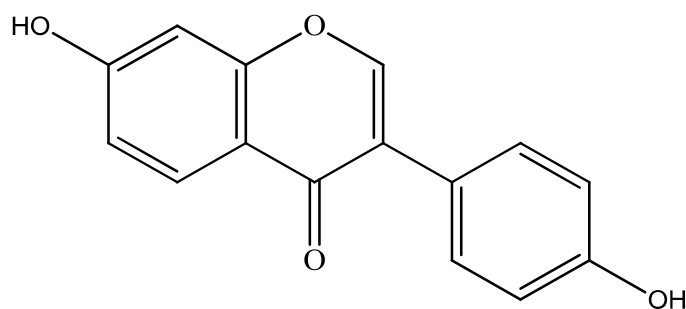


Figure 23 : Le spectre DEPT 135 du composé 2 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

**Tableau 17:** Déplacements chimiques de RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé **2** dans DMSO.

Intégration	( <i>m</i> , <i>J</i> Hz)	Proton	$\delta_H$	Carbone	$\delta_C$	$\delta_{DEPT}$
				C-4	174.7	
1H	S	7-OH	10.88	C-7	162.4	
				C-9	157.7	
1H	S	4'-OH	9.63	C-4'	157.4	
1H		H-2	8.36	C-2	153.1	153.1
2H	d, <i>J</i> = 8.7	H-2', H-6'	7.46	C-2', C-6'	130.1	130.1
1H	d, <i>J</i> = 8.8	H-5	8.04	C-5	127.8	
				C-1'	123.8	
				C-3	122.5	
				C-10	116.8	
1H	d, <i>J</i> = 8.8.2.2	H-6	7.02	C-6	115.5	115.5
2H	d, <i>J</i> = 8.7	H-3', H-5'	6.89	C-3', C-5'	115.2	115.2
H	d, <i>J</i> = 2.2	H-8	6.93	C-8	102.2	102.2

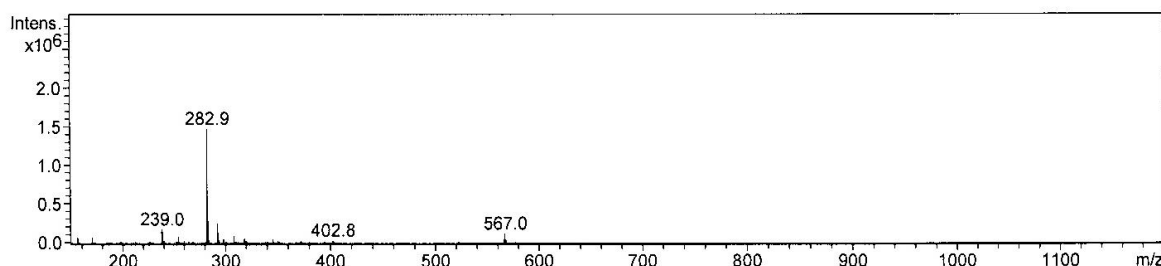
Toute ces analyses spectrale permet d'attribuer la structure du composé **2** (**Daidzein** : 7, 4'-Dihydroxy isoflavone) (figure 24) .Ces données sont identique à celles indiquées par la littérature [5, 6, 8].



**Figure 24 :** Structure de **Daidzein** : 7, 4'- Dihydroxy isoflavone.

### III.1.3.3. Détermination structurale du composé 3 :

Le composé 3 présente une formule brute  $C_{16}H_{12}O_5$ . Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 25) réalisé en électrospray (ESI) en mode négatif, qui montre un pic pseudo moléculaire  $[M-H]^-$  correspondant à une masse moléculaire égale  $m/z = 282.9$  [4].



**Figure 25** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 3.

Les données de la série spectrale UV (Figure 26, Tableau 18) montrent :

Un épaulement de la bande I à 305 nm qui nous oriente vers un squelette isoflavone et la bande II à environ 255 nm.

- Le déplacement bathochrome de la bande II après l'addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = +9$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Le spectre enregistré en présence d' $AlCl_3/HCl$  ne montre aucun changement significatif comparativement à celui enregistré dans le MeOH révélant ainsi la présence d'un O-R en position 5.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande II en comparant les spectres NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système *ortho*-OH sur le noyau A.

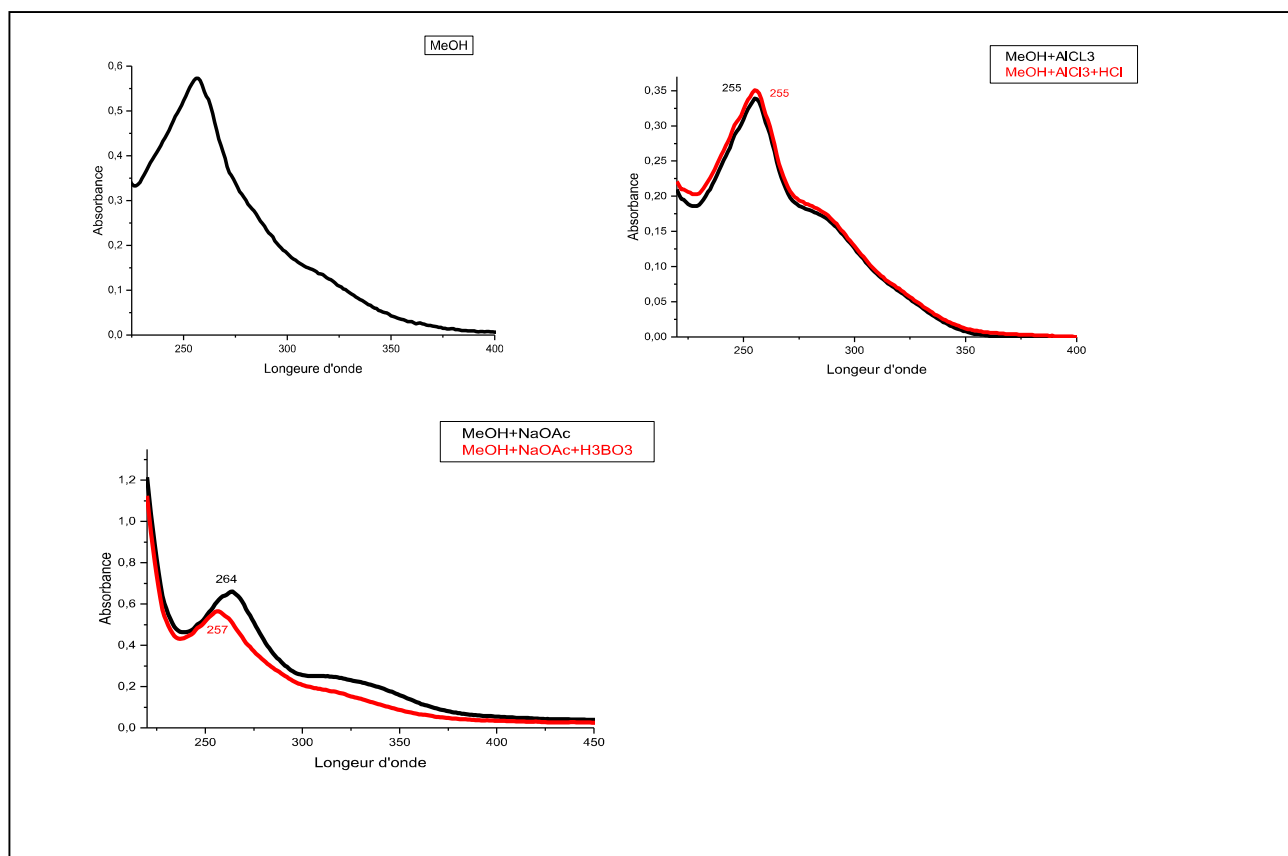


Figure 26: La série UV-Visible du composé 3.

Tableau 18: Donnée de la série UV-Visible du composé 3.

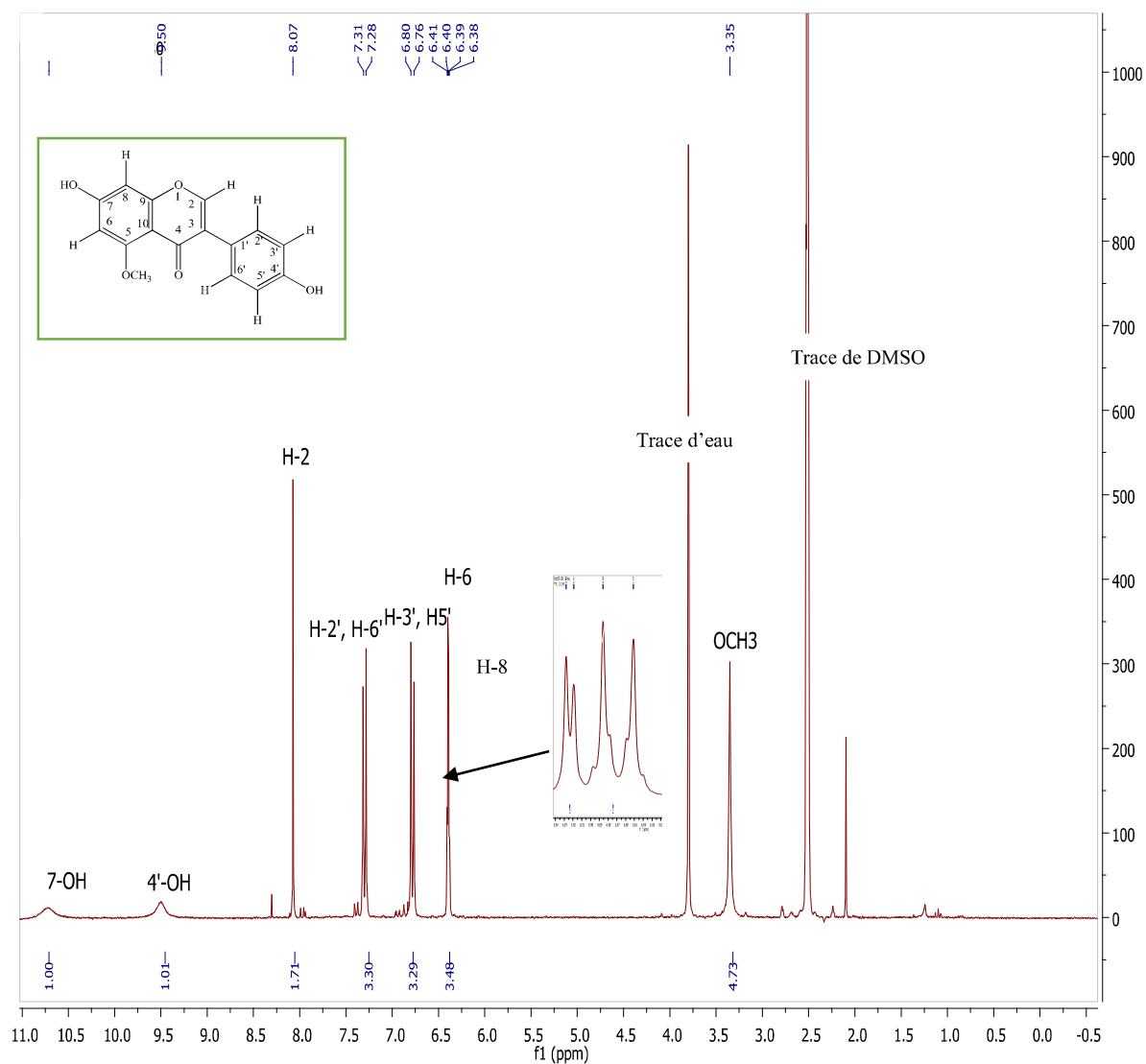
Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	305 (épaulement)	255	Isoflavone
NaOAc	311	264	OH libre en 7
NaOAc+ H3BO3	310	257	l'absence de système orthodi-OH sur le cycle A
AlCl3	305	255	-
AlCl3+HCl	305	255	O-R en 5

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 27, Tableau 19) du composé 3 révèle la présence de 8 signaux parmi eux, un signal résonant à 3.76 ppm indique la présence d'un groupement méthoxyle ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ).

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 3 permet de tirer les indications suivantes:

- Un singulet d'intégration 1H à 8.06 ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Un singulet d'intégration 1H à 10.68 ppm attribuable à 7-OH.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à 9.50 ppm attribuable à H-4' indiquant ainsi la substitution de la position 4'.
- Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi deux doublets d'intégration 2H chacun, à 7.31 ppm et à 6.80 ppm ( $J = 7.5 \text{ Hz}$ ) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à 3.76 ppm montrant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, à 6,41 ppm ( $J=2.5 \text{ Hz}$ ), et à 6.39 ppm, ( $J= 2.5 \text{ Hz}$ ), attribuables à et H-8, H-6 respectivement.





**Figure 27** : Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 3 enregistré dans DMSO- $d_6$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 (Figure 28, 29) confirme les données des analyses précédentes de RMN  $^1\text{H}$ , quatorze signaux sont distingués.

- Sept carbones quaternaires ; le premier situé à 174.1 ppm de groupement carbonyle en C-4 et pour les deux carbones de jonction entre cycle A et C (C-9, C-10) situés à 159.1 et 108.1 ppm, deux autres en C-1' et C-3 situés à 124.8 et 122.8 ppm. Deux carbones qui porte le groupement hydroxyle (C-4' ; C-7) à 157.5 et 162.8 ppm.
- Un carbone de groupement méthoxyle à 56.2 correspondant au C-5.
- Sept carbones aromatiques (C-H), quatre de cycle B (C-2' et C-6'), (C-3' et C-5') situés à 130,5 et 115,1 ppm respectivement, et l'un de cycle C en position 2 (C-2) à 157.1 ppm, deux autres carbones aromatiques de cycle A en position 6 et 8 (C-6, C-8) situés à 96.5 et 95.2 ppm.

Le spectre de DEPT 135 (Figure 29), permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones suivants C-2, C- 2'et C- 6', C- 3' et C- 5', C-6, C-8, O-CH<sub>3</sub>. Tous les résultats des spectres <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT135 sont présentés dans le tableau 19.

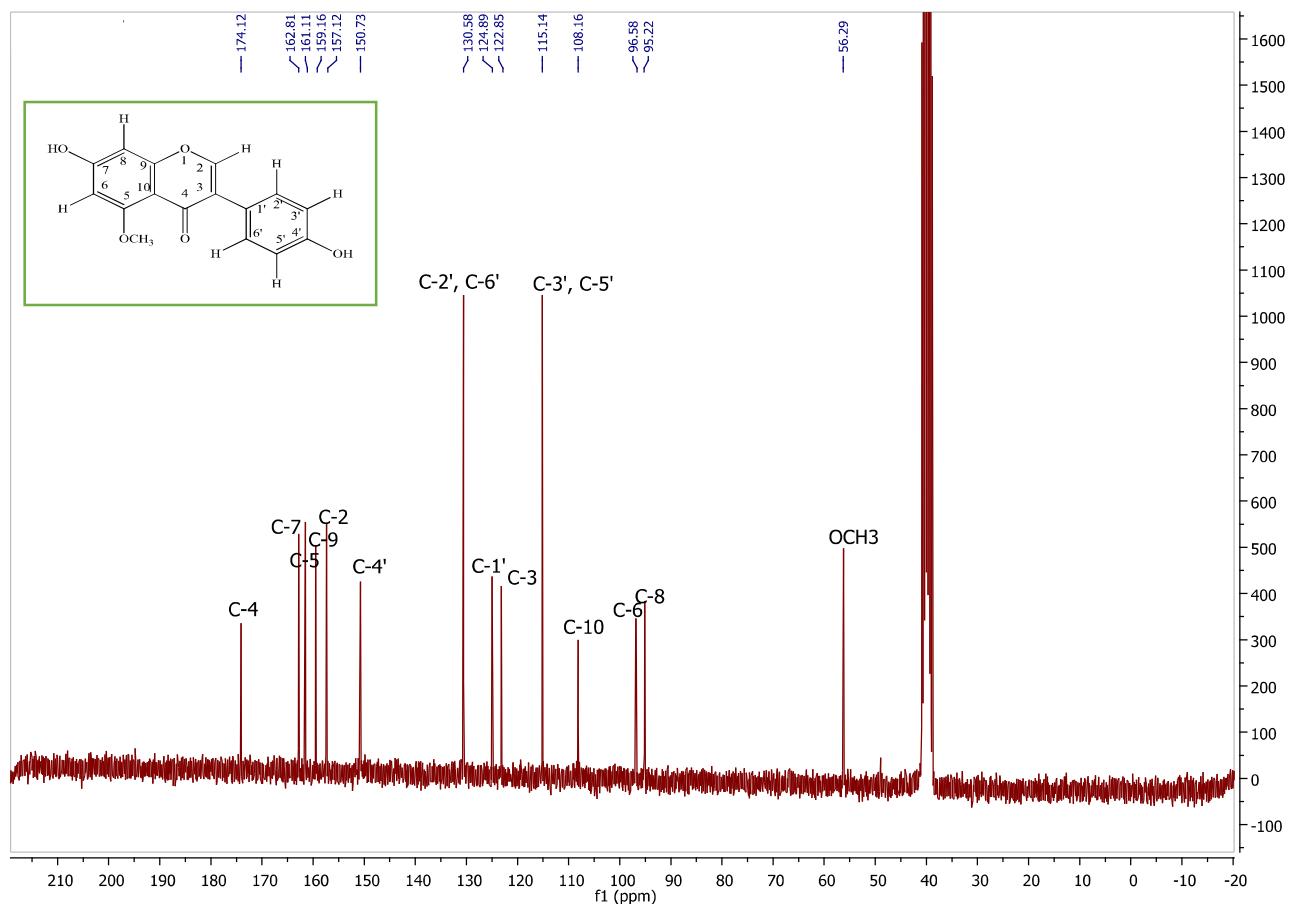
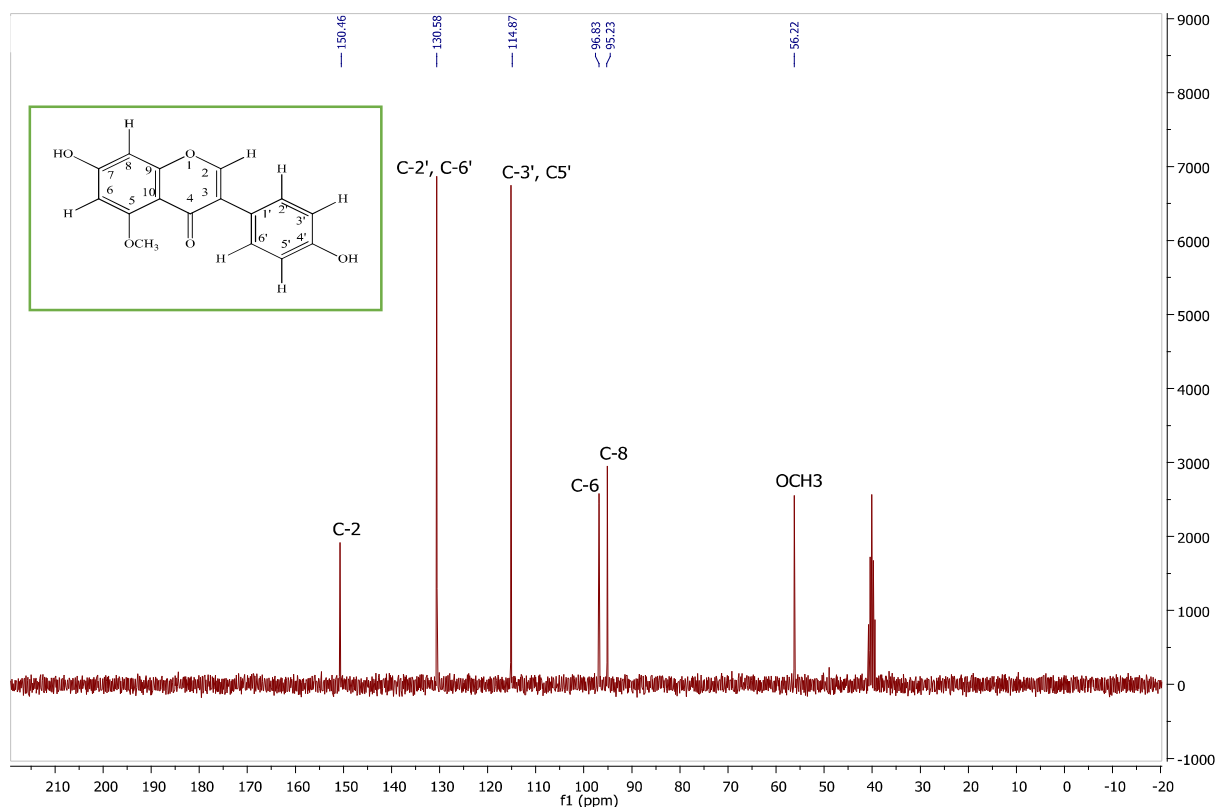


Figure 28: Le spectre RMN <sup>13</sup>C du composé 3 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure 29:** Le spectre RMN DEPT 135 du composé 3 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

L'étude du spectre de corrélation HMQC (Figure 30, Tableau 19) permet d'effectuer les attributions suivantes:

- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à 157.1 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à 130.5 ppm. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à 115.1 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à 96.5 ppm qui est le C-6.
- Une tache de corrélation entre H-8 et un atome de carbone à 95.2 ppm qui est le C-8.
- Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à 56.2 ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle en position 5.

Les attributions des carbones restants sont complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Figure 31, Tableau 19):

- Une tache de corrélation entre le H-2 et les atomes de carbone à 122.8 ppm, 124.8 ppm, 159.1 ppm et à 174.1 ppm attribuables à C-3, C-1', C-9 et C-4 respectivement.
- Les protons H-3', H-5', H-2' et H-6' mènent à la localisation de C-4' à 150.7 ppm.

- Une tache de corrélation entre H-2' et H-6' et le carbone à 122.8 ppm attribuables à C-3. Ces mêmes protons montrent également une corrélation avec les carbones C-2' et C-6' respectivement à 130.5 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-3', H-5' et le carbone à 124.8 ppm attribuables à C-1'. Ces mêmes protons montrent également une corrélation avec les carbones C-3' et C-5' à 115.1 ppm.
- Une tache de corrélation entre le H-8 et le carbone oxygéné à  $\delta = 159.1$  ppm attribuable à C9.
- Une tache de corrélation entre H-6 et le carbone oxygéné à  $\delta = 161.1$  ppm attribuables à C-5. Ce même proton montre également une corrélation avec les carbones à  $\delta = 95.2$  ppm et à  $\delta = 108.1$  ppm qui ne peuvent être que le C-8 et C-10 respectivement.
- Une tache de corrélation entre le groupement méthoxy et le carbone C-5 à  $\delta = 161.1$  ppm.

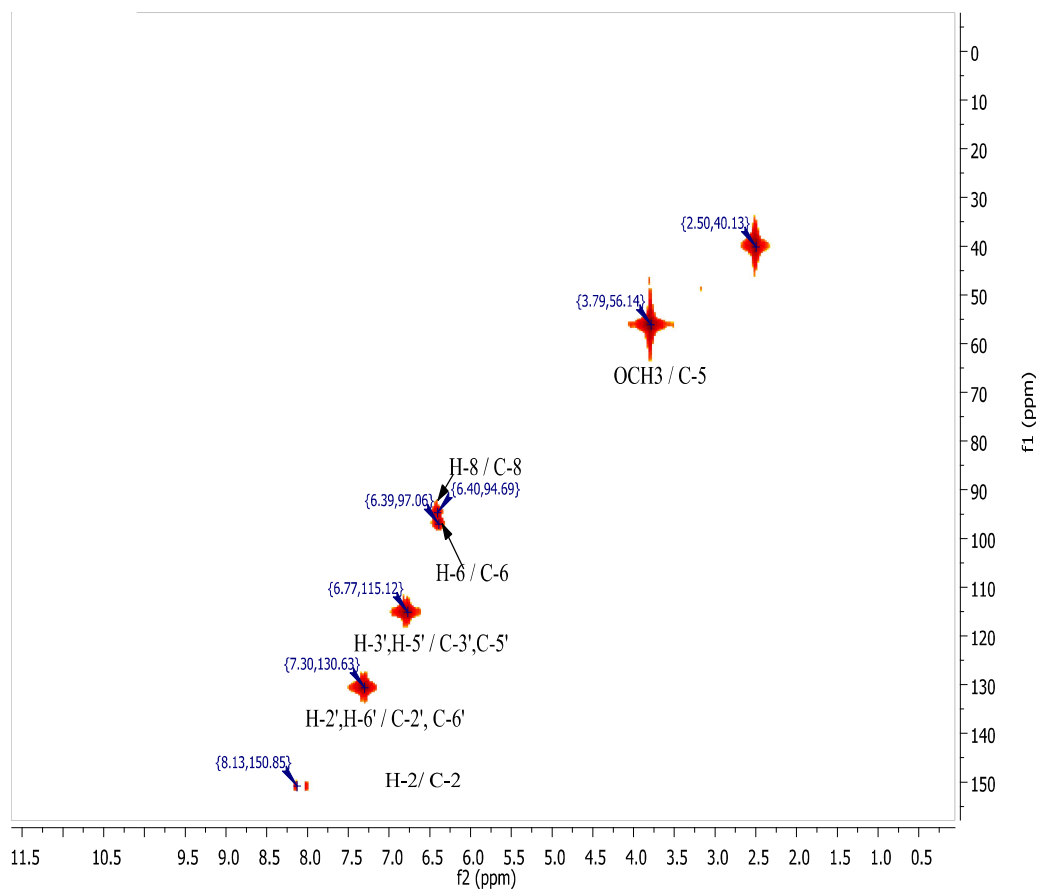
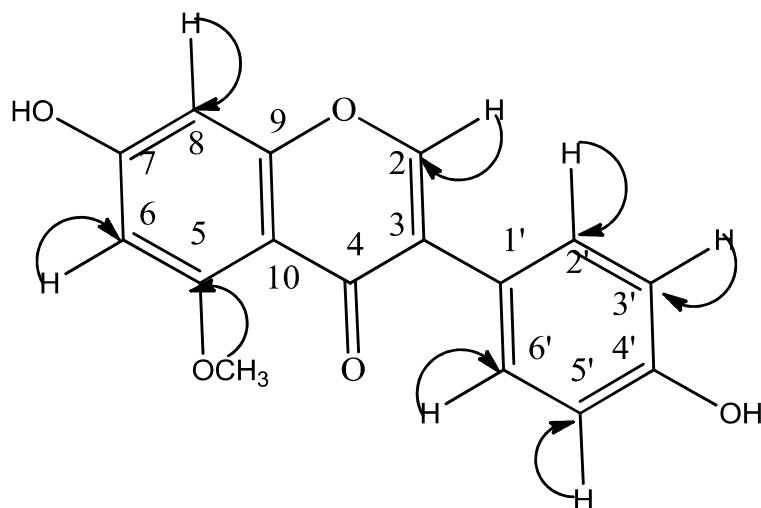


Figure 30 : Le spectre HMQC du composé 3.

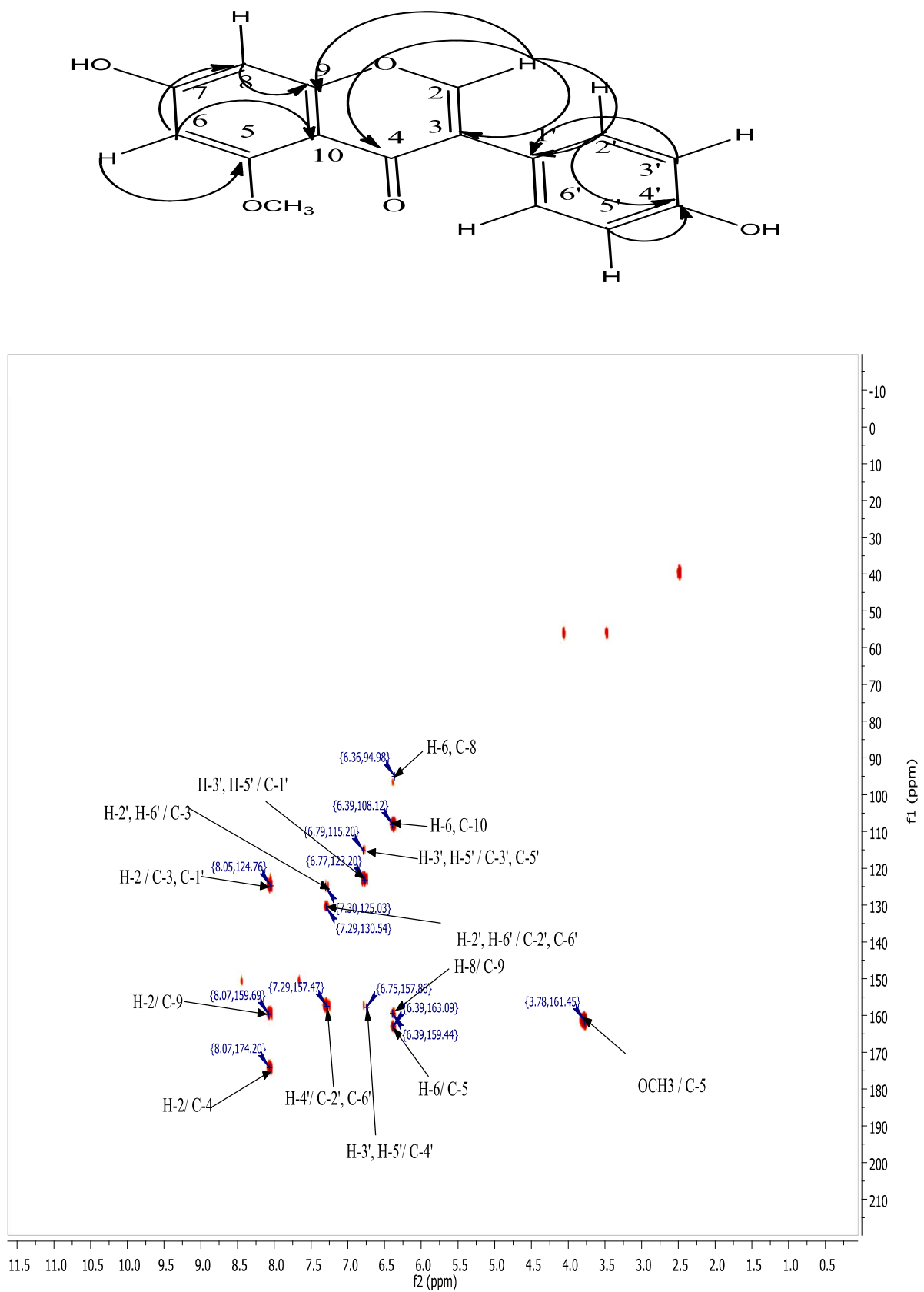
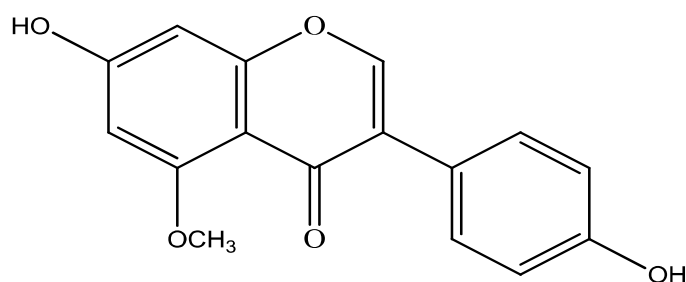


Figure 31 : Le spectre HMBC du composé 3.

**Tableau 19:** Déplacements chimiques de RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) et RMN-2D HMQC- HMBC du composé **3** dans DMSO.

Intégration	( <i>m</i> , <i>J</i> Hz)	Proton	$\delta_H$	Carbone	$\delta_C$	$\delta_{DEPT}$	HMQC(correlations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	HMBC (correlations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) $J^2$ - $J^3$
				C-4	174.1			
1H	S	7-OH	10.68	C-7	162.8			
				C-5	161.1			
				C-9	159.1			
1H	S	H-2	8.07	C-2	157.1	157.1	H-2/C-2	H-2/ C-3;C-1';C-9; C-4
1H	S	4'-OH	9.50	C-4'	150.7			
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-2', H-6'	7.31	C-2', C-6'	130.5	130.5	H-2', H-6'/ C-2', C-6'	H-2', H-6' /C-4', C-2', C-6', C-3
				C-1'	124.8			
				C-3	122.8			
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-3', H-5'	6.80	C-3', C-5'	115.1	115.1	H-3', H-5'/ C-3', C-5'	H-3', H-5'/C-4', C-1', C-3',C-5'
				C-10	108.1			
1H	d, <i>J</i> = 2.5	H-8	6.41	C-6	96.5	96.5	H-6/ C-6	H-6/ C-5;C-8;C-10
1H	d, <i>J</i> = 2.5	H-6	6.39	C-8	102.2	102.2	H-8/ C-8	H-8/ C-9
				OCH <sub>3</sub>	56.2	56.2	OCH <sub>3</sub> / C-5	

Toute ces analyses spectrale permet d'attribuer la structure du composé **3** (**5-méthoxy Daidzein** : 5-méthoxy-4',7-dihydroxy isoflavone) (figure 32). Ces données sont identique à celles indiquées par la littérature [5, 9].

**Figure 32 :** Structure de **5-méthoxy Daidzein** : 5-méthoxy-4',7-dihydroxy isoflavone.

#### III.1.3.4. Détermination structurale du composé 4 :

Le composé 4 présente une formule brute  $C_{21}H_{20}O_{10}$ . Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 33) réalisé en électrospray (ESI) en mode négatif, qui montre un pic pseudo moléculaire  $[M - H^+]^-$ , correspondant à une masse moléculaire égale à  $m/z = 431.0$  [4].

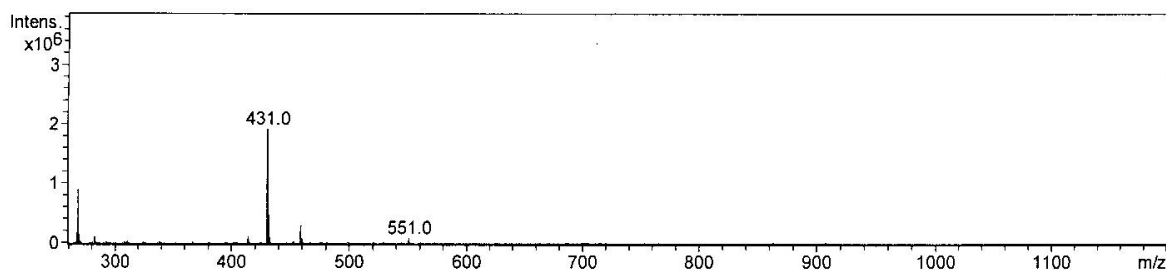


Figure 33 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 4.

Les données de la série spectrale UV (Figure 34, Tableau 20) montrent :

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 323 nm et la bande II à environ 261 nm ainsi que la fluorescence Orange sous lumière de Wood confirmant le squelette de type isoflavone.
- Le déplacement bathochrome de la bande II après addition d' $AlCl_3 + HCl$  ( $\Delta\lambda = +9$  nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 5.
- L'absence de déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un O-R libre en position 7.



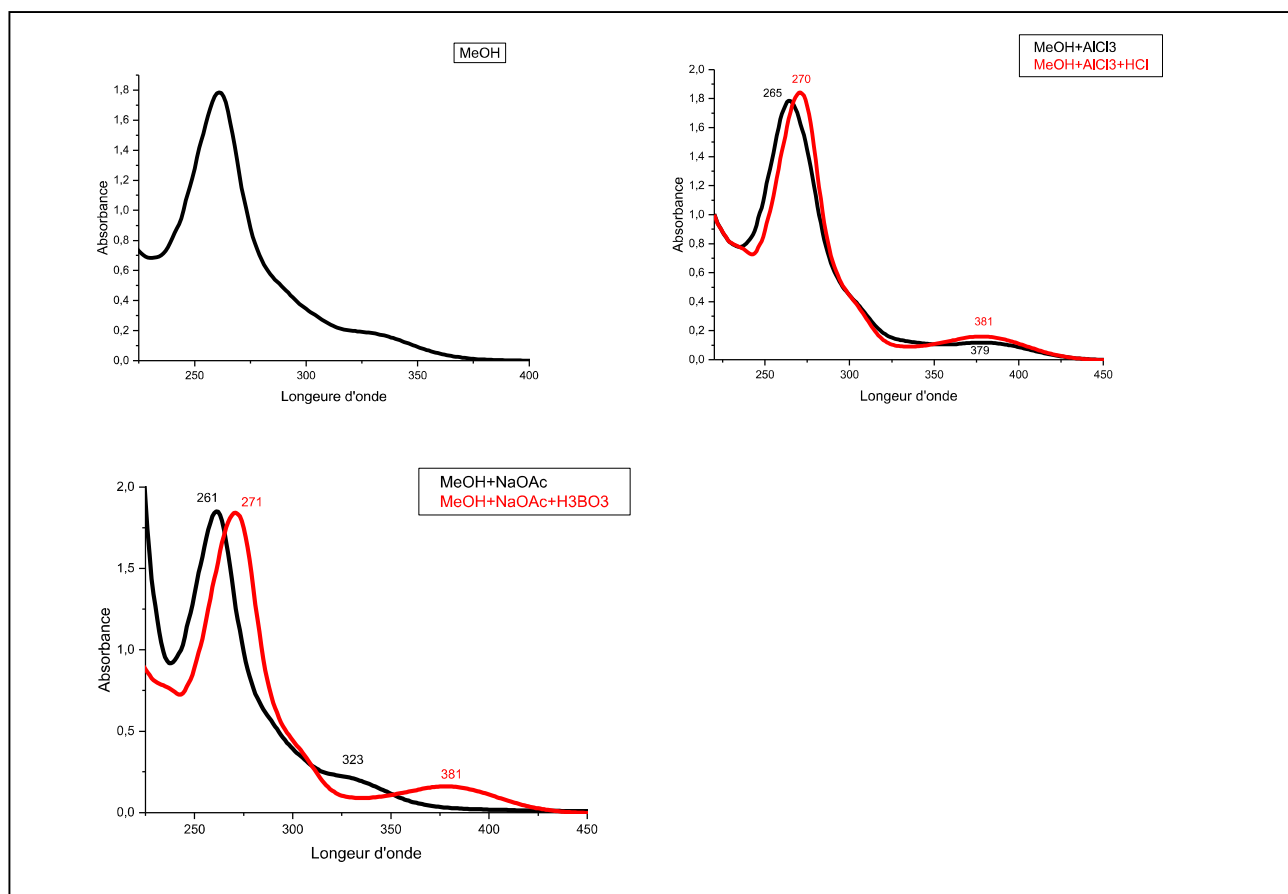


Figure 34: La série UV-Visible du composé 4.

Tableau 20 : Données de la série UV-Visible du composé 4.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	323 (épaulement)	261	Isoflavone
NaOAc	323	261	O-R libre en 7
NaOAc+ H3BO3	381	271	-
AlCl3	379	265	-
AlCl3+HCl	381	270	OH libre en 5

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (figure 35 a, b et c, Tableau 21) révèle la présence de 15 signaux parmi eux, quelques signaux résonnent entre 3.85 et 3.18 ppm indiquant la présence d'une molécule de sucre glucose.

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 4 permet de tirer les indications suivantes :

- Deux singulets d'intégration 1H à 9.69 et 8,50 ppm attribuable aux protons des groupements hydroxyles 4'-OH et 5-OH, respectivement.
- Un singulet d'intégration 1H à 13.01 ppm attribuable à H-2 caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi deux doublets d'intégration 2H chacun, à 7.48 et à 6.91 ppm ( $J = 7.5$  Hz) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.
- Deux doublets d'intégration 1H situés à 6.79 ( $J = 2.5$  Hz) et à 6.54 ppm ( $J = 2.5$  Hz) attribuables à H-8 et H-6.
- Un doublet d'intégration 1H situé à 5.24 ppm ( $J = 5$  Hz) attribuable à proton anomérique de sucre glucose (H-1'').
- Un doublet d'intégration 1H situé à 5.51 ppm ( $J = 7.5$  Hz) attribuable à proton de sucre glucose (OH-2'').
- Un multiplet d'intégration 2H situé entre 5.17-5.11 ppm attribuables aux protons des groupements hydroxyles de sucre glucose (OH-3'', OH-4'').
- Un triplet d'intégration 1H situé à 4.71 ppm ( $J = 2.5-5$  Hz) attribuables aux protons des groupements hydroxyles de sucre glucose (OH-6'').

Les valeurs des constantes de couplage de ces noyaux sont caractéristiques de couplages vicinaux de protons de groupements hydroxyles avec des groupements CH. Ces observations orientent vers la présence de quatre groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

- Un multiplet d'intégration 1H situé entre 3.85-3.74 ppm attribuables au proton de sucre glucose (H-6a'').
- Un multiplet d'intégration 2H situé à 3.57-3.49 ppm attribuables aux protons de sucre glucose (H-6b'', H-5'').
- Un multiplet d'intégration 2H situé à 3.38-3.31 ppm attribuables aux protons de sucre glucose (H-2'', H-3'').
- Un multiplet d'intégration 1H situé à 3.27-3.18 ppm attribuables aux protons de sucre glucose (H-4'').

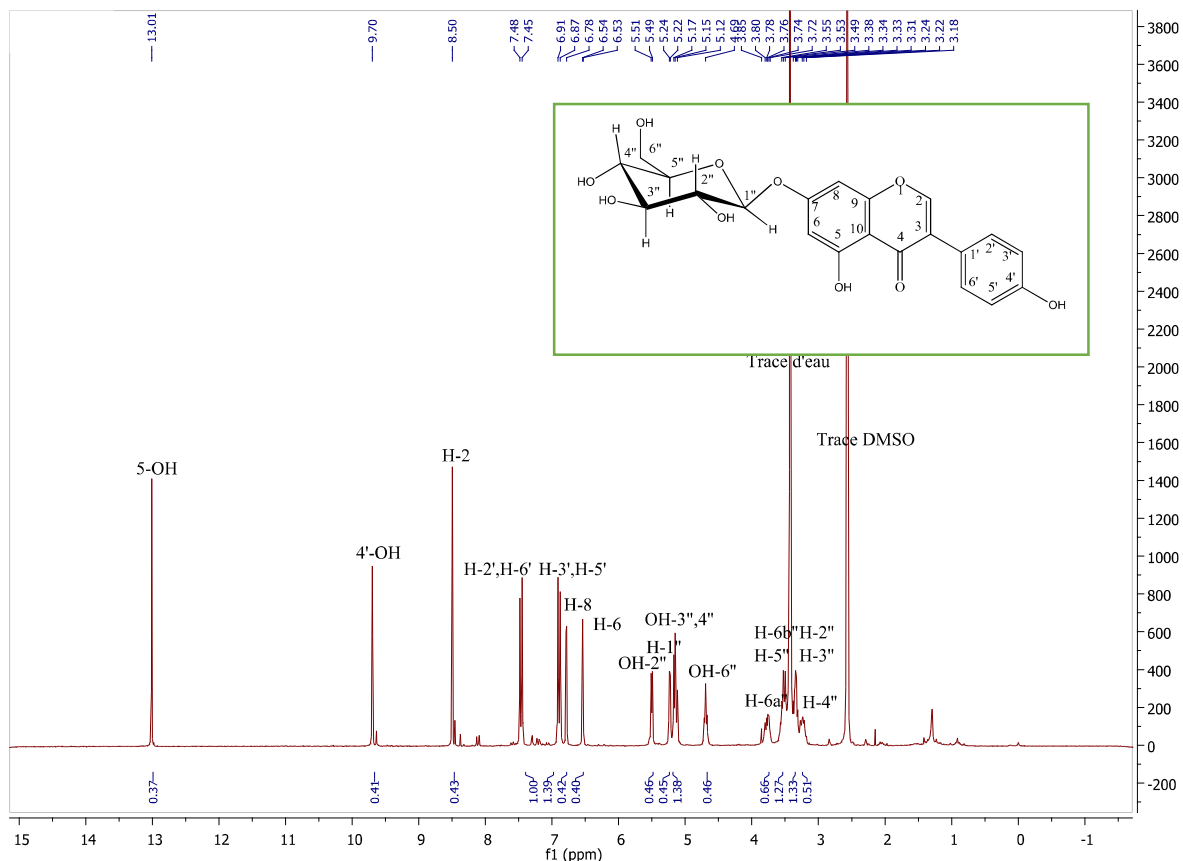
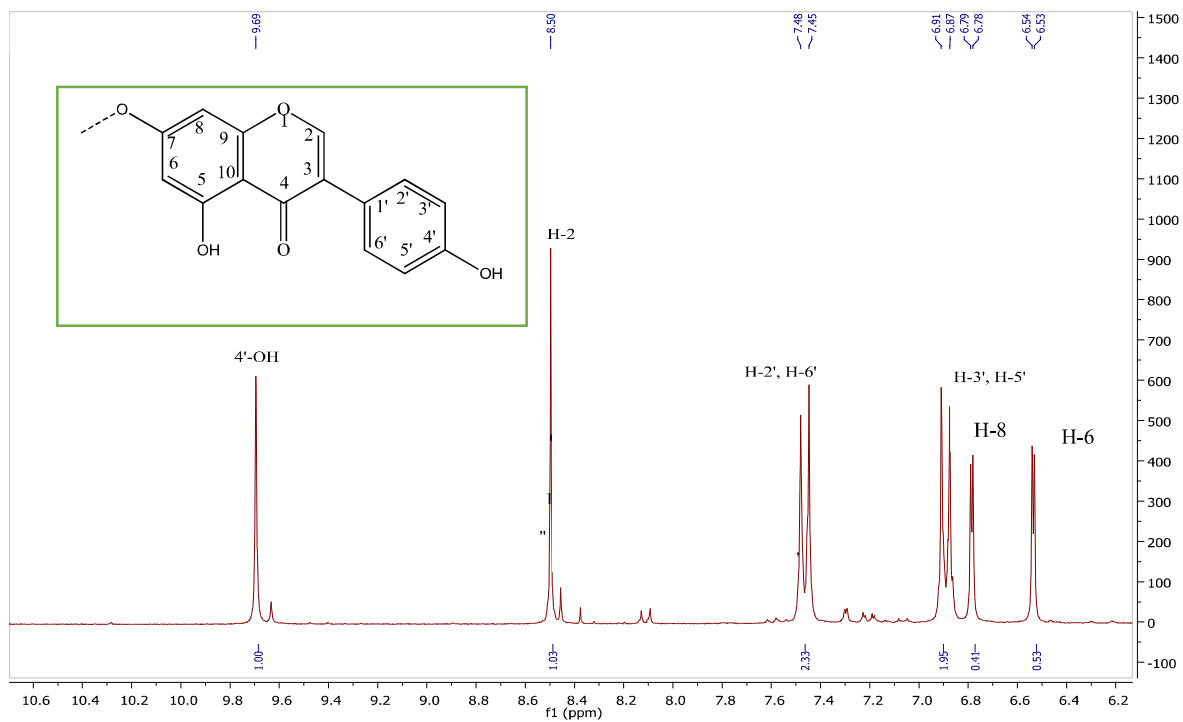
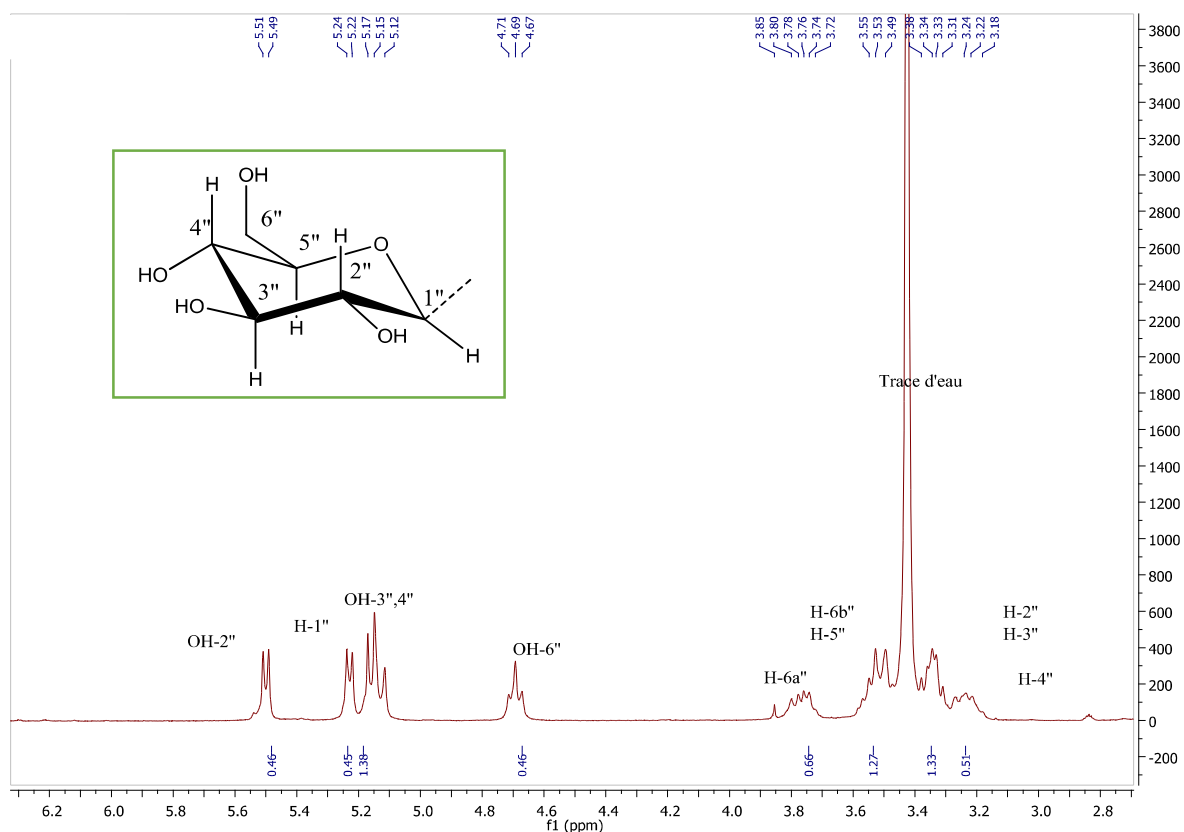


Figure 35 a : Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 4 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.



35 b : L'étalement de spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 4 entre (6.4-8.9 ppm) enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure 35 c :** L'étalement de spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 4 entre (3.2-5.6ppm) enregistré dans DMSO- $d_6$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 (Figure 36, 37) confirme les données des analyses précédentes de RMN  $^1\text{H}$ , 18 signaux sont distingués :

- Cinq carbones quaternaires ; le premier situé à 122.5 ppm correspondant au carbone C-3, un autre à 121.5 ppm attribué au carbone C-1'. Un carbone à 163.1 ppm attribué au C-7. Les deux carbones C-9, C-10 situés à 156.8 et 106.2 ppm.
- Trois carbones oxygénés l'un de groupement carbonyle (C-4) à 180.4 ppm et deux à 161.7 – 145.1 ppm attribué aux C-5 et C-4'.
- Sept carbones aromatiques (C-H) du squelette isoflavonoïde, quatre de cycle B (C-2'et C-6'), (C-3' et C-5') situés à 130.5 – 115.4 ppm, et l'un attribué au C-2 à 154.8 ppm, deux carbones situés à 99.9- 94.5 ppm attribué aux C-6, C-8.
- Un carbone anomérique (C-1'') à 100.1 ppm.
- Quatre carbones du sucre C-5'', C-3'', C-2'', C-4'' situés à 77.5, 76.5, 73.2, 96.6 ppm.
- Un carbone de sucre  $\text{CH}_2$  en position 6 (C-6'') situé à 60.6.
  - ◆ Ces données permettent de confirmer la présence d'un sucre glucose.

Le spectre de DEPT 135 (Figure 37), permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones suivants : C-4', C- 2'et C- 6', C- 3' et C- 5', C-1'', C-6, C-8, C-5'', C-3'', C-2'', C-4'', C-6''. Tous les résultats des spectres <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT135 sont présentés dans le tableau 21.

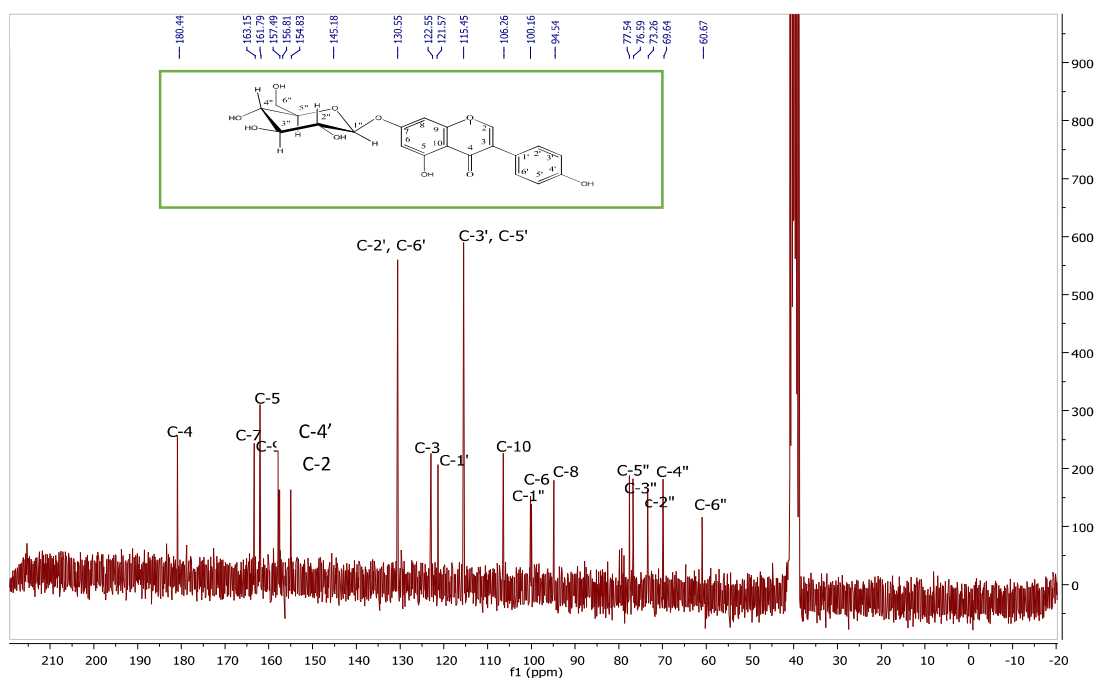


Figure 36 : Le spectre RMN <sup>13</sup>C du composé 4 enregistré dans DMSO-d6.

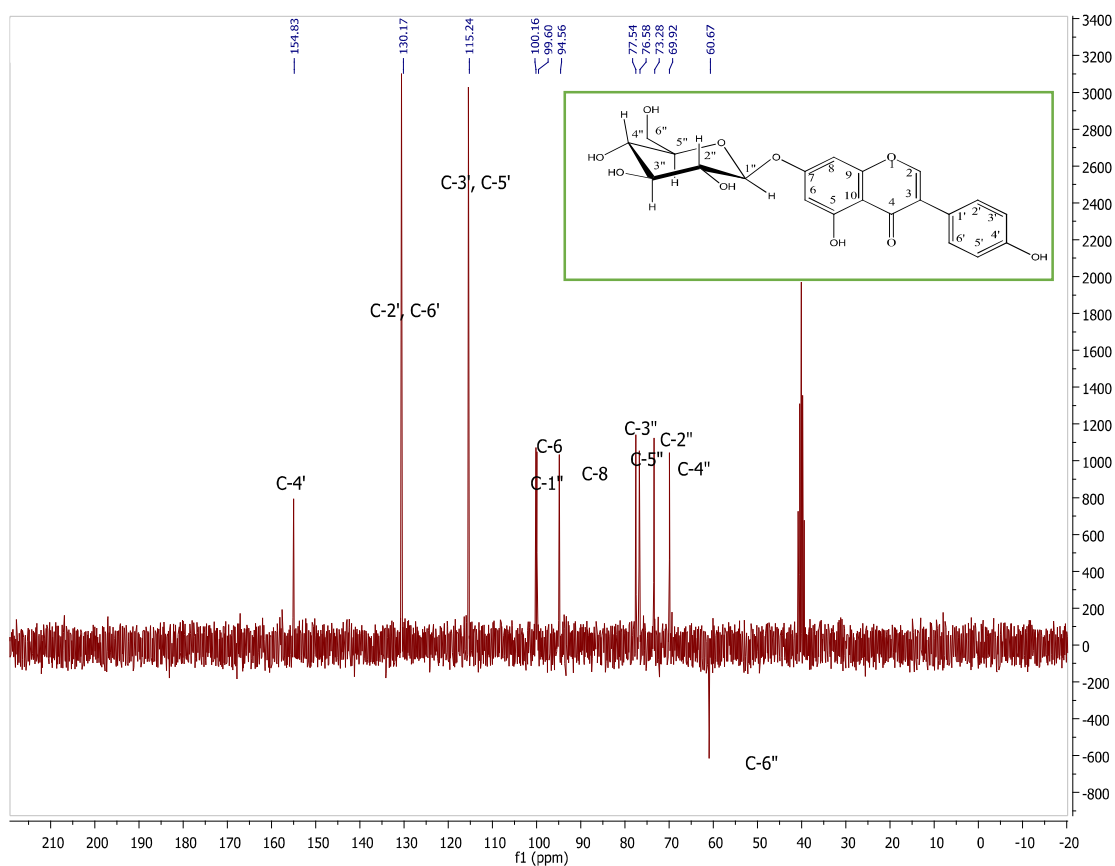


Figure 37 : Le spectre RMN DEPT 135 du composé 4 enregistré dans DMSO-d6.

L'étude du spectre de corrélation HMQC (Figure 38, Tableau 21) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à  $\delta = 156.8$  ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbones C-2' et C-6' permettant ainsi leurs localisations à 130.5 ppm. De même une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbones C-3' et C-5' permettant leurs localisations à 115.4 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-6, H-8 et les atomes de carbones C-6 et C-8 à 99.9 et 94.5 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-1'' et un atome de carbone en C-1'' à 100.1 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-5'' et un atome de carbone en C-5'' à 77.4 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-3'' et un atome de carbone en C-3'' à 76.2 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2'' et un atome de carbone qui est C-2'' à 73.7 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-4'' et un atome de carbone qui est C-4'' à 70.1 ppm.
- Deux taches de corrélation entre H-6a'', H-6b'' et un atome de carbone qui est C-6'' à 60.6 ppm.

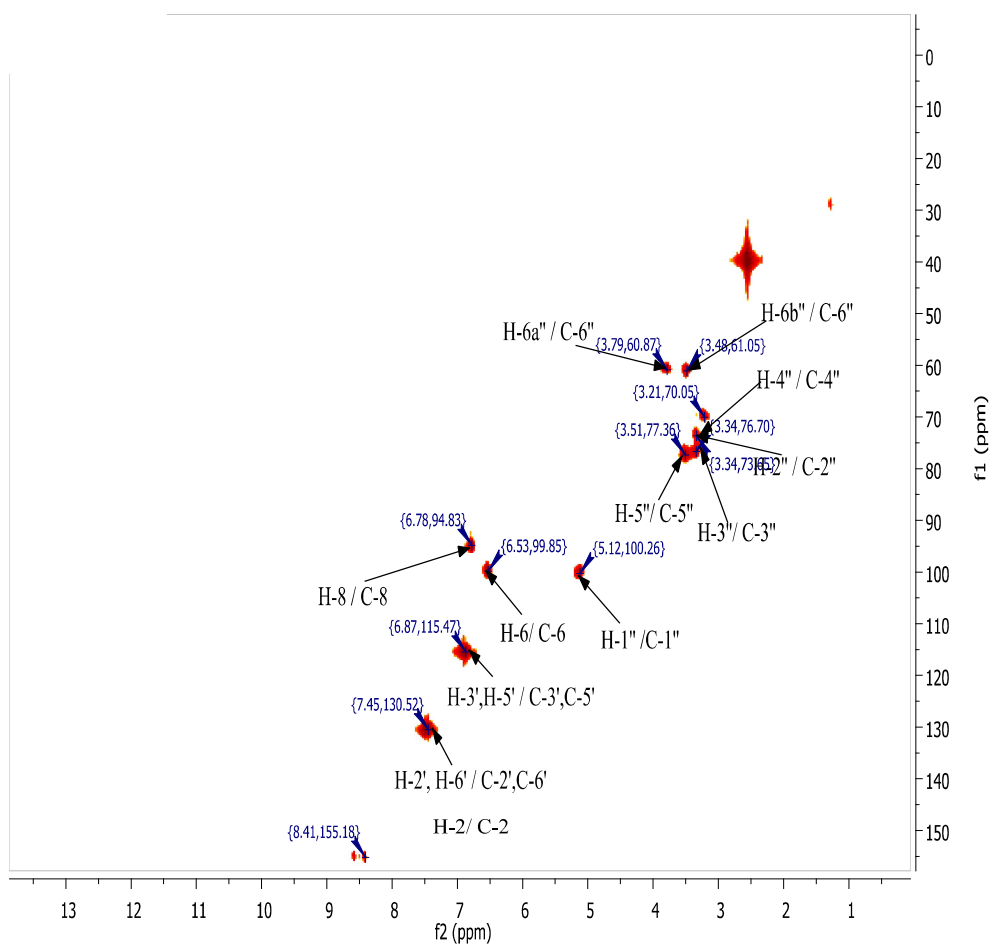
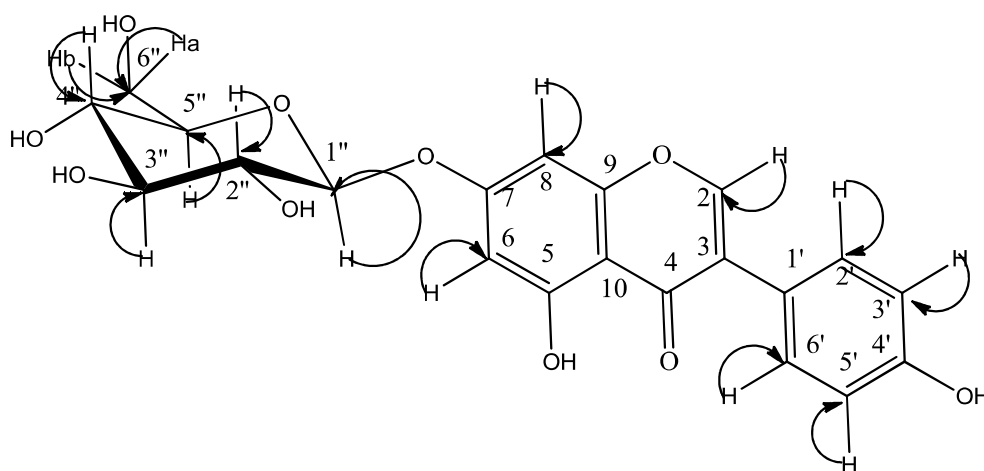


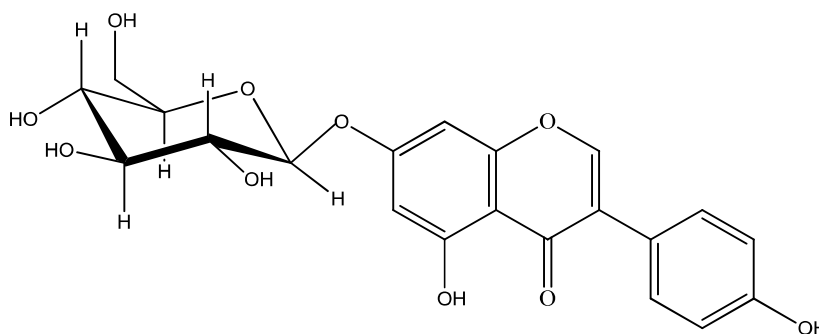
Figure 38: Le spectre HMQC du composé 4.

**Tableau 21:** Déplacements chimiques de RMN <sup>1</sup>H (250 MHz), RMN <sup>13</sup>C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) et RMN-2D HMQC du composé **4** dans DMSO.

Intégration	(m, J Hz)	Proton	$\delta_H$	Carbone	$\delta_C$	$\delta_{DEPT}$	HMQC(correlations <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C)
				C-4	180.4		
				C-7	163.1		
1H	s	5-OH		C-5	161.7		
				C-9	157.4		
1H	S	H-2	8.50	C-2	156.8	156.8	H-2/C-2
1H	S	4'-OH	9.69	C-4'	154.8		
2H	d, J = 7.5	H-2', H-6'	7.48	C-2', C-6'	130.5	130.5	H-2', H-6'/ C-2', C-6'
				C-3	122.5		
				C-1'	121.5		
2H	d, J = 7.5	H-3', H-5'	6.91	C-3', C-5'	115.4	115.4	H-3', H-5'/ C-3', C-5'
				C-10	106.2		
1H	d, J = 5	H-1''	5.24	C-1''	100.1	100.1	
1H	d, J = 2.5	H-6	6.54	C-6	99.9	99.9	H-6/ C-6
1H	d, J = 2.5	H-8	6.79	C-8	94.5	94.5	H-8/ C-8
2H	m	H-5'' ; H-6b''	3.57-3.49	C-5''	77.5	77.5	H-5''/ C-5''
2H	m	H-2'', H-3''	3.38-3.31	C-3''	76.5	76.5	H-3''/ C-3''
2H	m	H-2'', H-3''	3.38-3.31	C-2''	73.2	73.2	H-2''/ C-2''
1H	m	H-4''	3.27-3.18	C-4''	96.6	96.6	H-4''/ C-4''
1H	m	H-6a''	3.85-3.74	C-6''	60.6	60.6	H-6a'', H-6b''/ C-6''
1H	d, J = 7.5	OH-2''	5.51				
2H	m	OH-3''; OH-4''	5.17-5.11				
1H	t, J = 2.5-5	OH-6''	3.71				



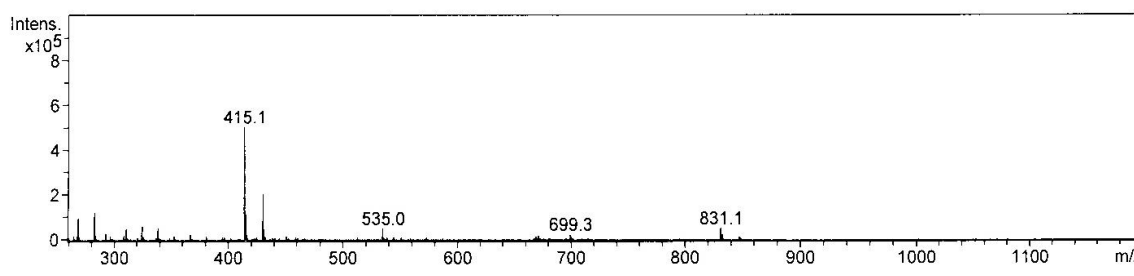
Toute ces analyses spectrale permet d'attribuer la structure du composé 4 (**Genistin** : Genistein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside) (Figure 39). Ces données sont identique à celles indiquées par la littérature [10, 11].



**Figure 39** : Structure de **Genistin** : Genistein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside.

### III.1.3.5. Détermination structurale du composé 5 :

Le composé 5 présente une formule brute en  $C_{21}H_{20}O_9$ . Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 40) réalisé en électrospray (ESI) en mode négatif, qui montre un pic pseudo moléculaire  $[M - H]^+$  correspondant à une masse moléculaire égale  $m/z = 415.1$  [4].



**Figure 40**: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 5.

Les données de la série spectrale UV (Figure 41, Tableau 22) montrent :

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 305 nm confirmant le squelette de type isoflavone et la bande II à 260 nm ainsi que la fluorescence orange sous lumière de Wood.
- L'absence de déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un O-R libre en position 7.
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande II enregistré après addition de  $AlCl_3 + HCl$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme l'absence d'un OH libre en position 5.
- Pas de déplacement bathochrome de la bande II en comparant les spectres NaOAc+ $H_3BO_3$  et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système *orthodi*-OH sur le noyau A.

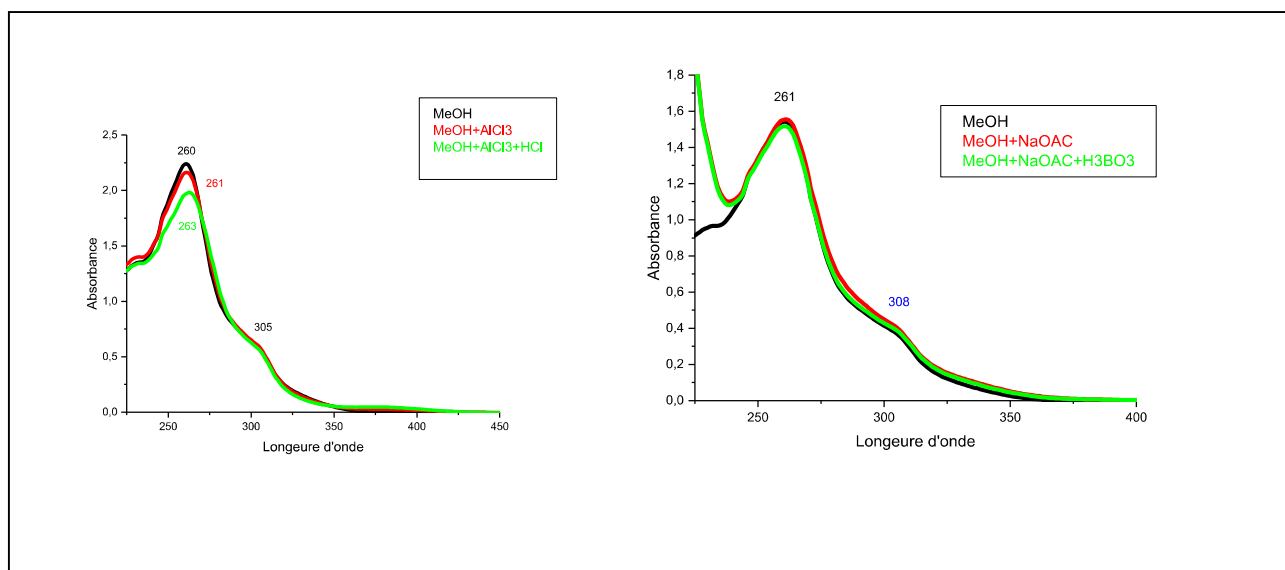


Figure 41: La série UV-Visible du composé 5.

Tableau 22 : Donnée de la série UV-Visible du composé 5.

Réactifs	Bande I $\lambda_{max}$ (nm)	Bande II $\lambda_{max}$ (nm)	Interprétation
MeOH	305 (épaulement)	260	Isoflavone
NaOAc	308	261	O-R libre en 7
NaOAc+ H3BO3	308	261	-
AlCl3	305	261	-
AlCl3+HCl	305	263	Absence OH libre en 5

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H du composé 5 (figure 42 a, b et c) révèle la présence de 15 protons parmi eux, quelques protons résonants entre 5.13 et 3.16 ppm indiquent la présence d'une molécule de sucre glucose.

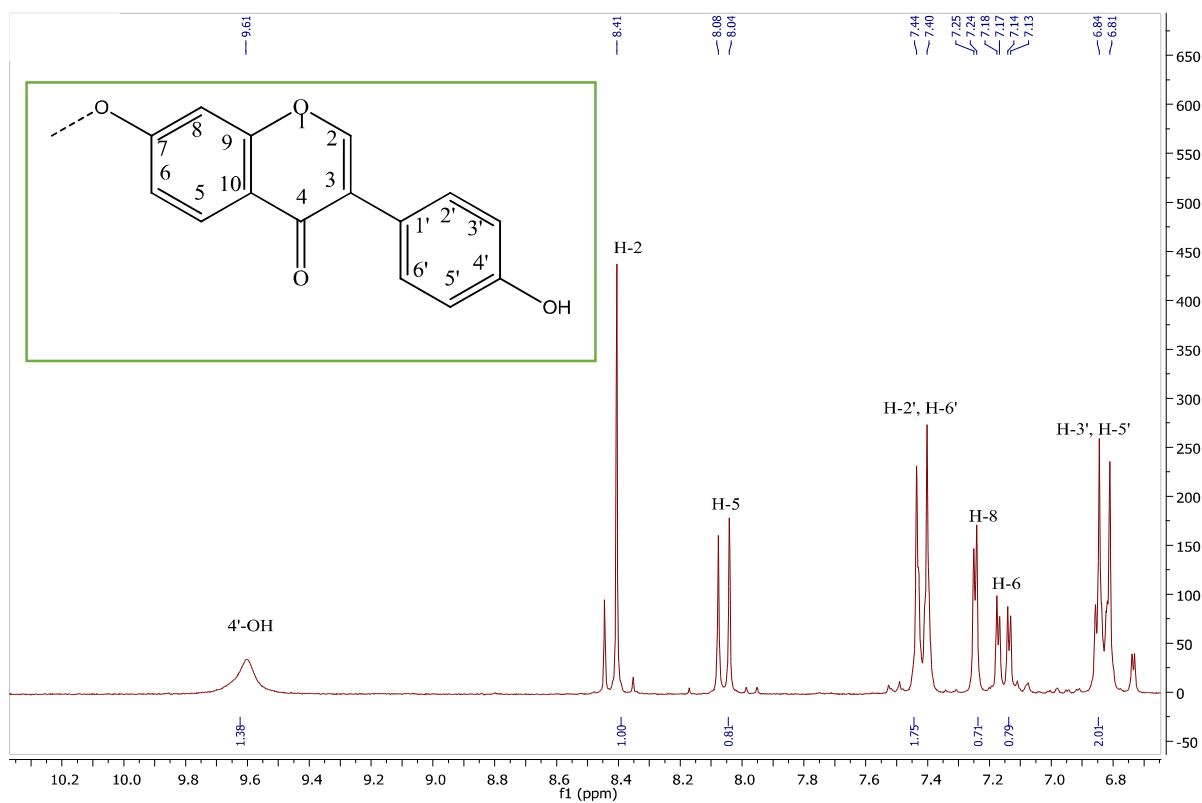
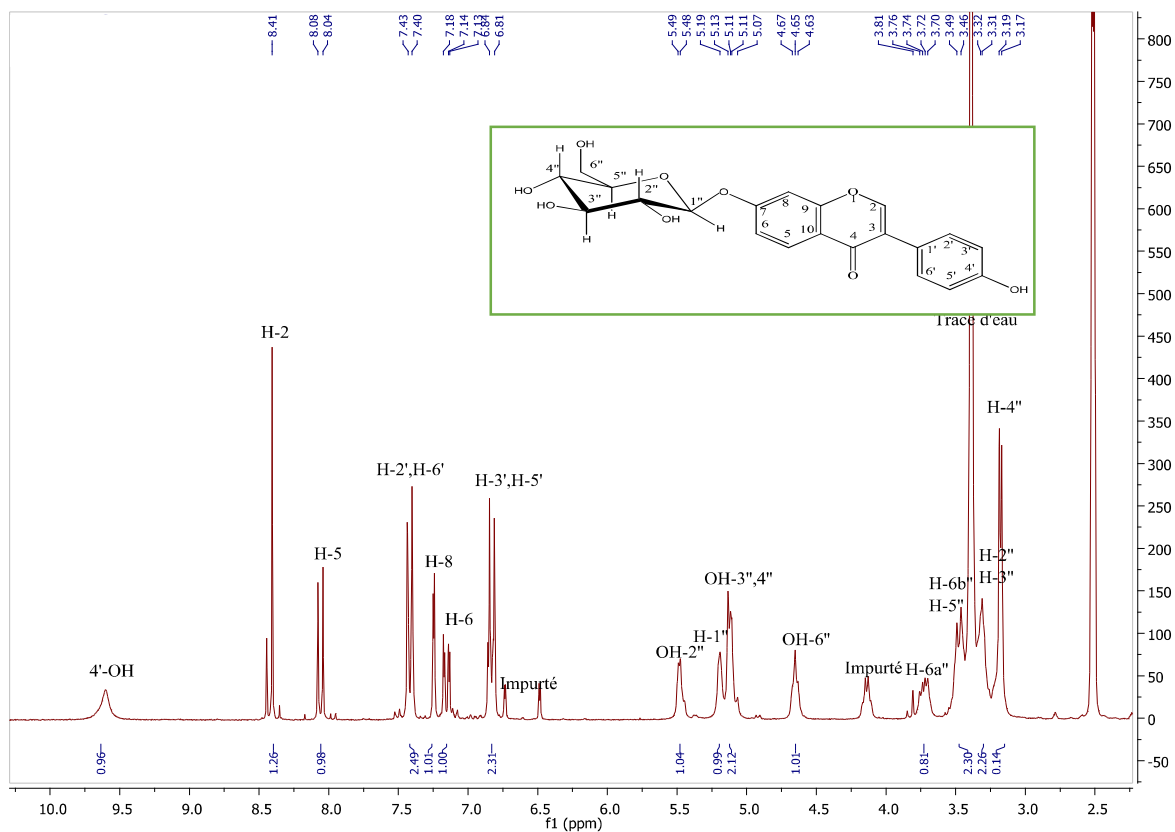
L'étude du spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 5 permet de tirer les indications suivantes :

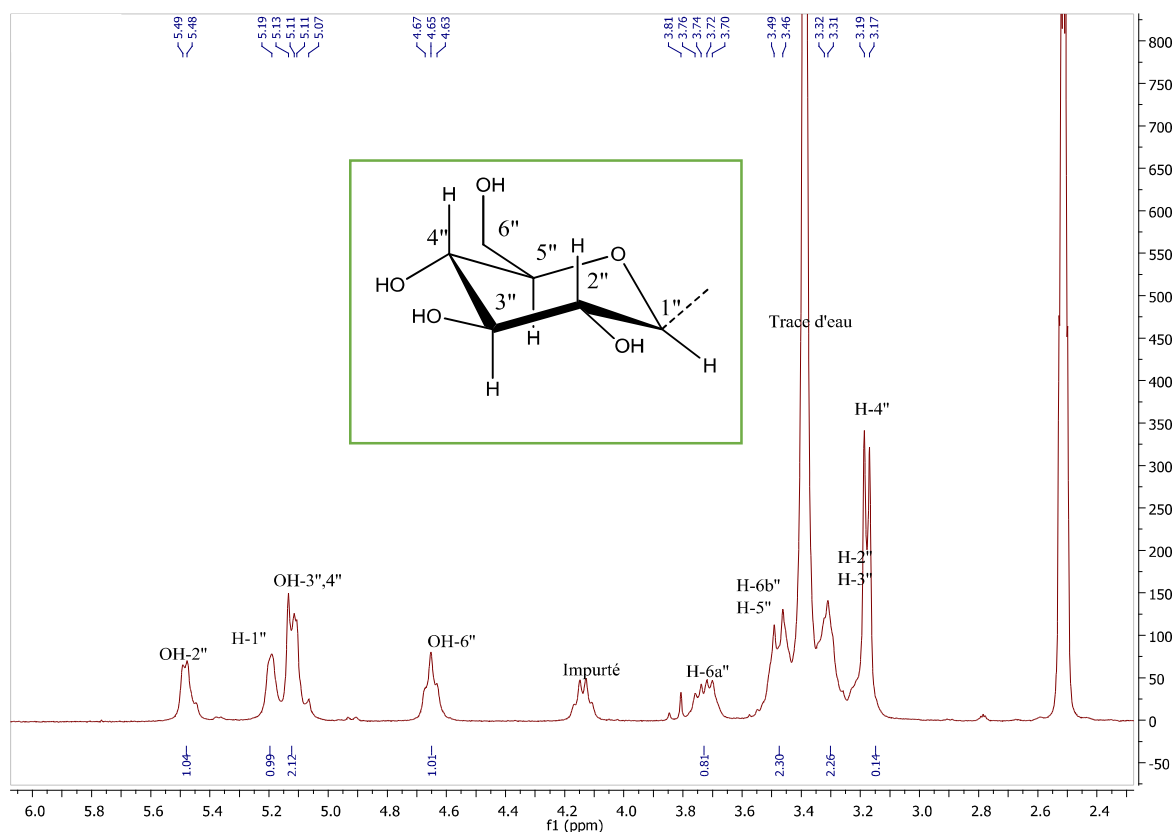
- Deux singulets d'intégration 1H à 9.61 et 8.41 ppm attribuables à 4'-OH et H-2, respectivement, le dernier caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à 7.44 et à 6.84 ppm ( $J = 7.5$  Hz) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, indiquant une substitution *para* du cycle B.
- Deux doublets d'intégration 1H situés à (8.08,  $J = 7.5$  Hz) et (7.25,  $J = 2.5$  Hz) ppm attribuables à H-5 et H-8.

- Un double de doublet d'intégration 1H situé à 7.16 ppm, ( $J= 2.5, 7.5$  Hz) attribuables à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H situé à 5.11 ppm ( $J= 5$  Hz) attribuable au proton anomérique de sucre glucose (H-1'').
- Un doublet d'intégration 1H situé à 5.48 ppm, ( $J= 7.5$  Hz) attribuable au proton de groupement hydroxyle de sucre glucose (OH-2'').
- Un multiplet d'intégration 2H situé entre 5.10-5.07 ppm attribuables aux protons des groupements hydroxyles de sucre glucose (OH-3'', OH-4'').
- Un triplet d'intégration 1H situé à 4.67 ppm, ( $J= 2.5-5$  Hz) attribuables aux protons des groupements hydroxyles de sucre glucose (OH -6'').

Les valeurs des constantes de couplage sont caractéristiques de couplages vicinaux de protons du groupement hydroxyles avec des groupements CH. Ces observations orientent vers la présence de quatre groupements hydroxyles dans l'entité sucre.

- Un multiplet d'intégration 1H situé entre 3.81-3.70 ppm attribuable au proton de sucre glucose (H-6a'').
- Un Doublet d'intégration 2H situé à 3.49 ppm, ( $J=7.5$  Hz) attribuables aux protons de sucre glucose (H-6b'', H-5'').
- Un multiplet d'intégration 2H situé à 3.31-3.32 ppm attribuables aux protons de sucre glucose (H-2'', H-5'').
- Un doublet d'intégration 1H situé à 3.18 ppm, ( $J= 7.5$ ) attribuable au proton de sucre glucose (H-4'').





**Figure 42 c:** Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé 5 (3-5.6 ppm) enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

Le spectre RMN <sup>13</sup>C et DEPT 135 (Figure 43, 44) confirme les données des analyses précédentes de RMN <sup>1</sup>H, 18 signaux sont distingués.

- Quatre carbones quaternaires ; le premier situés à 122.8 ppm attribué au carbone C-3, un autre à 124.5 ppm attribué au carbone C-1'. Les deux carbones C-9, C-10 situés à 157.7 et 115.9 ppm.
- Un carbone de groupement carbonyle (C-4) à 175.1 ppm.
- Un carbone à 157.4 ppm attribué au C-4'.
- Huit carbones (C-H) du squelette isoflavonoïde, quatre de cycle B (C-2'et C-6'), (C-3' et C-5') situés à 130.5 et 115.3 ppm respectivement, et l'un en position 2 (C-2) à 153.4 ppm, et trois autres carbones en position 5, 6 et 8 (C-5, C-6, C-8) situés à 127.2, 115.5 et 102.9 ppm respectivement.
- Un carbone anomérique (C-1'') à 100.2 ppm.
- Quatre carbones du sucre C-5'', C-3'', C-2'', C-4'' situés à 77.5, 76.5, 73.2, 69.9 ppm.
- Un carbone situé à 60.8 ppm attribué au C-6''.

Le spectre de DEPT 135 du composé 5 (Figure 44), permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones suivants : C-2, C- 2'et C- 6', C- 3' et C- 5', C-1'', C-6, C-8, C-5'', C-

3'', C-2'', C-4'', C-6''. Tous les résultats des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT135 sont présentés dans le tableau 23.

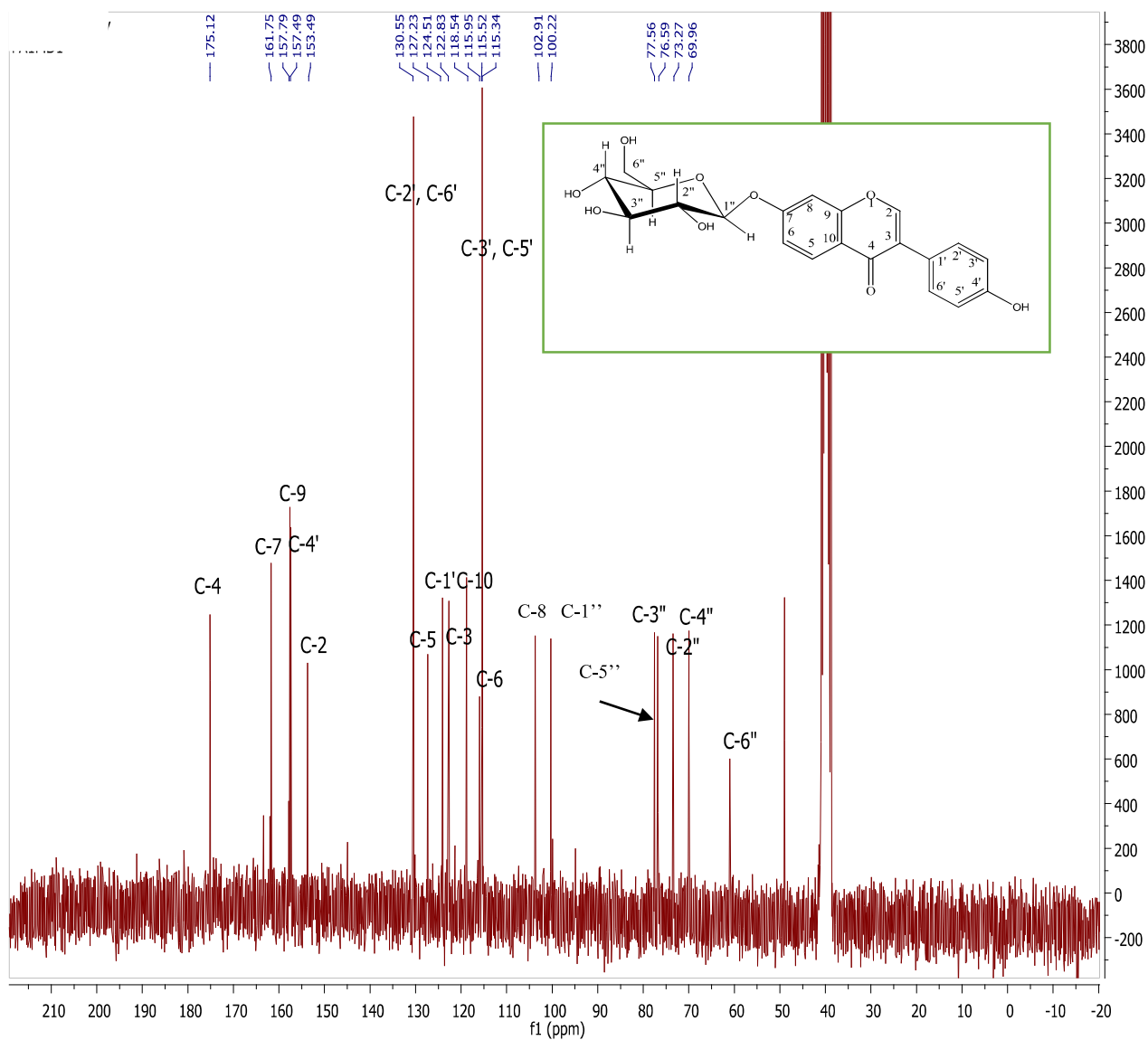
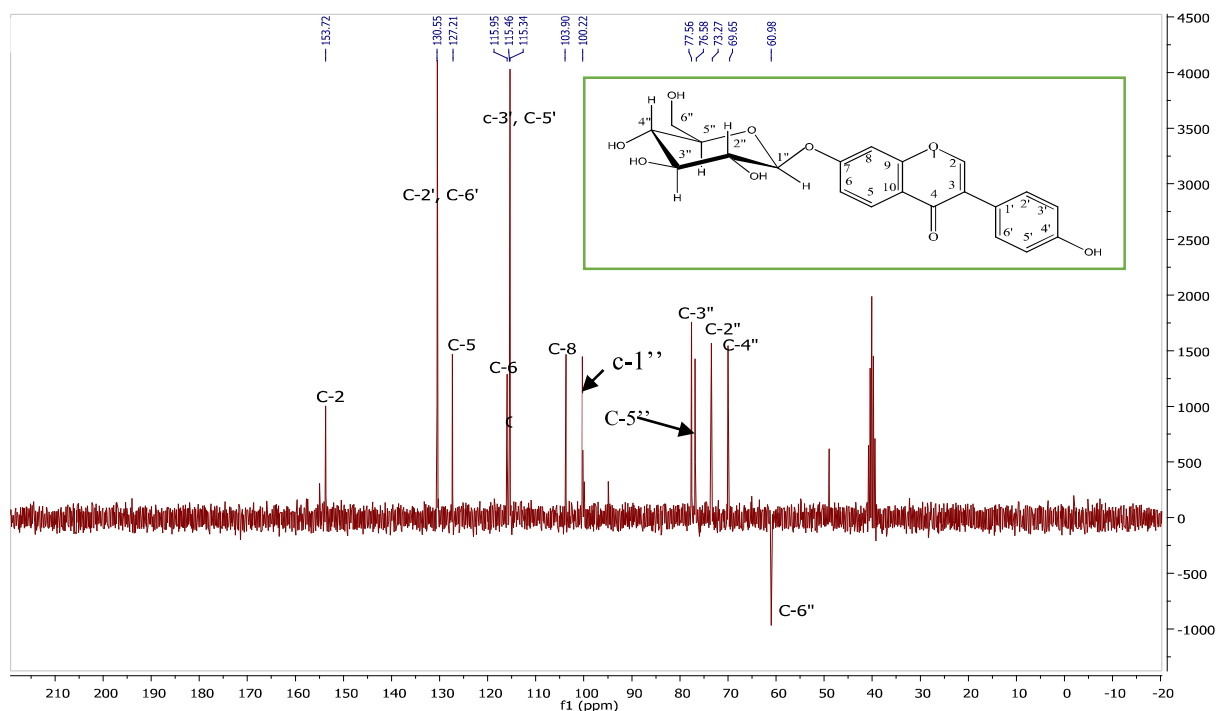


Figure 43: Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 5 enregistré dans DMSO-d6.



**Figure 44:** Le spectre RMN DEPT 135 du composé 5 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub>.

L'étude du spectre de corrélation HMQC (Figure 45, Tableau 23) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à 153.4 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes de carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leurs localisations à 130.5 ppm. De même une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leurs localisations à 115.3 ppm.
- Une tache de corrélation avec H-6 et H-8 permet l'attribution de C-6 et C-8 à 115.5 et 102.9 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-1'' et un atome de carbone qui est C-1'' à 100.2 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-5'' et un atome de carbone en C-5'' à 77.5 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-3'' et un atome de carbone en C-3'' à 76.5 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2'' et un atome de carbone qui est C-2'' à 73.2 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-4'' et un atome de carbone qui est C-4'' à 69.9 ppm.
- Deux taches de corrélation entre H-6a'', H-6b'' et un atome de carbone qui est C-6'' à 60.8 ppm.

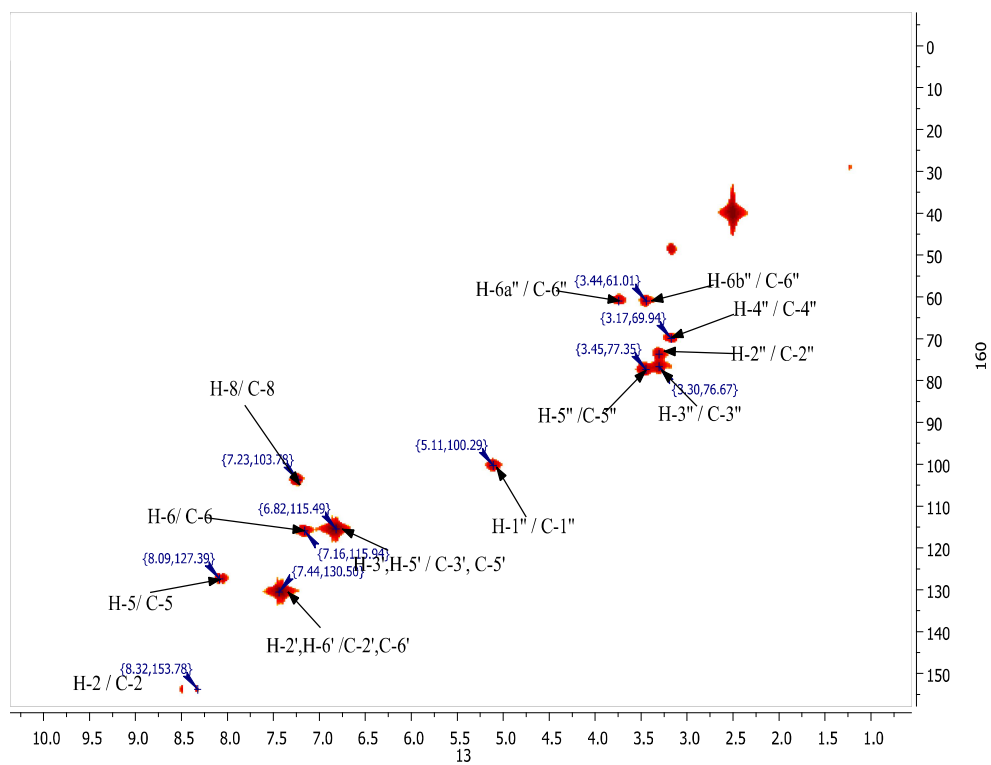
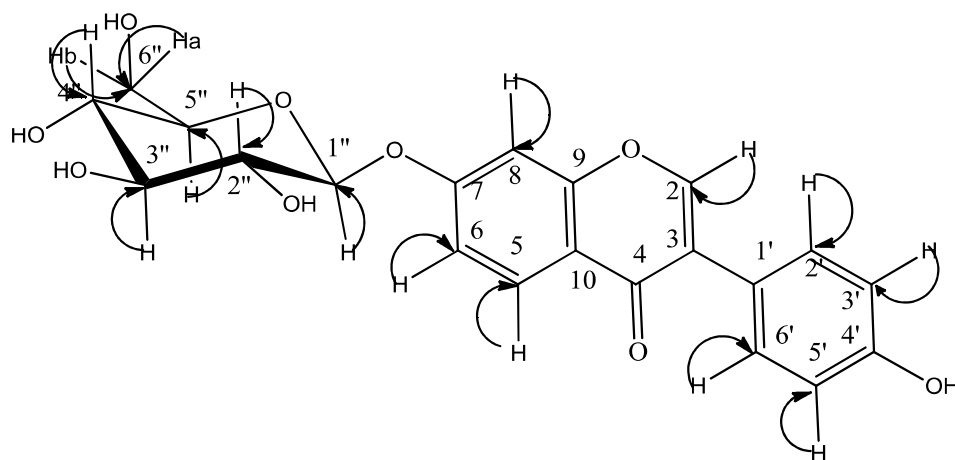


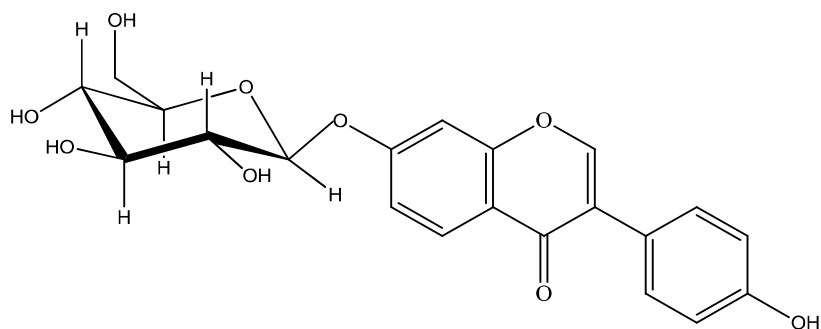
Figure 45 : Le spectre HMBC du composé 5.



**Tableau 23:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (250 MHz), RMN <sup>13</sup>C (63 MHz) et DEPT 135(63 MHz) du composé **5** dans DMSO.

Intégration	( <i>m</i> , <i>J</i> Hz)	Proton	$\delta_H$	Carbone	$\delta_C$	$\delta_{DEPT}$	HMQC(correlations <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C)
				C-4	180.4		
				C-7	163.1		
1H	d, <i>J</i> = 7.5	H-5	8.08	C-5	161.7		
				C-9	157.4		
1H	s	H-2	8.41	C-2	156.8	156.8	H-2/C-2
1H	s	4'-OH	9.61	C-4'	154.8		
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-2', H-6'	7.44	C-2', C-6'	130.5	130.5	H-2', H-6'/ C-2', C-6'
				C-3	122.5		
				C-1'	121.5		
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-3', H-5'	6.84	C-3', C-5'	115.4	115.4	H-3', H-5'/ C-3', C-5'
				C-10	106.2		
1H	d, <i>J</i> = 5 Hz	H-1''	5.11	C-1''	100.2		
1H	d, <i>J</i> = 2.5	H-6	7.18	C-6	99.9	99.9	H-6/ C-6
1H	d, <i>J</i> = 2.5	H-8	7.25	C-8	94.5	94.5	H-8/ C-8
2H	m	OH-3'',OH-4''	5.10-5.06	C-5''	77.5	77.5	
2H	d, <i>J</i> = 7.5	H-5'', H-6b''	3.49	C-3''	76.5	76.5	
2H	m	H-2'', H-3''	3.31	C-2''	73.2	73.2	
1H	d, <i>J</i> =5	H-4''	3.18	C-4''	69.6	69.6	
1H	m	H-6a''	3.81-3.70	C-6''	60.8	60.8	
1H	d, <i>J</i> = 7.5	OH-2''	5.48				
3H	m	OH-3'',OH-4''	5.10-5.06				
1H	t, <i>J</i> = 2.5-5	OH-6''	4.67				

Toute ces analyses spectrale permet d'attribuer la structure du composé 5 (**Daidzin** : Diadzein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside) (Figure 46). Ces données sont identique à celles indiquées par la littérature [6].



**Figure 46** : Structure de **Daidzin** : Diadzein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside.

## III.2. INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DU *JURINEA HUMILIS*

### DC.

#### III.2.1. Chimie extractive

##### III.2.1.1. Matériel végétal :

Nous avons pris en considération toutes les parties de la plante (aériennes, tiges et racines). L'opération de séchage est effectuée à l'ombre, et loin de l'humidité, la masse de la plante était de 275g.

##### III.2.1.2. Extraction :

- **Extraction solide-liquide**

Après le broyage de la plante (275 g), la matière végétale est obtenue après une macération dans une solution (Eau : Méthanol; 30/ 70 ; 3 fois), elle dure à chaque fois 24 heures.

Les solutions obtenues sont alors filtrées et évaporées sous vide à (35-50) °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, l'extrait hydroalcoolique obtenu est dilué avec 300 ml d'eau distillée (à raison de 1 litre pour 1 kg de matière sèche), la solution est laissée une nuit puis filtrée (Figure 47).

Cette filtration permettant d'éliminer les graisses, les résines, la chlorophylle et les impuretés.

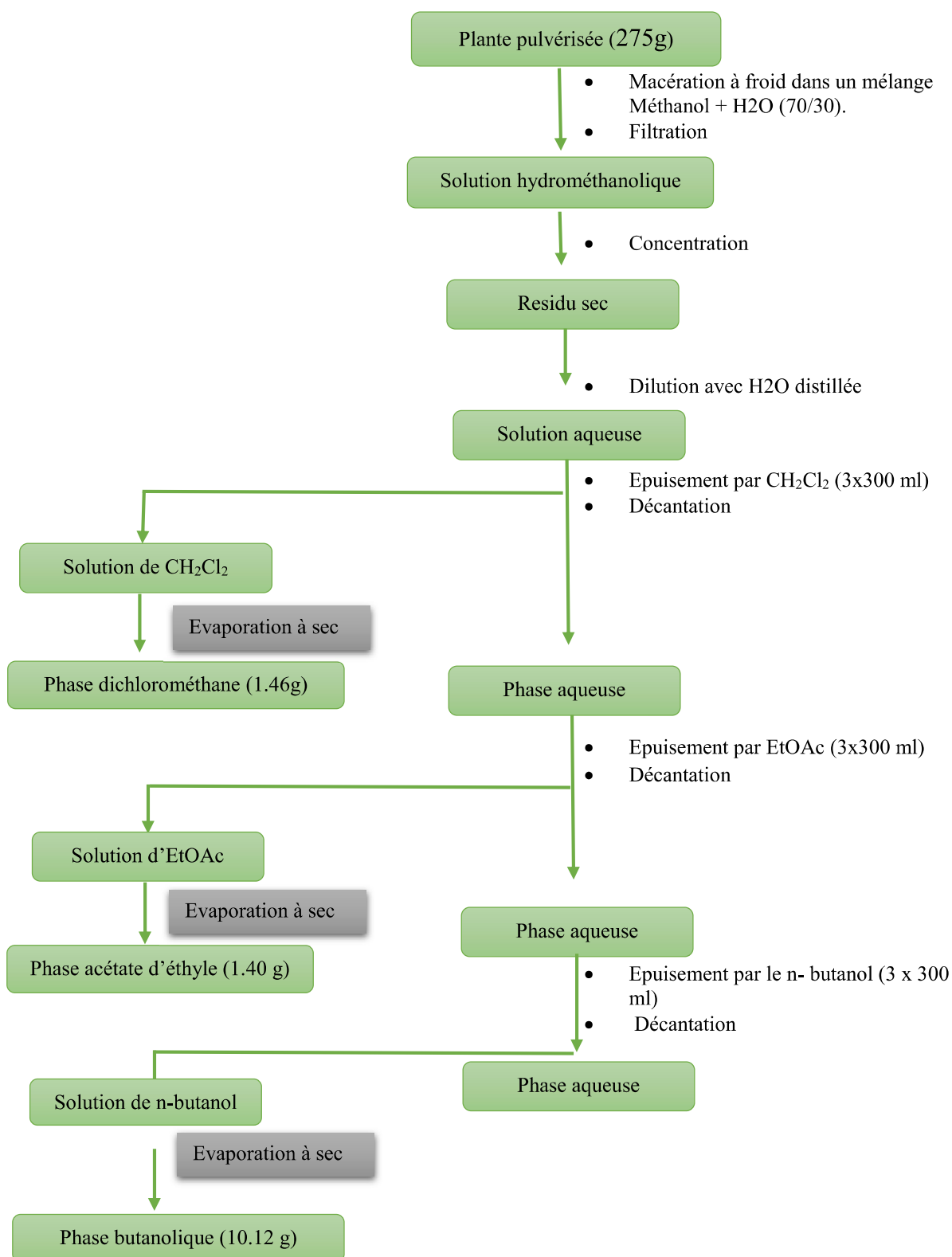
- **Extraction liquide-liquide**

Après filtration, la solution devenue brune a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

- **Le dichlorométhane** : solvant préférentiel pour l'extraction des composés apolaires tel que les terpènes et les acides gras.
- **L'acétate d'éthyle** : utilisé pour extraire les composés moyennement polaires tel que les acides phénoliques, flavonoïdes aglycones et mono-glucosides
- **Le *n*-butanol** : cette extraction entraîne le reste des composés polaires tel que les flavonoïdes di-*O*-glycosides, tri-*O*-glycosides et les *C*-glycosides

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant sont mélangés vigoureusement en dégageant à chaque fois les gaz formés. La première décantation reste une nuit pour extraire le maximum des produits, les deux autres reposent à chaque fois une heure. Les phases récupérées, sont évaporées à sec à basse température pour les deux phases : dichloro-méthane et acétate d'éthyle. La phase *n*-butanol est concentrée. Les phases finales sont toutes reprises dans le méthanol, pour voir leurs profils chromatographiques.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 47 :



**Figure 47:** Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes et les racines de *Jurinea Humilis DC*.

Les trois phases organiques ainsi obtenus (dichlorométhane, acétate d'éthyle, n-butanol) sont concentrées à sec sous pression réduite, le tableau 24 suivant regroupe la pesée de chaque extrait :

**Tableau 24 :** Les masses des extraits du *jurinea humilis* DC.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)
275 g	Dichlorométhane	1.46
	Acétate d'éthyle	1.40
	<i>n</i> -butanol	10.12

**III.2.2. Purification :**

**III.2.2.1. Traitement de l'extrait butanolique :**

2 g de l'extrait butanolique sont dissous dans le minimum d'éthanol et mélangée à une petite quantité de polyamide. L'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée en haut d'une colonne de polyamide préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-éthanol, commençant par le toluène pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive de méthanol.

Des fractions de 100 ml sont recueillies (tableau 25) :

**Tableau 25:** Résultats du fractionnement de l'extrait butanolique.

Lot de fraction	Toluène %	EtOH %
1-4	100	0
5-7	95	5
8-14	90	10
15-23	80	20
24-30	70	30
31-37	60	40
38-43	50	50
44-50	40	60
51-53	0	100

Les fractions sont analysées par chromatographie analytique sur couche mine de gel de silice avec différent systèmes d'élutions, les plaques CCM sont visualisées sous lumière UV (254-

365nm).selon les résultats donnés par ces plaques CCM, nous avons pu regrouper les fractions qui ont les mêmes compositions et le tableau 25 résume le regroupement des fractions de la colonne.

- **Etude des fractions sélectionnées**

Après l’analyse des fractions par la chromatographie sur couche mince de gel de silice, nous avons essayé d’étudier les fractions F7, F8 et F10

- **Etude de la fraction F7 :**

La fraction F7 a été purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le méthanol comme éluant ; Le suivi des sous fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince de Gel de silice, les résultats sont reportés sur le tableau 26 :

**Tableau 26 :** Regroupement des sous fractions de la colonne de Sephadex LH 20

Systeme d’élution	Lot	N° des sous fraction
MeOH	1-3	F <sub>7,1</sub>
	3-4	F <sub>7,2</sub>
	5-13	F <sub>7,3</sub>
	11-12	F <sub>7,4</sub>
	14-15	F <sub>7,5</sub>
	16-20	F <sub>7,6</sub>

- **Etude de la fraction F8 :**

La fraction F8 contient un précipité jaune qui a été isolé et lavé plusieurs fois par le dichloro-méthane puis testé sur plaque analytique de gel de silice, Ce précipité donne une seule tâche avec une fluorescence noir-violette sous UV 365nm, soit le produit (P1).

- **Etude de la sous fraction F<sub>7,3</sub>**

Dans la sous fraction F<sub>7,3</sub> nous avons observé la formation d’un précipité jaune ;que nous avons isolé et lavé par le dichloro-méthane puis testé sur plaque analytique de gel de silice, Ce précipité donne une seule tache avec une fluorescence noir-violette sous UV 365nm, soit le produit (P2).

- **Etude de la fraction F10**

La fraction F10 (90 mg) a subi une séparation chromatographique sur colonne de gel de silice. L'éluion a été effectuée par le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dont on augmente progressivement la polarité par addition du méthanol, Conduisant à 10 sous fractions. La fraction 6 contient un précipité jaune qui a été isolé et lavé plusieurs fois par le dichloro-méthane puis testé sur plaque analytique de gel de silice, Ce précipité donne une seule tache avec une fluorescence noir-violette sous UV 365nm, soit le produit (P3).

L'ensemble des résultats de purification du l'extrait n-butanolique de l'espèce *J.humilis* révèle l'obtention de trois produits purs :

- Produit **P1 (5mg)** sous forme d'un **précipité jaune** de couleur **noire violette** sous UV à 365 nm
- Produit **P2 (9mg)** sous forme d'un **précipité jaune** de couleur **noire violette** sous UV à 365 nm
- Produit **P3 (10mg)** sous forme d'un **précipité jaune** de couleur **noire violette** sous UV à 365 nm

### III.2.3. Détermination structurale des produits obtenus :

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectrales RMN <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C; UV-Visible et les autres caractéristiques physicochimiques.

#### III.2.3.1 : Détermination structurale du composé P1:

La série spectrale UV tire les indications suivantes:

- Le spectre UV du produit P1 effectué dans le méthanol permet d'observer deux bandes d'absorption, l'une a  $\lambda=337$  nm et l'autre à  $\lambda=269$  nm indiquant qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +45$  nm) avec stabilité de l'intensité de l'absorbance indiquant la présence d'un groupe OH en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 324nm indique la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre pris dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7 ( $\Delta\lambda = +2$  nm).
- L'absence du déplacement bathochrome de la bande I en comparant les spectres NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et MeOH, ce qui prévoit l'absence de système *orthodi*-OH sur le noyau B.
- L'absence du déplacement hypochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl<sub>3</sub>+HCl et AlCl<sub>3</sub>, indique qu'il n'y a pas de groupement *orthodi*-OH sur le cycle B.

- Le déplacement bathochrome  $\Delta\lambda = +45$  nm de la bande I observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié (AlCl<sub>3</sub> +HCl), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- L'addition de AlCl<sub>3</sub>+HCl provoque un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +8$  nm), par rapport au spectre pris dans le MeOH, indiquant la présence d'un groupe OH en position 5.

Ces résultats obtenus sont représentés sur le tableau 27 et Figure 48 :

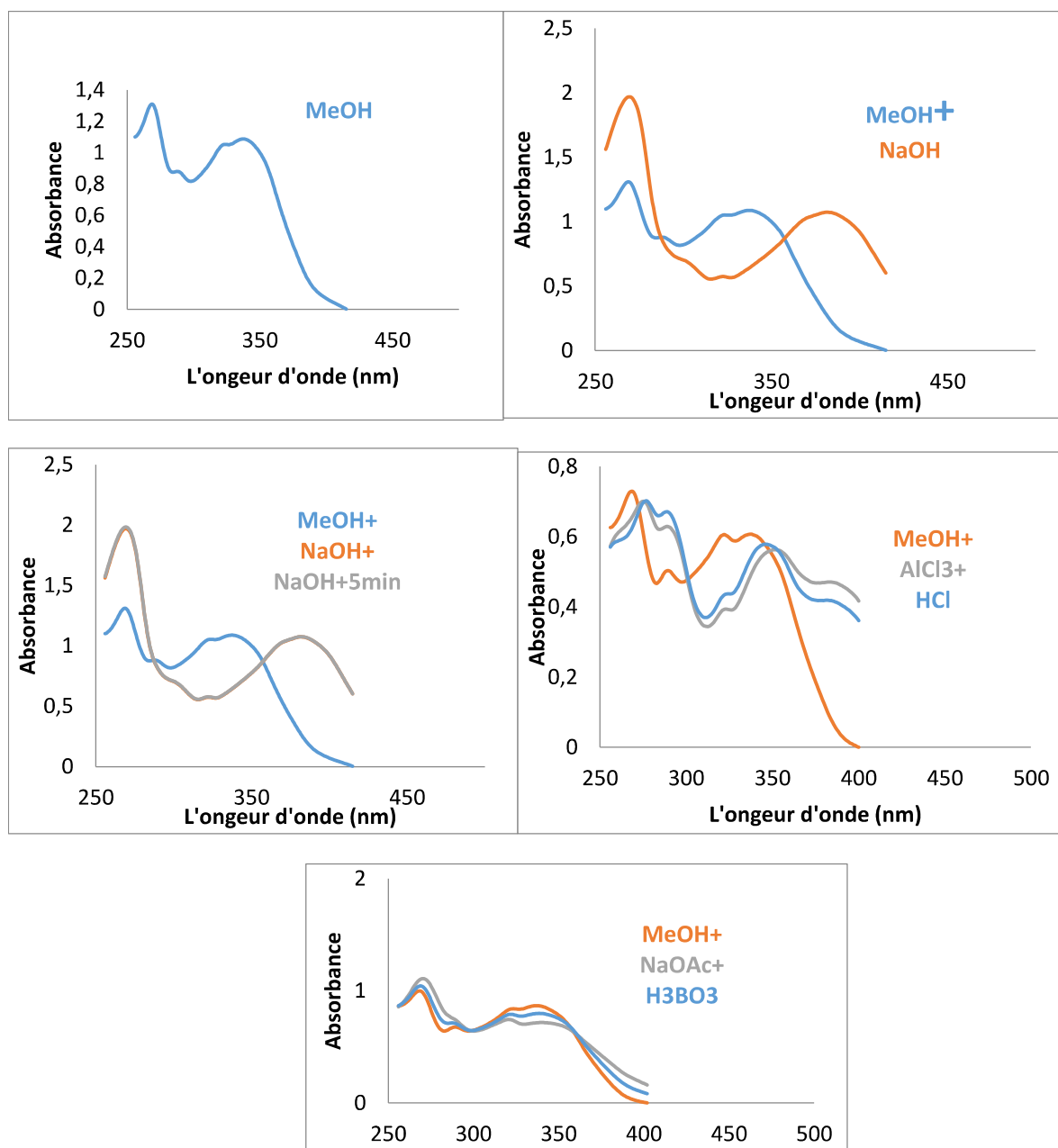


Figure 48 : Série spectrale UV-Visible du composé P1.



Tableau 27 : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P1.

Réactifs	Bande I $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Bande II $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Autres bandes $\lambda_{\max}(\text{nm})$
MeOH	337	269	-
NaOH	382	269	323
NaOAc	344	271	-
NaOAc+ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338	269	-
AlCl <sub>3</sub>	352	269	-
AlCl <sub>3</sub> +HCl	345	271	-
NaOH après 5 min		stable	

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub> (Figure 49 a, b) montre :

- Un doublet d'intégration 1H à 6,15 ppm ( $J= 1.9\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à 6,47 ppm ( $J= 1.9\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à 13 ppm attribuable au proton de 5-OH.

L'ensemble de ces 3 derniers signaux oriente vers une disubstitution du noyau A en position 5 et 7.

- Un doublet d'intégration 1H à 6.8 ppm ( $J= 1.9\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à 7.25 ppm ( $J= 8.4\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *ortho* attribuable à H-5'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à 7.55 ppm ( $J= 8.4\text{ Hz} ; J= 2.1\text{ Hz}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta avec H-2' et d'un couplage *ortho* avec H-5' attribuable à H-6.

L'ensemble de ces trois signaux orientent vers une disubstitution du noyau B en position 3' et 4'.

- Un doublet d'intégration 1H à 4.92 ppm ( $J= 7.1\text{ Hz}$ ), attribuable au proton anomérique d'un glucose en jonction  $\beta$ .
- Dans l'intervalle (3.00 – 3.80) ppm se trouvent les autres protons du sucre.

Les données relatives à la spectroscopie RMN<sup>1</sup>H sont rassemblées dans le Tableau 28 :

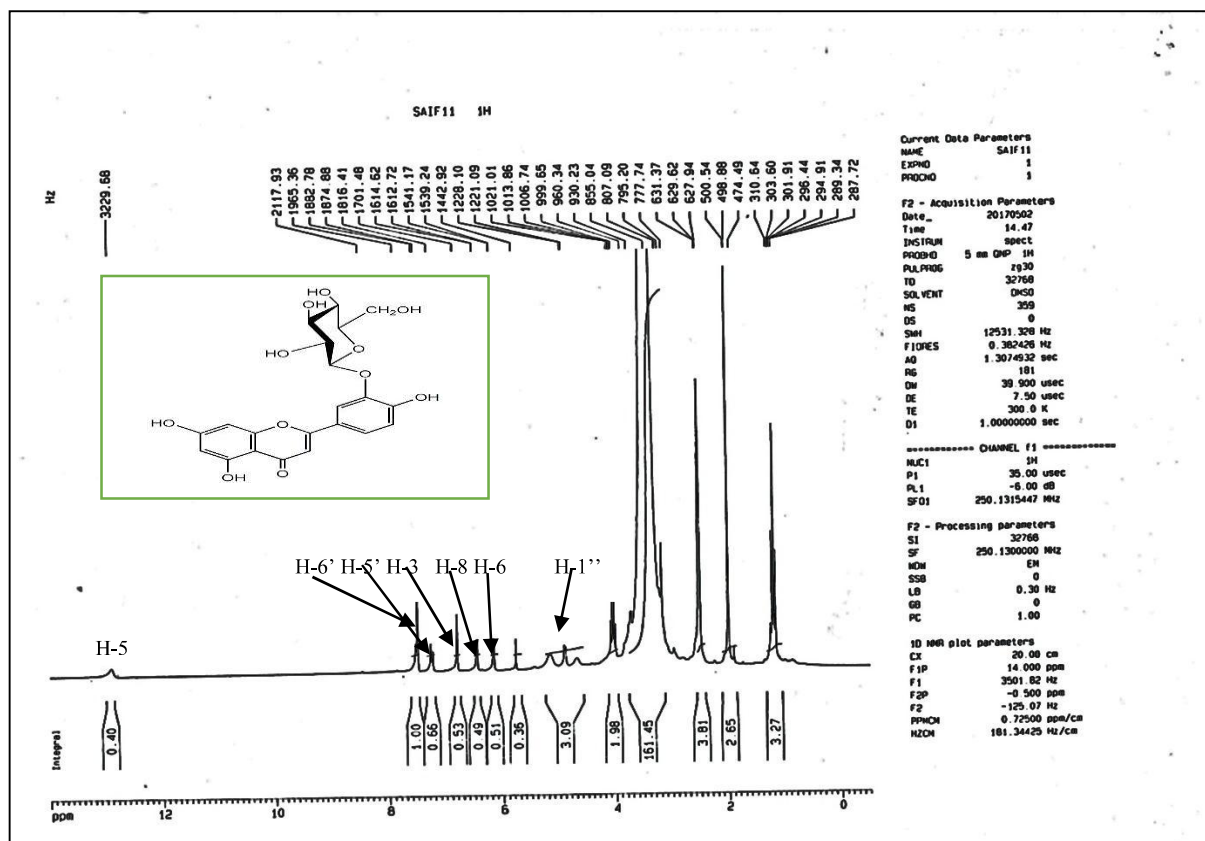


Figure 49 a : Le spectre RMN<sup>1</sup>H du composé P1 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub> à 250 MHz.

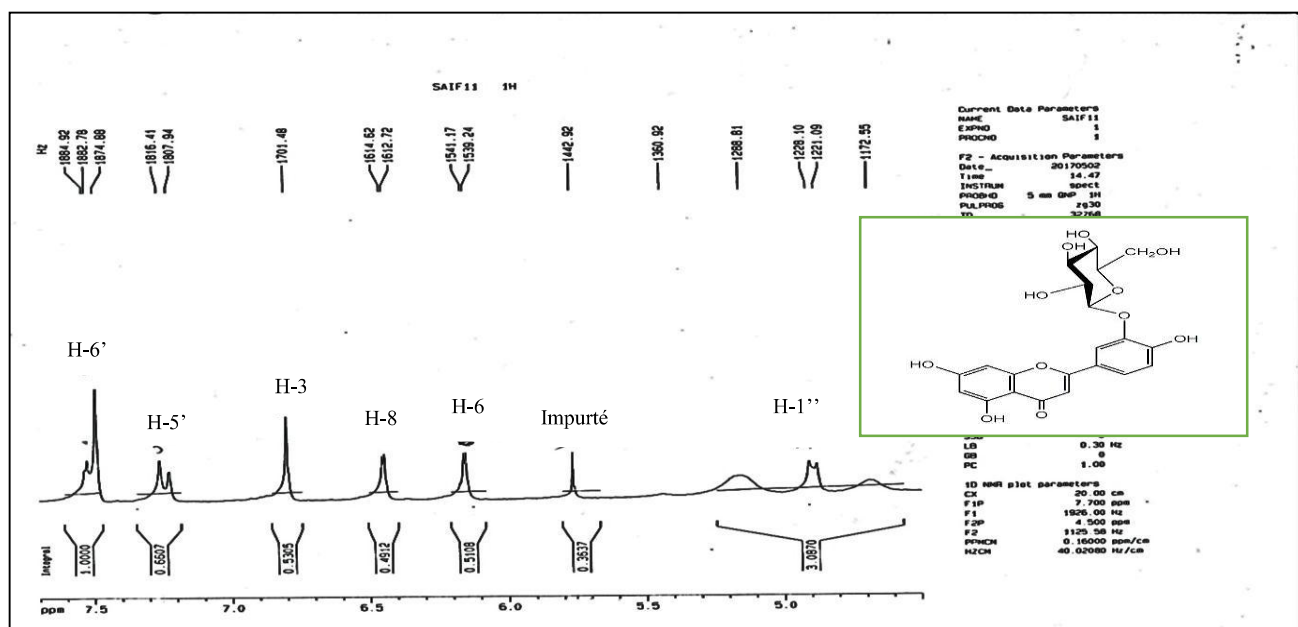


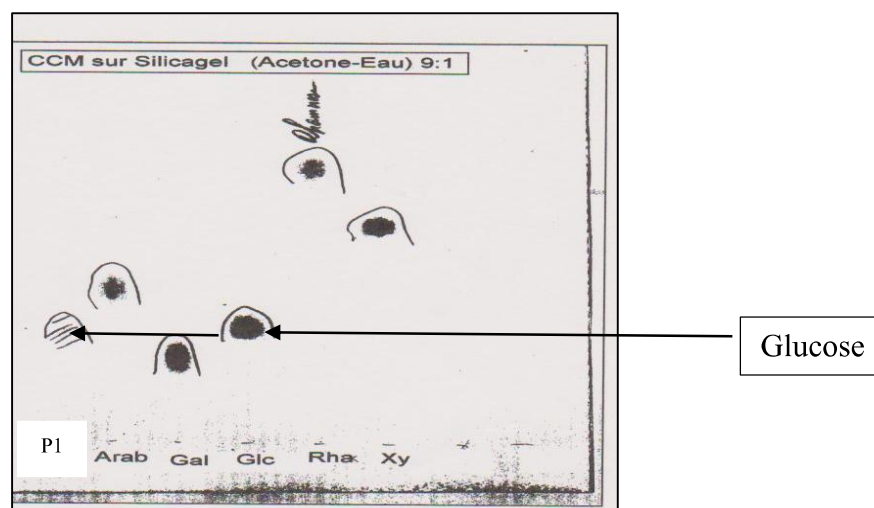
Figure 49 b : L'étalement de spectre RMN<sup>1</sup>H du composé P1 entre (4.5-7.5 ppm) enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub> à 250 MHz.

- **La nature du sucre :**
  - La Série spectrale UV-Visible du produit P1 montre *qu'il n'y a pas de groupement ortho di-OH sur le cycle B, donc pas de OH en position 3'*.
  - *Le déplacement chimique du proton anomérique 4.92 ppm ainsi que la valeur du constante de couplage  $J = 7.1\text{Hz}$  dans le spectre RMN<sup>1</sup>H comparés avec celle de la littérature [12] montre la présence d'un 3'-O-β-D- Glucoside.*

**Tableau 28 :** Données relatives à la spectroscopie RMN<sup>1</sup>H du composé P1.

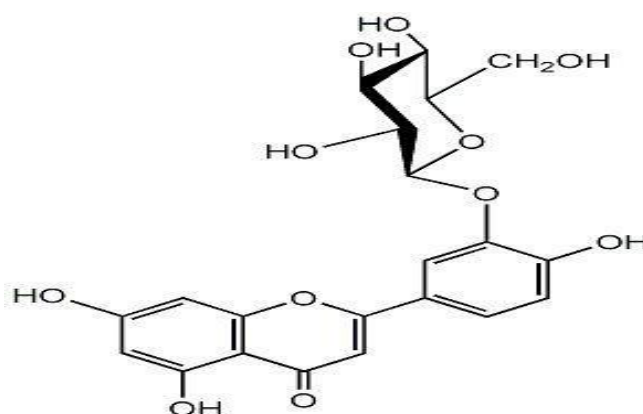
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage $J$ (HZ)	Attribution
3.00-3.80	/	/	/	Protons des sucres
4.92	1H	<i>d</i>	7.1	H-1'' glucose
6,15	1H	<i>d</i>	1.9	H-6
6,47	1H	<i>d</i>	1.9	H-8
6.8	1H	<i>d</i>	1.9	H-3
7.25	1H	<i>d</i>	8.4	H-5'
7.55	1H	<i>dd</i>	8.4 et 2.1	H-6'
13	1H	<i>s</i>	-	5-OH

L'hydrolyse acide nous a permis d'identifier d'une part le L-rhamnose et le D-galucose par analyse Co-chromatographique sur CCM en présence d'échantillons authentiques (Figure 50).



**Figure 50** : la Co-chromatographie des sucres libérés du composé P1.

Et par conséquent la structure finale du produit P1 est présentée dans la figure 51, ce composé est connu sous le nom : **Lutéoline 3'-O-β-D- Glucoside** [12] :



**Figure 51** : La structure du composé P1 : **Lutéoline 3'-O-β-D- Glucoside** : 5, 7,4'trihydroxy, 3'-O-β-D- glucosyl-flavone.

### III.2.3.2 : Détermination structurale du composé P2:

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'une flavonol 3-OR, par l'étude de la série spectrale UV on peut tirer les informations suivantes:

- Le spectre enregistré dans le MeOH montre deux bandes d'absorption, une bande II à 255 nm et une bande I à 355 nm confirmant la structure d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (3-OR).

- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +56$  nm) avec stabilité de l'intensité de l'absorbance indiquant la présence d'un groupe OH en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 331nm indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Cette hypothèse est confirmée par l'effet bathochrome  $\Delta\lambda = +12$  nm de la bande II dans NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le méthanol.
- Le déplacement bathochrome  $\Delta\lambda = +45$  nm de la bande I observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- Ainsi le spectre  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  ne s'accompagne pas d'un effet hypochrome de la bande I par rapport au spectre  $\text{AlCl}_3 + \text{MeOH}$  ce qui indique l'absence d'un système *ortho* di-hydroxylé sur le cycle B. ceci est confirmé par le spectre  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$  et MeOH
- le tableau 29 et la figure 52 résume les renseignements effectués.

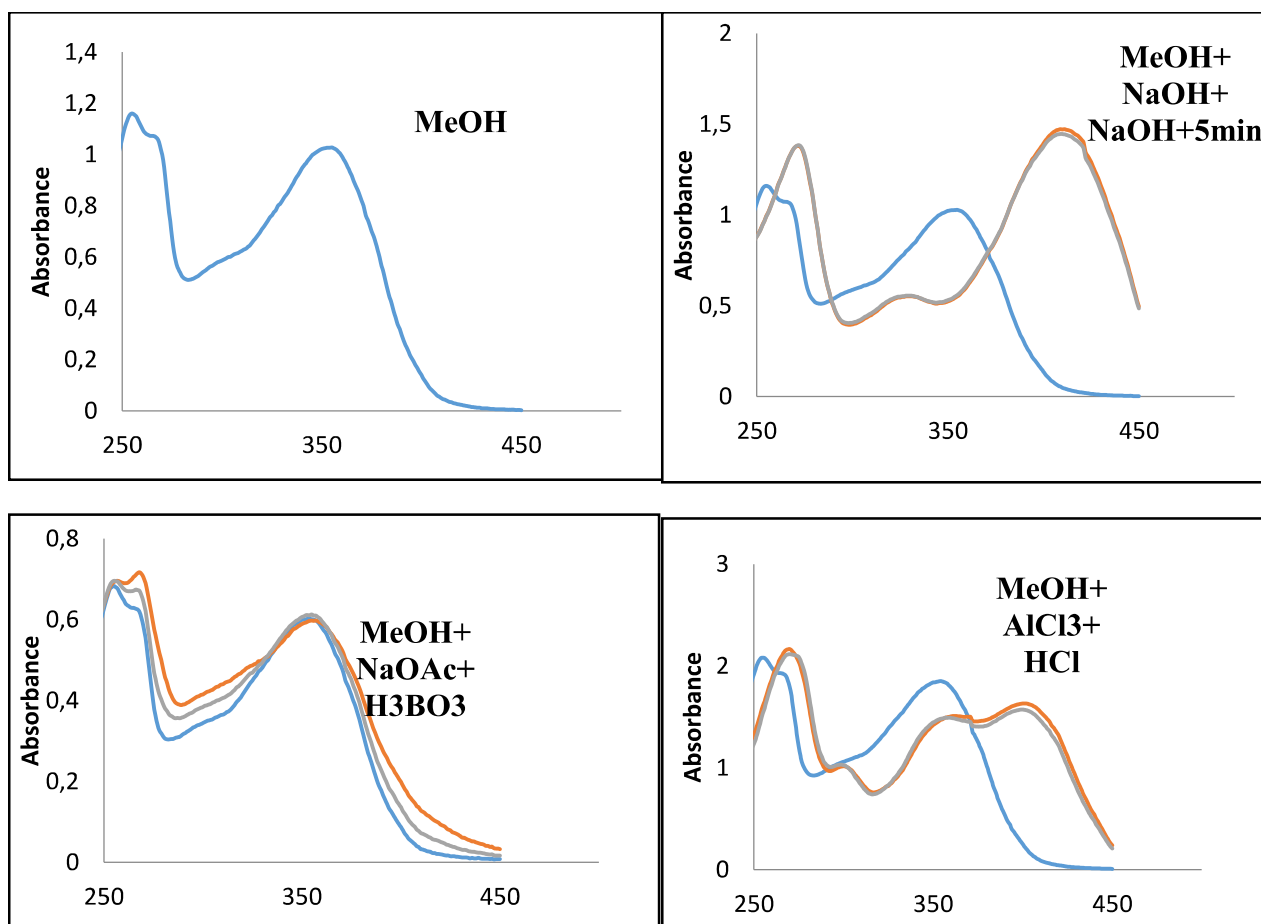


Figure 52: Série spectrale UV-Visible de composé P2.

Tableau 29 : Données de la série spectrale UV-Visible de composé P2.

Réactifs	Bande I $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Autre bande $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Bande II	Interprétation
MeOH	355	-	255	Flavonol-3OR
NaOH	411	331	272	OH en 4' OH en 7
NaOAc	356	-	268	OH en 7
NaOAc+ H3BO3	355	-	255	Pas de ortho di- OH sur B
AlCl3	399	-	270	Pas de ortho di- OH sur B
AlCl3 + HCl	399	-	270	OH en 5
NaOH après 5 min		stable		

L'étude du spectre RMN<sup>1</sup>H enregistré dans DMSO (Figure 53 a, b) montre la présence de signaux caractéristique d'un flavonoïde :

- doublet d'intégration 1H à 6,18 ppm ( $J=1.8$  Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-6.
- doublet d'intégration 1H à 6,42 ppm ( $J= 1.8$  Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à 12.4 ppm attribuable au proton de 5-OH.
- L'ensemble de ces signaux orientent vers une disubstitution du noyau A en position 5 et 7.
- Un doublet d'intégration 1H à 6.85 ppm ( $J= 8.4$ Hz) indicateur d'un couplage *ortho* attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H à 7.80 ppm ( $J= 1.8$  Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-2'.

- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à 7.50 ppm ( $J= 8.4$  Hz;  $J= 1.8$  Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta avec H-2' et d'un couplage *ortho* avec H-5' attribuable à H-6'.
- L'ensemble de ces trois signaux orientent vers une disubstitution du noyau B en position 3' et en 4'.
- Un doublet d'intégration 1H à 5.40 ppm ( $J= 7.38$  Hz), attribuable au proton anomérique d'un glucose (H-1'') en jonction  $\beta$ .
- Un doublet d'intégration 1H à 4.30 ppm ( $J= 7.9$  Hz), caractérisant le proton anomérique d'un rhamnose H-1''', dont la présence de son méthyle est signalé par un doublet à 0.95ppm ( $J=6$  Hz).
- Dans l'intervalle (3 – 4) ppm se trouvent les autres protons du sucre.
- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta$ H = 3,7 ppm, attribuable à un groupe méthoxyle OMe révélant la présence d'un méthoxyle dans la molécule en position 3'.
- Les données relatives à la spectroscopie RMN<sup>1</sup>H sont rassemblées dans le Tableau 30:

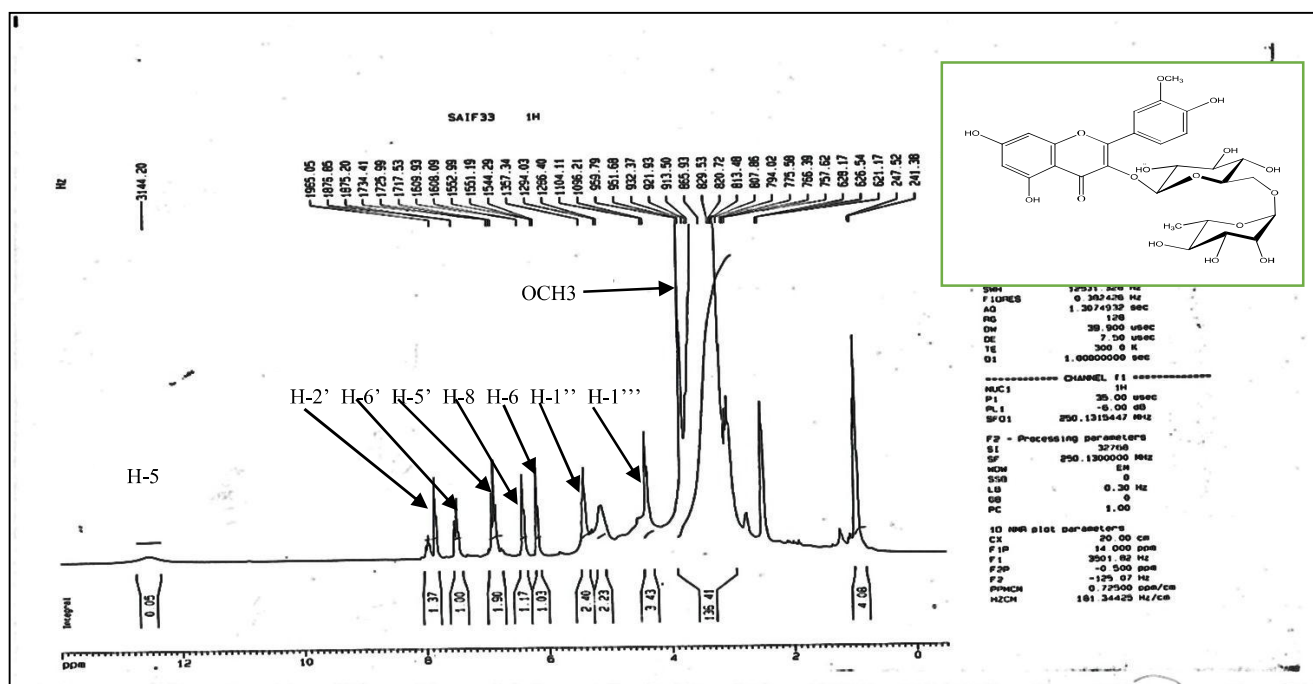
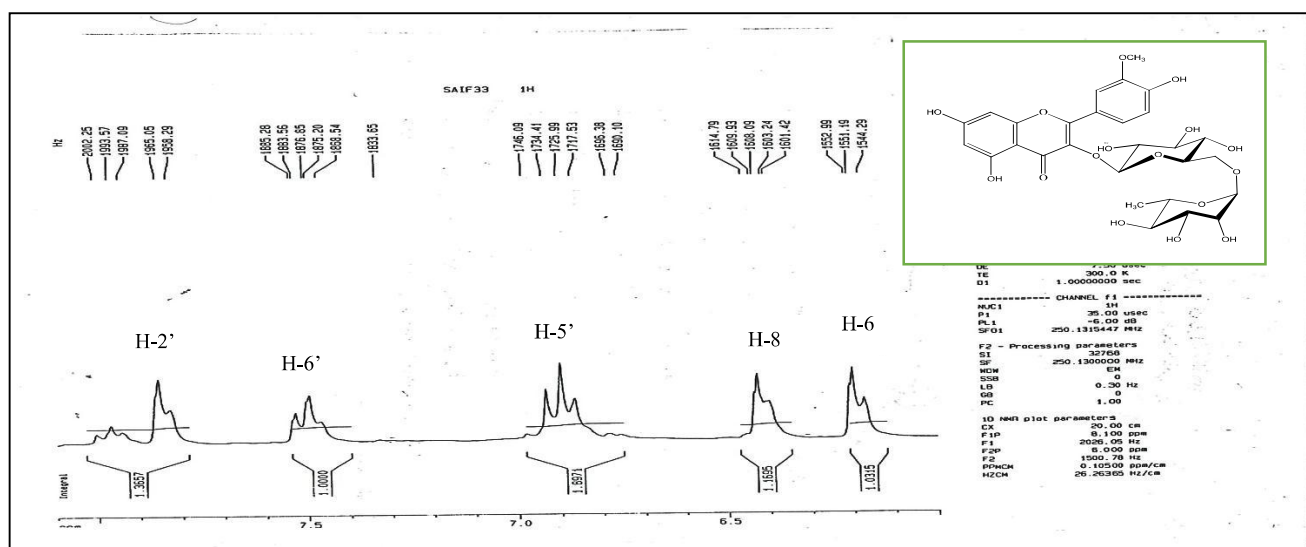


Figure 53 a: Le spectre RMN<sup>1</sup>H du composé P2 enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub> à 250 MHz.



**Figure 53 b:** L'étalement de spectre RMN<sup>1</sup>H du composé P2 entre (6-8 ppm) enregistré dans DMSO-d<sub>6</sub> à 250 MHz.

- Le problème qui se pose ici est la détermination de la position de méthoxyle et celle des sucres ainsi que la succession des deux sucres le glucose et le rhamnose.
- Les déplacements chimiques des deux protons anomériques du glucose et du rhamnose, ainsi que les valeurs des constantes de couplage dans le spectre RMN-1H (Figure 53 a,b) comparés avec celle de la littérature [13] sont en faveur de la présence des deux sucres le glucose et le rhamnose
- Alors ces résultats nous permettent d'attribuer les deux sucres le glucose et le rhamnose à la position 3 (R= Glu-rha).
- Les signaux du glucose et du rhamnose apparaissent clairement sur le spectre RMN-13C (Figure 54 a, b), notamment les signaux à 101.7 et à 101.4 ppm des carbones anomériques des groupements O-glucosyl et O-rhamnosyl respectivement. Les autres CH du glucose et du rhamnose apparaissent dans la région du spectre se situant entre 68.7 et 76.9 ppm. Sur le même spectre, le blindage du signal du carbone C-3 (133.6 ppm), le déblindage pour les carbones C-2 (156.9 ppm) et C-4 (177.8 ppm) permettent d'étayer d'ores et déjà que C-3 est la position d'attachement de l'enchaînement glucose-rhamnose à l'aglycone [13].



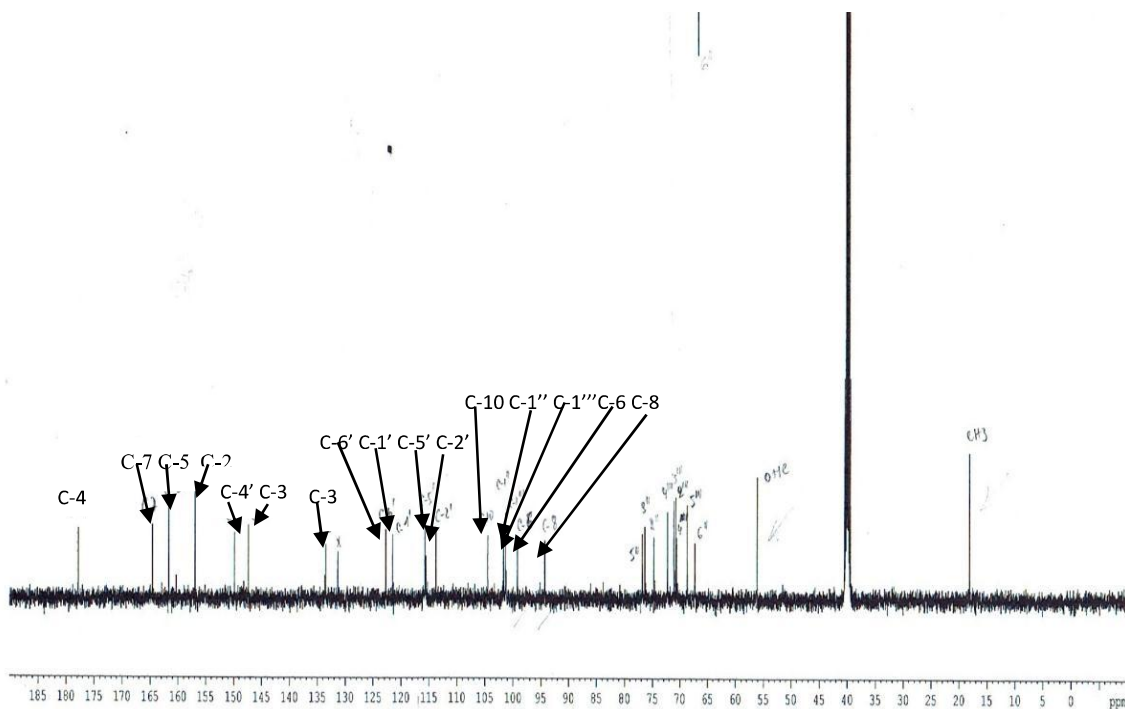


Figure 54 a : Le spectre RMN<sup>13</sup>C du composé P2 enregistré dans DMSO-d6 à 250 MHz.

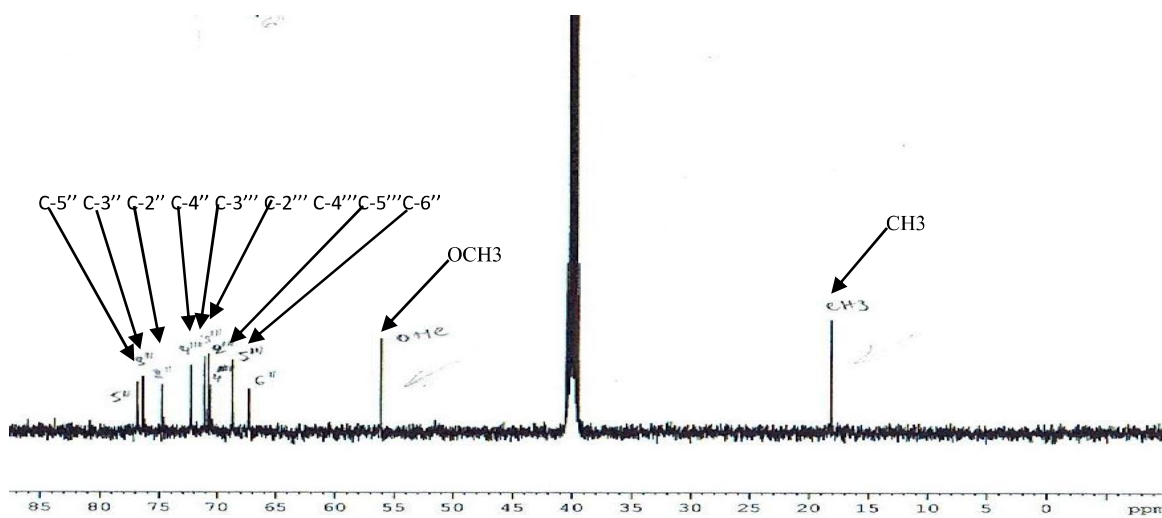
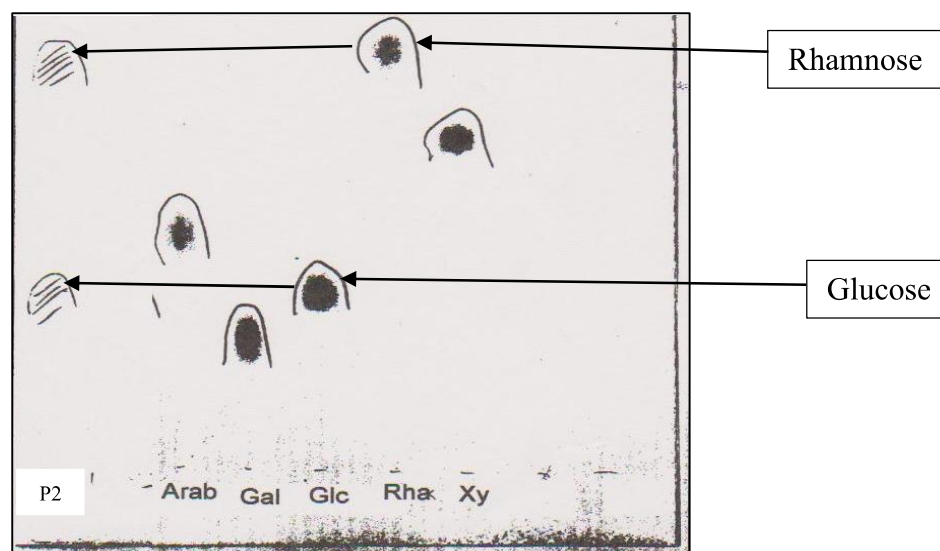


Figure 54 b : Le spectre RMN<sup>13</sup>C du composé P2 entre (15-80 ppm) enregistré dans DMSO-d6 à 250 MHz.

**Tableau 30** : Données relatives à la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  du composé P2.

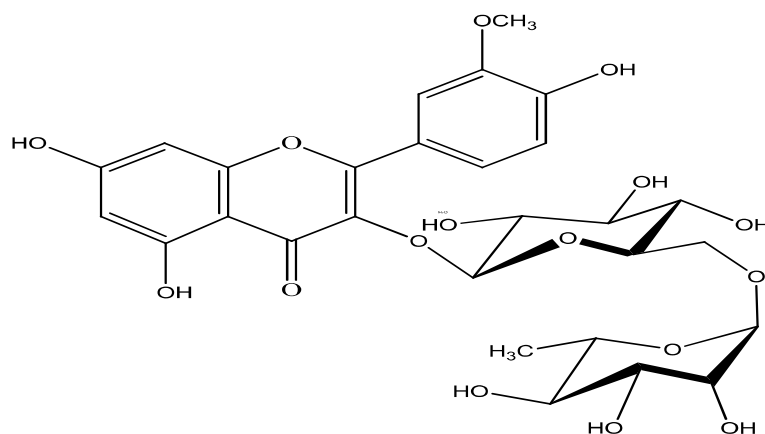
No.	$\delta\text{H}$ (J Hz)	$\delta\text{C}$	No.	$\delta\text{H}$ (J Hz)	$\delta\text{C}$
<b>2 (C)</b>		156.9	<b>1''(CH)</b>	5.34 d (7.4)	101.7
<b>3(C)</b>		133.6	<b>2''(CH)</b>		74.7
<b>4(C)</b>		177.8	<b>3''(CH)</b>		76.4
<b>5(C)</b>	12.59 (5-OH)	161.7	<b>4''(CH)</b>		70.6
<b>6(C)</b>	6.19 d (2.1)	99.2	<b>5''(CH)</b>		76.9
<b>7(C)</b>		164.6	<b>6''(CH<sub>2</sub>)</b>		67.3
<b>8(CH)</b>	6.38 d (1.8)	94.3	<b>1'''(CH)</b>	4.38 d (0.9)	101.4
<b>9(C)</b>		156.9	<b>2'''(CH)</b>		70.8
<b>10(C)</b>		104.5	<b>3'''(CH)</b>		71.1
<b>1'(C)</b>		121.5	<b>4'''(CH)</b>		72.3
<b>2'(CH)</b>	7.55 d (1.8)	113.8	<b>5'''(CH)</b>		68.7
<b>3'(C)</b>		147.4	<b>6'''(CH<sub>3</sub>)</b>	0.99 d (6.1)	18.1
<b>4'⊙</b>		149.9			
<b>5'(CH)</b>	6.83 d (8.7)	115.6			
<b>6'(CH)</b>	7.52 dd(7.5 ; 2.1)	122.8			
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.7 s	56.2			

L'hydrolyse acide nous a permis d'identifier d'une part le L-rhamnose et le D-galucose par analyse co-chromatographique sur CCM en présence d'échantillons authentiques (Figure 55).



**Figure 55 :** la Co-chromatographie des sucres libérés du composé P2.

Par conséquent, en conclure que ce composé est un dérivé isorhamnetin-3-*O*-rutinoside (figure 56) [13].



**Figure 56 :** La structure du composé P2 (**Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside** : 5, 7,4'tri-hydroxy, 3'methoxy, 3-*O*-rhamnoglucosyl-flavone).

### III.2.3.3 : Détermination structurale du composé P3 :

Le composé P3 est une poudre jaune soluble dans le méthanol. Son spectre UV (figure 57) est caractéristique d'un flavonol substitué en 3 (3-OR) avec des maxima à 256 nm et 356 nm. On peut tirer les conclusions suivantes :

- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochromique de la bande I de +56 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, avec stabilité de l'intensité de l'absorbance ce

qui indique un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm sur le même spectre, oriente vers un OH libre en position 7.

- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre pris dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7 ( $\Delta\lambda = 13$  nm).
- Le déplacement bathochrome  $\Delta\lambda = 42$  nm de la bande I observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- Le déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  et  $\text{AlCl}_3$  ( $\Delta\lambda = -31$  nm), indique la présence de groupement *ortho* di OH sur le cycle B. Ceci est confirmé par le spectre NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et MeOH (effet bathochrome  $\Delta\lambda = 18$  nm pour la bande I).

L'ensemble de ces résultats de la série spectrale UV-Visible sont résumés dans le tableau 31 et la figure 57.

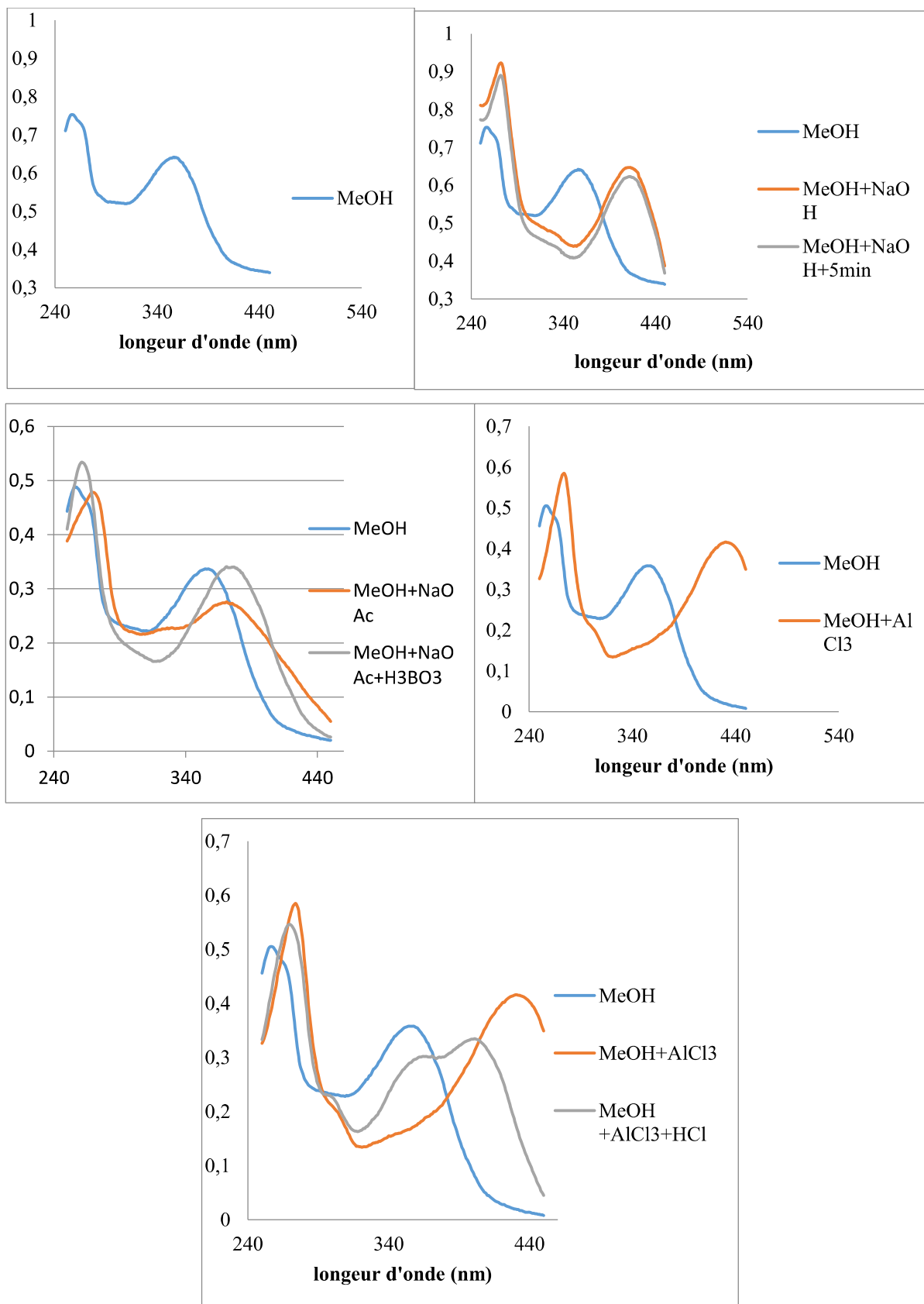


Figure 57: Série spectrale UV-Visible du composé P3.

**Tableau 31 : Données de la série spectrale UV-Visible du composé P3.**

Les rectifs	Bande I $\lambda$ (nm)	Bande II $\lambda$ (nm)	Nouvelle bande $\lambda$ (nm)	Interprétation
MeOH	356	256	-	Flavonol-3OR
MeOH+NaOH	412	272	324	OH en 4' OH en 7
MeOH+NaOH+5min	412	272	324	OH en 7
MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	374	261	-	Présence ortho di OH sur le cycle B
MeOH+AlCl <sub>3</sub>	431	274	-	
MeOH+AlCl <sub>3</sub> +HCl	400	270	-	Présence ortho di OH sur le cycle B + OH en 5

Les signaux du spectre RMN <sup>1</sup>H du composé P3 (figure 58 a, b) dans la région des protons aromatiques va dans l'hypothèse de la présence de la génine de type quercétine. De plus, nous observons les signaux de deux protons anomériques à  $\delta$ H 5.34 (d,  $J = 7.4$  Hz) et 4,38 (d,  $J = 0,9$  Hz) qui renforcent la présence de deux sucres. L'examen détaillé du spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans DMSO montre:

- Un doublet d'intégration 1H à 6.20 ppm ( $J = 1.8$ Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à 6.41ppm ( $J = 1.8$  Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à 12,59 ppm attribuable au proton du 5-OH.
- L'ensemble de ces 3 derniers signaux oriente vers une disubstitution du noyau A en position 5 et 7.

- Un doublet d'intégration 1H à 7.53 ppm ( $J= 2.1\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta attribuable à H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H à 6.82 ppm ( $J= 8.7\text{Hz}$ ) indicateur d'un couplage *ortho* attribuable à H-5' (complétez à partir du tableau 32).
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à 7.67ppm ( $J= 7.5 \text{ HZ} ; J= 2.1 \text{ HZ}$ ) indicateur d'un couplage *mé*ta avec H-2' et d'un couplage *ortho* avec H-5' attribuable à H-6' (complétez à partir du tableau 32).

L'ensemble de ces trois signaux orient vers une disubstitution du noyau B en position 3' et 4'.

- Un doublet d'intégration 1H à 5.34 ppm ( $J= 7.5 \text{ Hz}$ ), attribuable au proton anomérique d'un hexose.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à 4,38 ppm ( $J= 0.9 \text{ Hz}$ ), attribuable au proton anomérique ( H-1''') d'un autre deoxyhexose.
- La présence d'un méthyle à  $\delta\text{H} = 0,99 \text{ ppm}$  (d ;  $J= 6,0 \text{ Hz}$ ) prévoit la présence du rhamnose.
- Dans l'intervalle (3.00 – 3.80) ppm se trouvent les autres protons des sucres.

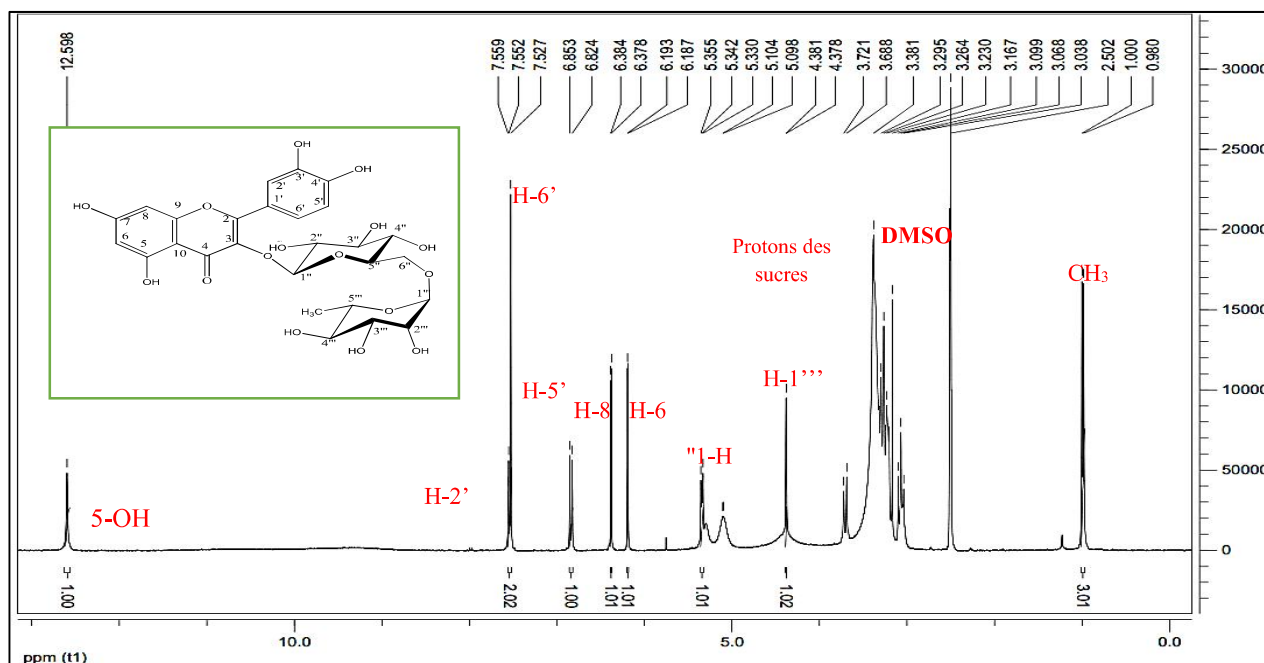


Figure 58 a : Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé P3 à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

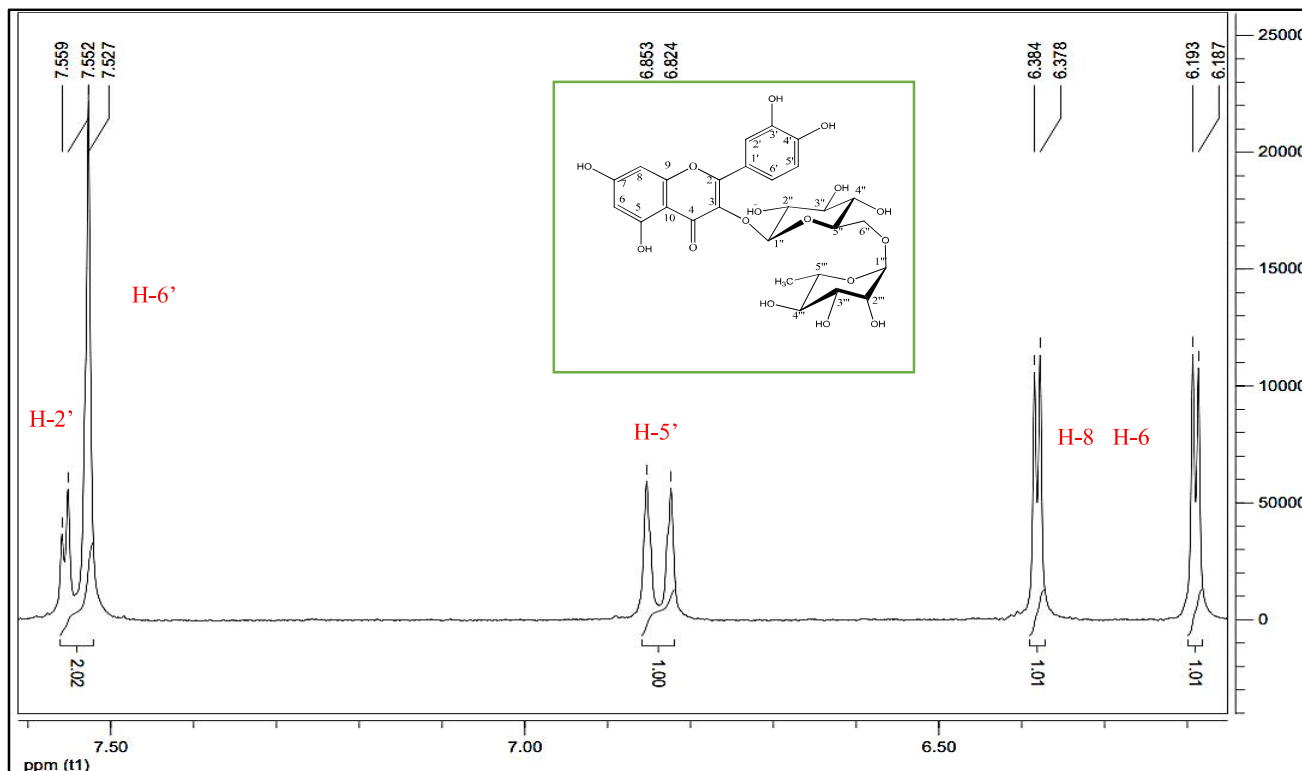


Figure 58 b : L'étalement de spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé P3 entre (6-8 ppm) à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

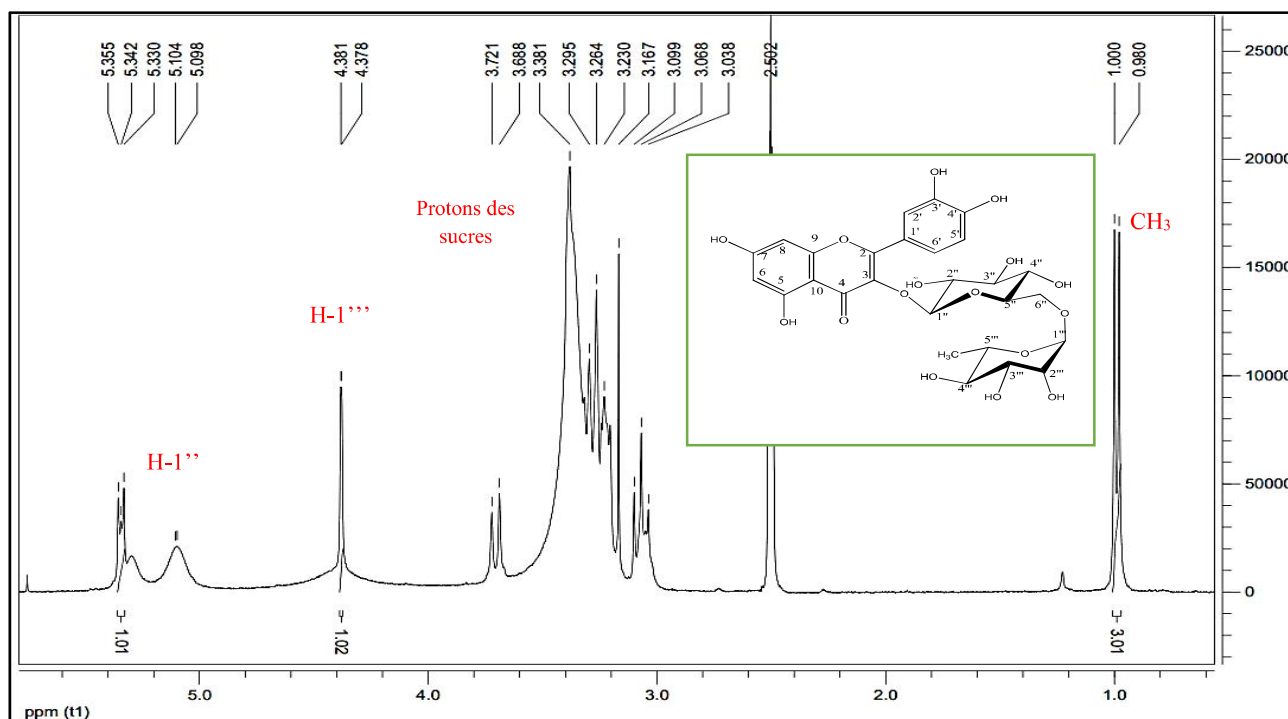


Figure 58 c : L'étalement de spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé P3 entre (1-5.5 ppm) à 300 MHz enregistré dans le DMSO-d<sub>6</sub>.



L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C (figure 59) montre les signaux suivants: signal situé à δC 178.3 ppm du groupement carbonyle, neuf carbones aromatiques quaternaires (huit entre 130 et 170 ppm et un à δC 104.9 ppm). Nous observons les signaux de dix CH aromatiques dont deux peuvent correspondre à des carbones portant les protons anomériques (δC 102.1 et δC 101.7 ppm), un CH<sub>2</sub> (δC 67.9 ppm) et un méthyle (δC 18.7 ppm).

Les déplacements chimiques en RMN<sup>13</sup>C dans la région des sucres sont caractéristiques de :

- une glucopyranoside (C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' respectivement à δ C, 102.1, 75.0 ,77.3, 71.5, 76.8 et 67.9 ppm) dont on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique (J=7.5 Hz)
- un rhamnopyranose (C-1''', C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' et C-6''' respectivement à δ C, 101.7, 71.3, 70.9,72.8, 69.2, et 18.7 ppm) en configuration α (constante de couplage du proton anomérique H-1''' J = 0.9 Hz). (complétez à partir du tableau 32)

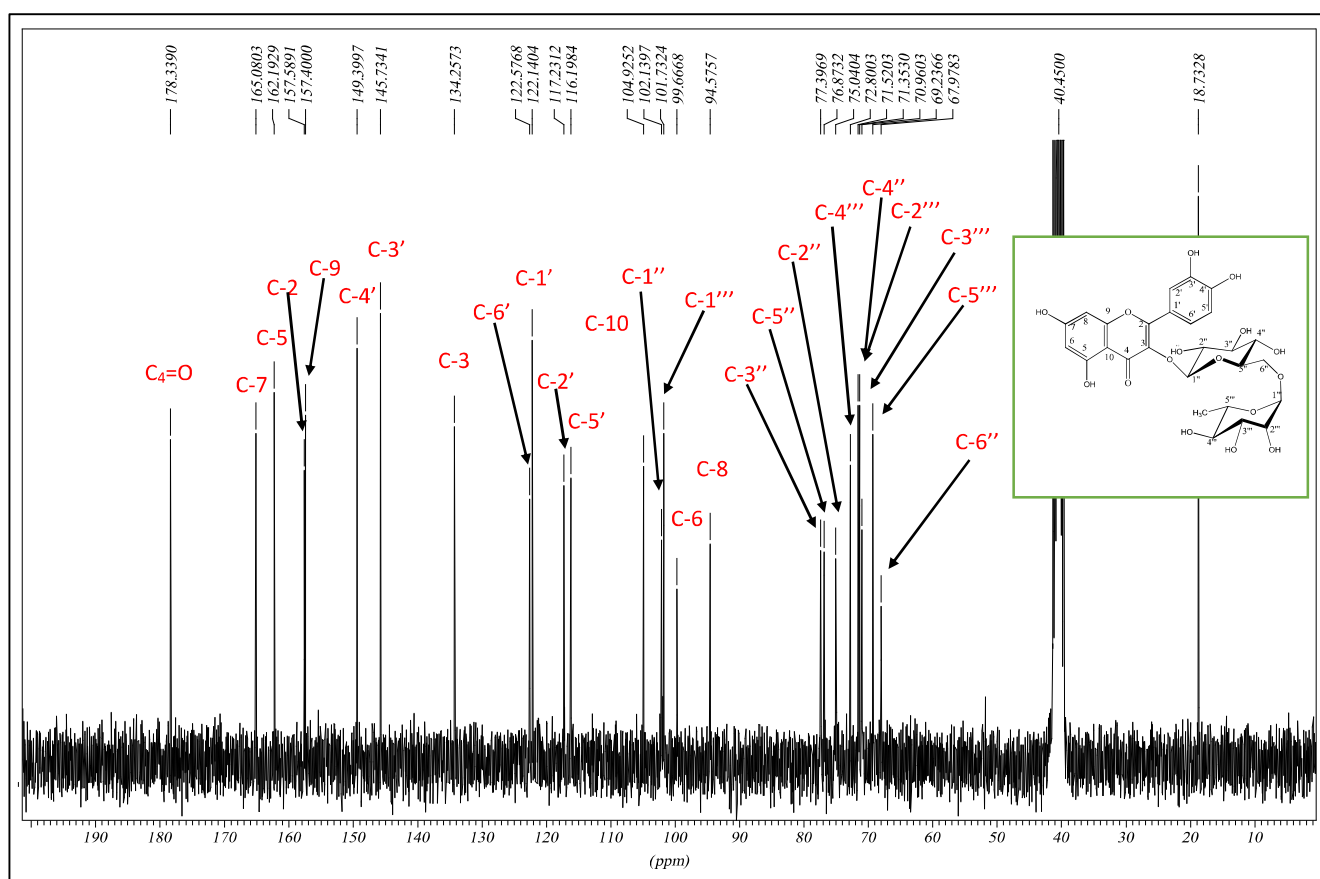


Figure 59 : Le spectre RMN 13C du composé P3 à 75 MHz enregistré dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

L'hydrolyse acide de composé P3, libère deux sucres, dont la révélation par Co-chromatographie avec des échantillons authentiques (figure 60).

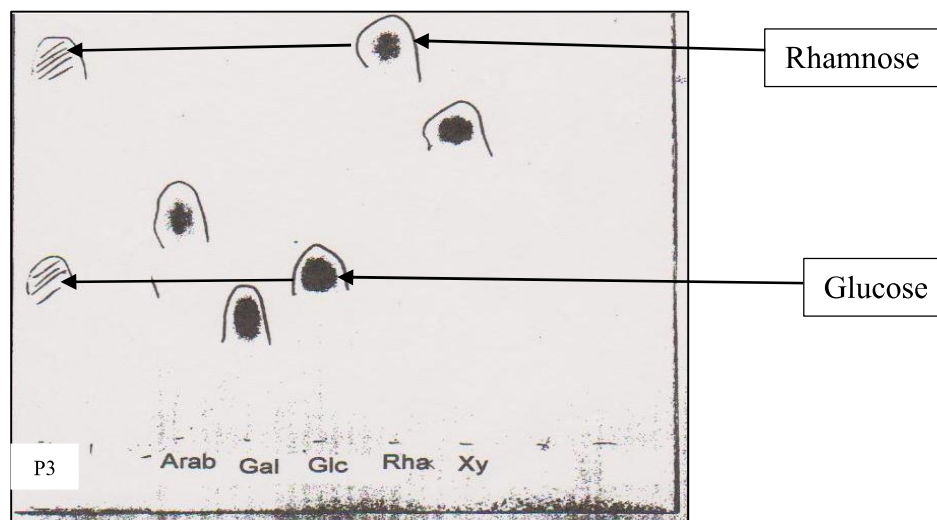


Figure 60 : La Co-chromatographie des sucres libérés du composé P3.

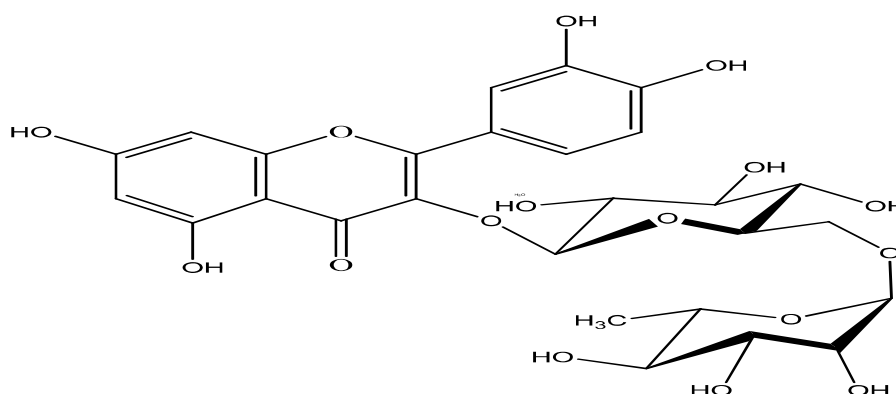
Ces informations spectrales sont résumées dans le tableau 32 ci-dessous :

Tableau 32: données spectrales RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé P3.

No.	$\delta H$ (JHz)	$\delta C$	No.	$\delta H$ (JHz)	$\delta C$
2 (C)		157.5	1''(CH)	5.34 d (7.4)	102.1
3(C)		134.2	2''(CH)		75.0
4(C)		178.3	3''(CH)		77.3
5(C)	12.59 (5-OH)	162.1	4''(CH)		71.5
6(C)	6.19 d (2.1)	99.6	5''(CH)		76.8
7(C)		165.0	6''(CH <sub>2</sub> )		67.9
8(CH)	6.38 d (1.8)	94.5	1'''(CH)	4.38 d (0.9)	101.7
9(C)		157.4	2'''(CH)		71.3
10(C)		104.9	3'''(CH)		70.9
1'(C)		122.1	4'''(CH)		72.8

<b>2'(CH)</b>	7.55 d (1.8)	117.2	<b>5'''(CH)</b>		69.2
<b>3'(C)</b>		145.7	<b>6'''(CH<sub>3</sub>)</b>	0.99 d (6.1)	18.7
<b>4'(C)</b>		149.3			
<b>5'(CH)</b>	6.83 d (8.7)	116.1			
<b>6'(CH)</b>	7.52 dd(7.5 ; 2.1)	122.5			

L'ensemble de ces données confirme bien qu'il s'agit de la rutine (figure 61) [14].



**Figure 61** : Structure du composé P3 : la Rutine (*Quercétine 3-O-rutinoside*).

### Conclusion :

L'élucidation structurale des produits isolés de l'extrait acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la plante *Genista microcephala*, et l'extrait *n*-butanolique de la plante *Jurinea humilis* a été réalisée grâce à l'analyse des spectres SM, UV-Visible, RMN 1D et 2D, et à la comparaison avec les données de la littérature. Les produits caractérisés appartiennent en général aux classes des métabolites secondaires flavonoides et isoflavonoides très répondeu dans le genre *Genista* et peu présentés dans le genre *Jurinea*. Cette étude a abouti à l'isolement de 5 isoflavonoides et 3 flavonoides.

**Références Bibliographiques**

- [1] Cocallemen, S.; Farines, M.; Faill, H.; Soulier, J. & Morin, O., "Study of the seed oil of *Solanum melongena* (L), Solanaceae", Revue Française des Corps Gras. **1988**, 35 (3), 105-10.
- [3] Iupac., *Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives*. 6<sup>th</sup> ed. Oxford. **1979**. Pergamon Press, p59 - 66.
- [4] Zhang, Y.; Xu, Q.; Zhang, X.; Chen, J.; Liang, X. & Kettrup, A., *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for identification of isoflavones and description of the biotransformation of Kudzu root*. Anal Bioanal. Chem. **2005**, 383: 787-796.
- [5] Kerkatou. M.; Menad. A.; Sarri. D.; León. F.; Brouard. I.; Bouldjedj. R.; Chalard. P.; Ameddah. S.; Benayache. S. & Benayache. F., *Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of Genistaquadriflora Munby (Fabaceae)*. Der Pharmacia Lettre. **2013**, 5 (6), 56-59.
- [6] Caligiani, A.; Palla, G.; Maietti, A.; Cirlini, M. & Brandolini, V., *1- H Fingerprinting of Soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones*. Nutrients. **2010**, 2 (3), 280-289.
- [7] Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Booren, A.M. & Gray, J.I., *Antioxidant polyphenols from Tart Cherries (Prunus cerasus)*. J. Agric. Food. Chem. **1999**, 47: 840-844.
- [8] Kim, H.J.; Lee, D.H.; Hwang, Y.Y.; Lee, K.S. & Lee J.S., *Characterization Of B-Hydroxy-B-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor From Puerariathunbergiana*. J. Agric. Food Chem. **2005**, 53: 5882-5888.
- [9] Paris, R.R.; C. R. National Academy of Sciences, **1965**, Paris.
- [10] Agrawal, P.K. Carbon-13 NMR of flavonoid .Central institute of Medical and Aromatic Plants, India.Edition Elsevier, New York, **1998**, 39(6), 287–293.
- [11] Lopez Lazaro M, Martin-Cordero C, Iglesias-Guerra F, and Ayuso González M.J. *An isoflavone glucoside from Retama sphaerocarpa Boissier*. Phytochemistry. 1998, 48(2), 401-402.
- [12] Nateq A.H. & Zaid M.N., *Isolation and elucidation of some chemical constituents of Lavandula officinalis*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2016, 8(3), 394-401.
- [13] Dehaghani, Z.A.; Asghari, G. & Masoud Sadeghi Dinani, M.S., *Isolation and Identification of Nicotiflorin and Narcissin from the Aerial Parts of Peucedanum aucheri Boiss*. Journal of Agricultural Science and Technology A 7. **2017**, 45-51.
- [14] Lemoui, R.; Benyahia, S.; Noman, L.; Bencherchar, I.; Oke-Altuntas, F.; Rebbas, K.; Benayache, S.; Benayache, F & Demirtas, I. *Isolation of phytoconstituents and evaluation of*

*biological potentials of Berberis hispanica from Algeria.* Bangladesh. J. Pharmacol. **2018**, 13 : 179-186.

## **PARTI-B :**

**L'évaluation de l'activité Biologique  
de *Genista microcephala* Coss & Dur.**

**CHAPTER I :**  
**APERÇU THEORIQUE**

Cette partie résume la détermination du contenu phénolique et flavonique ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes de *Genista microcephala*. L'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes : Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) et les capacités antioxydantes totales (CAT). L'activité antimicrobienne des extraits acétate d'éthyle et butanoliques de *G. microcephala* en plus de la teneur en acides gras des différentes parties de la plante étudiée a été évaluée contre des bactéries pathogènes humaines, des bactéries de poissons et des levures. Les méthodes utilisées étaient la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des concentrations bactéricides et fongicides minimales (MBC et MFC).

### **I.1. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux**

#### **Préparation des extraits :**

Une masse de 2 milligrammes de chaque extrait (acétate d'éthyle et butanolique) est dissoute dans un volume de 2 ml de méthanol pour obtenir la solution S<sub>1</sub> de concentration 2 mg/ml. La solution S<sub>1</sub> obtenu est centrifugé est gardé à 0°C avant leurs analyses.

#### **I.1.1. Dosage des phénols totaux**

Le dosage des phénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu, qui est un milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols. Le réactif de Folin Ciocalteu, mélange des acides phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phospho-molybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [1].

#### **Protocole :**

Le dosage des phénols totaux a été réalisé selon Slinkard & Singleton [2], la méthode implique la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par des composés phénoliques, avec une formation concomitante d'un complexe bleu. Dans la présente étude, 0,2 ml d'extrait de plante à 2 mg / ml a été mélangé avec 0,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%) et 1,5 ml d'eau déionisée, après 3 minutes, un réactif Folin-Ciocalteu (FC) 0,1 ml a été ajouté, puis les tubes ont été maintenues pendant 2 h à température ambiante dans un endroit sombre, l'absorbance a été lue à 760 nm avec un spectrophotomètre. Les résultats ont été donnés en milligrammes d'équivalents de l'acide gallique par gramme d'extrait végétal (mg GAE g<sup>-1</sup>).



**Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique**

On prend 2 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 2 ml méthanol pour obtenir la solution S<sub>2</sub> (2mg/2ml ou 2000µg/2ml).

Pour la gamme d'étalon on prépare plusieurs dilutions comme de suit :

500µg/ml → 0.50 ml de S<sub>2</sub> + 0.50 ml méthanol (A<sub>1</sub>)

400 µg /ml → 0.40 ml de S<sub>2</sub> + 0.60 ml méthanol (A<sub>2</sub>)

300 µg /ml → 0.30 ml de S<sub>2</sub> + 0.70 ml méthanol (A<sub>3</sub>)

200 µg /ml → 0.20 ml de S<sub>2</sub> + 0.80 ml méthanol (A<sub>4</sub>)

100 µg /ml → 0.10 ml de S<sub>2</sub> + 0.90 ml méthanol (A<sub>5</sub>)

50 µg /ml → 0.05 ml de S<sub>2</sub> + 0.95 ml méthanol (A<sub>6</sub>)

**Procédure :** Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

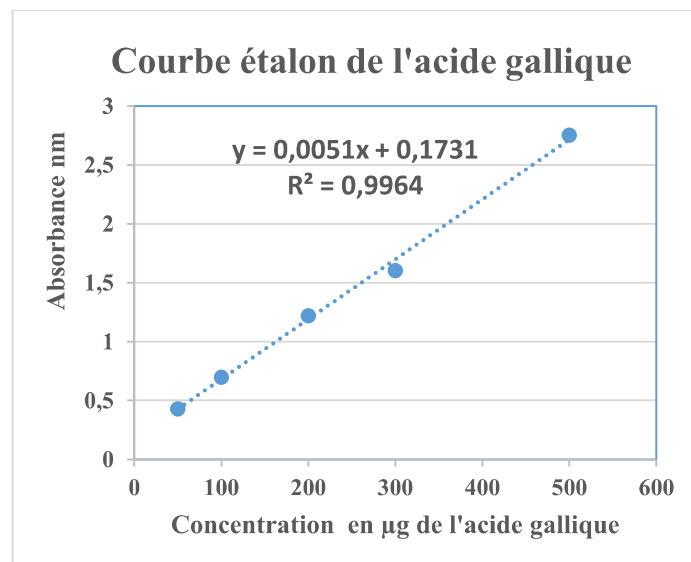
- **Pour l'extrait :**

200 µl (S<sub>1</sub> solution d'extrait de plante) + 1500 µl d'eau distillé+100 µl de FC + 500 µl (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) + 1500 µl d'eau distillé + attendre 3 mn +mettre le mélange à l'obscurité et attendre 90 mn + lecture à 760 nm

- **Pour l'étalon de l'acide gallique :**

Chaque dilutions on prend 125 µl et on ajoute 1500 µl d'eau distillé+100 µl de FC + 500 µl (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) + 1500 µl d'eau distillé + attendre 3 mn +mettre le mélange à l'obscurité et attendre 90 mn + lecture à 760 nm.

Afin d'avoir effectuer les dilutions, on trace une courbe d'étalonnage (Figure 62), c'est une courbe de référence. Pour calculer la concentration en µg d'équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait de plante (µg EAG/mg EP), il vous suffit de remplacer la valeur de l'absorbance (y) de l'extrait dans l'équation  $y = 0,0051x + 0,1731$  et après calculer la concentration (x) qu'on l'appelle EAG.



**Figure 62:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### I.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est basée sur la complexation avec  $Al^{+3}$  et les résultats sont exprimés en équivalents de Quercétine.

#### Protocole :

La détermination du dosage des flavonoïdes totaux par la méthode colorimétrique est faite selon la méthode utilisée par Quettier-Deleu [3]. Des volumes égaux d'extrait et de solution de chlorure d'aluminium (2%) ont été mélangés. L'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre après 15 min d'incubation. Les teneurs totales en flavonoïdes ont été exprimées en mg d'équivalents de quercétine par g d'extrait de plante (mg QE / g d'extrait végétal).

#### Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine :

On prend 2,5 mg de la Quercétin et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution  $S_m$ .

Pour la gamme d'étalon On prépare plusieurs dilutions comme de suite :

Quercetin (25)  $\longrightarrow$  2375  $\mu$ l (MeOH) + 25  $\mu$ l ( $S_m$ )

Quercetin (50)  $\longrightarrow$  2350  $\mu$ l (MeOH) + 50 $\mu$ l  $S_m$

Quercetin (100)  $\longrightarrow$  2300  $\mu$ l (MeOH) + 100 $\mu$ l  $S_m$

Quercetin (125) → 2275 µl (MeOH) + 125µl Sm

Quercetin (150) → 2250 µl (MeOH) + 150µl Sm

Quercetin (175) → 2225 µl (MeOH) + 175µl Sm

Quercetin (200) → 2200 µl (MeOH) + 200µl Sm

**Procédure :** Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

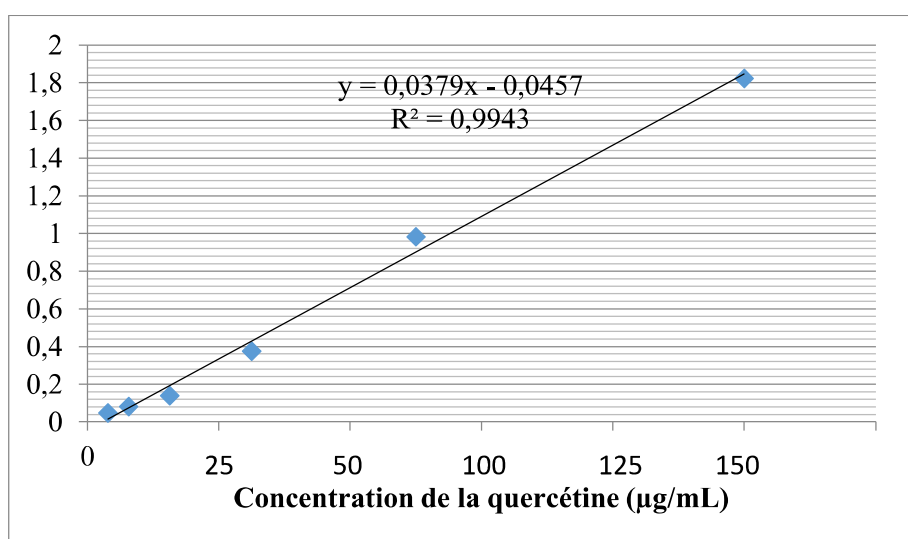
- **Pour l'extrait :**

1000 µl (S<sub>1</sub>) (extrait de plante) + 1000 µl (AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) 2% + attendre 10 min + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (500µl extrait + 2ml méthanol).

- **Pour l'étalon :**

Chaque dilution on prend 125 µl et on ajoute 1000 µl (AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) 2% + attendre 10 min + lecture à 415 nm.

Afin d'avoir effectué les dilutions on trace une courbe d'étalonnage (Figure 63), c'est une courbe de référence. Pour calculer la concentration en µg d'équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait de plante (µg EQ/mg EP), il vous suffit de remplacer la valeur de l'absorbance (y) de l'extrait dans l'équation  $y = 0,0379x + 0,0457$  et après calculer la concentration (x) qu'on l'appelle EQ.



**Figure 63 :** La courbe d'étalonnage de la quercétine.

## I.2. Activité antioxydant

L'activité antioxydant des différents extraits issus de la plante *G.microcephala* a été évaluée *in-vitro* par trois méthodes différentes, Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) et la capacité antioxydante totales (CAT).

BHA et BHT ont été utilisés comme contrôles positifs [3].

### I.2.1 : Activité du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP):

Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) [4].

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire l'ion ferrique ( $Fe^{+3}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{+2}$ ). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donneuse d'électrons caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols.

Les extraits testés ont été mélangés avec 0,5 ml de cyanure ferrique de potassium (1%) et 0,5 ml de tampon phosphate 0,2 M. Après 20 minutes d'incubation à 50 ° C, 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%), 0,4 ml d'acide trichloroacétique (10%) et 2 ml d'eau distillée ont été ajoutées. L'absorbance a ensuite été mesurée à 700 nm.

Les résultats ont été exprimés en mg d'acide ascorbique (AAE) par g d'extrait végétal (mg d'AAE / g d'extrait végétal).

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation de pouvoir réducteur des extraits testés.

L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants synthétisés : BHT, BHA.

### I.2.2 : Activité de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) :

La capacité antioxydant par réduction du cuivre a été déterminée en suivant la méthode décrite par Apak et al. (2008) [5].

Cette méthode est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre ( $Cu^{+2}$ ) $NC_2-Cu^{+2}$ . En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproéne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe  $Cu^{+2}$ -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de  $Cu^{+2}$ -Nc qui absorbe à 450 nm.

La méthode citée est rapportée comme un test peu coûteux et simple pour étudier l'activité antioxydante des plantes. Un volume de 0,5 ml d'extraits testés, tampon d'acétate d'ammonium (1M, pH 7,0), a été ajouté à 1 ml de chlorure de dihydrate (10 mM) et 1 ml de néocuproïne (7,5 mM) et 0,6 ml d'eau désionisée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

Le butylhydroxytoluène (BHT) a été utilisé comme étalon. Les résultats ont été donnés en tant qu'absorbance.

### **I.2.3 : Activité de la capacité antioxydant totale (CAT) :**

La capacité antioxydant totale a été évaluée par la méthode au phosphomolybdène décrite par Prieto et al (1999) [6].

Cette technique est basée sur la réduction des molybdate Mo (VI) en molybdène Mo (V) en présence d'un antioxydant avec la formation d'un complexe vert (phosphate /Mo (V)) a pH acide. C'est un teste quantitatif puisque les résultats sont exprimé en nombre d'équivalent d'acide gallique.

Un mélange de 3 ml de la solution de phosphomolybdène (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM) et 1 ml de l'extrait testé a été incubé à 90 ° C. Après 60 minutes, l'absorbance a été mesurée à 695 nm.

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent acide ascorbique par g d'extrait végétal (mg d'AAE / g d'extrait végétal).

### **I.3. Evaluation de l'activité antibactérienne**

Dans le but d'investiguer l'activité antimicrobienne des extraits acétate d'éthyle et butanolique à des quantités suffisantes de *G. microcephala*, ainsi que celles des acides gras, la méthode de microdilution modifiée a été utilisée

#### **I.3.1. Les souches microbiennes**

Le criblage de l'activité antibactérienne éventuelle a été réalisé en utilisant des bactéries pathogènes du poisson : *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* et *Vibrio anguillarum*. En outre, quatre bactéries à gram-positif (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375), quatre bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 11229, ATCC 35218, O157 : H7, *Yersinia enterocolitica* NCTC 11175) et deux levures pathogènes (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida glabrata* RSKK 04019) ont également été testées.

Toutes les cultures bactériennes ont été incubées à 37 ° C pendant 24 heures alors que la culture de levure a été incubée à 30 ° C pendant 48 heures.

### I.3.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont comme suit :

- La gélose nutritive (GN) a été utilisée pour cultiver les bactéries humaines.
- le bouillon de soja tryptique (BST) a été utilisé pour cultiver les bactéries poisson.
- le milieu levure Dextrose Peptone (LDP) a été utilisé pour cultiver la levure.

### I.3.3. Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)

L'effet inhibiteur des extraits acétate d'éthyle, butanolique et des acides gras a été évalué en utilisant la méthode de diffusion de disque décrite par Murray et al (1995) [7].

Tous les extraits testés ont été dissous dans du sulfinylbismethane méthylsulfoxyde (DMSO) et stérilisés par filtration en utilisant 0,45 um de Millipore. Un volume de 100 pi de micro-organismes testés précédemment cultivés a été ajusté à 0,5 McFarland et rassemblé dans une boîte de Pétri.

Les différents extraits ont été évalués à une concentration finale de 2000 µg pour les extraits acétate d'éthyle et butanolique et de 1000 µg pour les acides gras. Ampicilline (Amp, 10µg / disque), Fluconazole (FCA, 25µg / disque) et Gentamycine (CN, 10µg / disque) ont été utilisés comme contrôle positif. L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en millimètres tout autour des disques.

### I.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMB / CMF)

Les valeurs minimales des concentrations bactéricides et fongicides (CMB / CMF) ont été déterminées en utilisant le protocole décrit par Chandrasekaran et Venkatesalu (2004) [8] avec une légère modification. La concentration des extraits testés variait de 60,00 à 0,94 mg / ml. Une suspension standardisée de chaque micro-organisme testé ajusté à 0,5 turbidité standard McFarland a été utilisée. Le MBC et le MFC ont été déterminés comme les plus faibles concentrations détruisant 99.9% de l'inoculum (effet bactéricide des substances testées).

- **Les analyses statistiques**

Les données de toutes les activités utilisées ont été rapportées en moyenne  $\pm$  SD et soumises à une analyse statistique en utilisant le logiciel SPSS (version 20.0) et l'origine 8. L'analyse de variance unidirectionnelle et bidirectionnelle (ANOVA) suivie par Tukey post-hoc et les tests de Bonferroni ont été utilisés pour analyser les différences entre les traitements ( $P < 0,05$ ). Les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) pour les dosages spectrophotométriques ont été calculés à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

**Références Bibliographiques**

- [1] Singleton, V.L & Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.*, **1965**, 16(3), 144–153.
- [2] Slinkard, K. & Singleton, V.L., *Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods*. Am. J. Enol. Viticult. **1977**, 28: 49 - 55.
- [3] Quettier-Deleu, A.C. Gressier, C. B. Vasseur, A.J. Dine, C.T. ; Brunet, C.C. Luyckx, C.M. Cazin, C.J. Bailleul, B.C & Trotin, B.F., *Phenolic compounds and antioxidant activities of beekwheat (*Fagopyru mesculentum* Moench) hulls and flour*. J. Ethnopharmacol. **2000**, 72: 35-42.
- [4] Oyaizu, M., *Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine*. Jpn. J. Nutr. **1986**, 44: 307 - 315.
- [5] Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M. & Karademir, S.E., *Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay*. Microchim Acta, **2008**, 160: 413 - 419.
- [6] Prieto, P.; Pineda, M. & Aguilar, M., *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphormolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E*. Anal Biochem, **1999**, 269: 337 - 341.
- [7] Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Tenover, R.H., *Manual of clinical microbiology*, Washington, DC: ASM Press, **1995**, p1327-1341.
- [8] Chandrasekaran M. & Venkatesalu V., *Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds*, J. Ethnopharmacol, **2004**, 91: 105-108.

**CHAPTER II :**  
**RESULTATS ET DISCUSSIONS**



### II.1. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux.

Les dosages des phénols et flavonoïdes des extraits acétate d'éthyle et butanoliques de *Genista microcephala* Coss & Dur sont illustrées dans (tableau 33).

**Tableau 33** : dosage des phénols et flavonoïdes totaux de *G. microcephala*.

Extract	Dosage des phénols totaux (DPT) *	Dosage des flavonoïdes totaux (DFT) *
	(mg GAE/g)	(mg RE/g)
Acétate éthyle	690.32±69.10	159.94±0.11
Butanol	661.91±17.21	66.83±5.01

\* Les valeurs sont indiquées en tant que moyennes ± S.D. de trois mesures.

DPT: dosage des phénols totaux (mg GAE g<sup>-1</sup> extrait)

DVT: dosage des flavonoïdes totaux (mg RE g<sup>-1</sup> extrait)

Les extraits acétate d'éthyle et butanolique ont montrés une teneur en phénols totaux de 690,32 ± 69,10 et 661,91 ± 17,21 mg GAE / g respectivement sans différence significative entre les deux solvants utilisés. Tandis que, la différence de la teneur en flavonoïdes totaux s'est révélée être significative avec la valeur la plus élevée pour l'extrait d'acétate d'éthyle 159,94 ± 0,11 mg QE / g d'extrait de plante. Les valeurs trouvées sont plus élevées que celles rapportées par Hanganu et al [1] pour *G. tinctoria* et *G. Sagittalisare*. Alors que, Bouchouka et al [2, 3] ont rapporté des valeurs de 459,28 mg GAE / g et 242 mgQE / g pour *G. Sahara*. Nos résultats sont conformes à l'enquête précédente sur les espèces du genre *Genista*. L'extrait acétate d'éthyle présentait les valeurs les plus élevées par rapport à l'extrait butanolique.

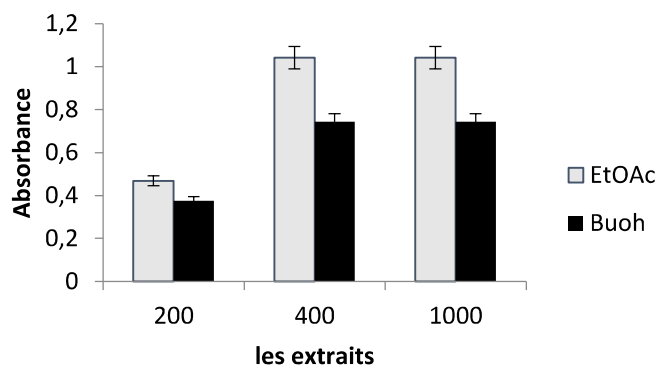
### II.2. Activité antioxydant :

L'oxydation est considérée comme un processus complexe utilisant différents mécanismes. Les capacités réductrices des extraits de *G. microcephala* ont été mesurées à l'aide des méthodes suivantes : FRAP, de CUPRAC et CAT.

#### II.2.1. Activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP):

Les résultats de l'activité (FRAP) sont résumés dans la figure 64. Similaire au TPT, aucune différence significative n'a été trouvée entre les extraits acétate d'éthyle et butanoliques. Cependant, aucune corrélation n'a été détectée entre FRAP et DPT. En comparaison avec le rapport précédent sur le genre *Genista* sp, *G. microcephala* semble montrer des résultats

similaires car *G. vuralii* et *G. sandrasica* ont rapporté respectivement des valeurs de  $1,005 \pm 0,018$  et  $0,860 \pm 0,046$  pour une concentration de  $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$  [4].



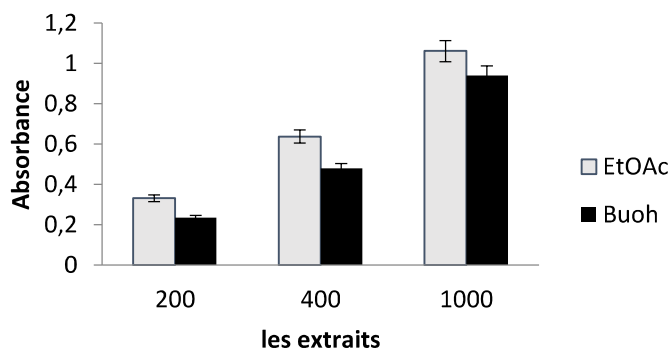
**Figure 64:** Activité de réduction de l'activité de l'ion ferrique (FRP) de *G. microcephala*.

\* Les valeurs sont indiquées en tant que moyennes  $\pm$  S.D.

L'extrait a été évalué dans une gamme de concentration de 200 à  $1000 \mu\text{l} / \text{ml}$ .

### II.2.2. Activité de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) :

En accord avec le DFT, le test CUPRAC a démontré l'activité antioxydante plus élevée pour l'extrait acétate d'éthyle (figure 65). La différence a été jugée significative.



**Figure 65:** Activité de réduction de la puissance du Cupric ion (CUPRAC) de *G. microcephala*.

\* Les valeurs sont indiquées en tant que moyennes  $\pm$  S.D.

L'extrait a été évalué dans une gamme de concentration de 200 à  $1000 \mu\text{l} / \text{ml}$ .

### II.2.3. Activité de la capacité antioxydant totale (CAT) :

La capacité antioxydant totale a été évaluée en utilisant un dosage au phosphomolybdène. Les résultats sont exprimés en équivalent acide ascorbique et représentés sur la figure 66. La valeur la plus faible a été observée pour l'extrait butanolique avec  $421,08 \pm 31,55$  mg d'AAE / g d'extrait de plante. Conformément aux dosages précédents, l'extrait acétate d'éthyle a montré la valeur la plus élevée. Une corrélation élevée a été observée entre le test TAC et DPT et DFT, avec un coefficient de corrélation  $R_2 = 0,99$  et  $0,97$  respectivement. Cette observation est en accord avec des recherches antérieures sur l'extrait végétal de Leguminosae en particulier les graines de *Vigna sub terranea* [5].

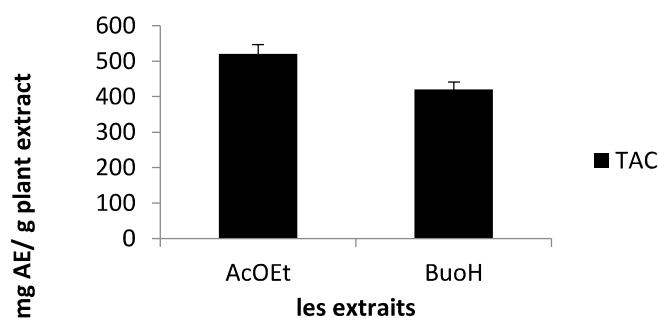


Figure 66: La capacité Antioxydante total de *G. microcephala*.

Notre étude sur l'extrait d'acétate d'éthyle de *G. microcephala* Coss. Et Dur conduit à l'isolement de quatre isoflavonoïdes à savoir : la genistein, la daidzein, le 5-méthoxy-daidzein, la genistein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside et la daidzein 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside. Les flavonoïdes isolés peuvent être responsables de l'activité antioxydant observée. Dans la plupart des cas, les formes aglycone de genistein et diadzein et glycosylé sont considérées comme des phytoalexines [6, 7]. De nombreuses études ont confirmées que les flavonoïdes et les isoflavonoïdes possèdent une très puissante activité antioxydant [2]. L'activité citée est profondément influencée par la présence des flavonoïdes libres ou glycosylés [8]. En outre, Foti et al (2005) a démontré que la genistein et la diadzein présentaient un fort potentiel antioxydant [9]. En comparaison avec les formes glycosylées telles que les hétérosides 7-*O*-glucoside de la genistein et la 4', 7-di-*O*-glucoside isoprunétine, les isoflavonoïdes libres ou les aglycones se sont révélés plus actifs [8]. D'autres chercheurs ont montrés que la genistein avait une faible capacité antioxydant, ce qui suggère qu'elle pourrait ne pas avoir un effet aussi important qu'un antioxydant [10]. Dans une étude récente a rapporté que la genistein et l'isoprunétine ne montrent pas d'activité antioxydant [11]. D'autres investigations sur les isoflavonoïdes sont nécessaires et peuvent aider à mieux comprendre leur rôle dans l'activité antioxydant du produit naturel.

### II.3. L'activité antimicrobienne

#### II.3.1. L'activité antimicrobienne des extraits

L'activité antimicrobienne des extraits acétate d'éthyle et butanoliques de *G. microcephala* contre les bactéries pathogènes pour l'homme et les poissons a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose et la détermination de (CMB et CMF). Les résultats sont illustrés dans le tableau 34.

**Tableau 34** : L'activité antimicrobienne des extraits de *G.microcephala*.

Les microorganisms	CMB <sup>a</sup> /CMF <sup>b</sup> (mg/ml)		Le diamètre des zones d'inhibitions <sup>c*</sup> (mm)		Le diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques <sup>c*</sup> (mm)		
	AEE	BE	AEE (1000 µg/disc)	BE (1000 µg/disc)	Amp	CN	FCA
<i>B.cereus</i> RSKK 863	3.75	15.00	11.32±0.36	10.52±0.11	37.23±0.21	13.89±0.68	-
<i>E. coli</i> O157:H7	7.50	15.00	10.10±0.43	8.39±0.62	26.54±0.89	12.27±1.25	-
<i>M. luteus</i> NRRL B-4375	15.00	15.00	9.62±0.20	9.05±0.32	26.25±0.26	13.85±0.21	-
<i>Y. enterocolitica</i> NCT C 11175	15.00	30.00	10.08±0.24	7.42±0.35	25.25±0.29	22.13±0.07	-
<i>E. coli</i> ATCC 11229	15.00	15.00	10.67±0.37	9.09±0.16	24.72±0.15	12.32±0.61	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.50	7.50	12.49±0.81	9.43±0.74	24.93±1.34	14.65±0.19	-
<i>E.coli</i> ATCC 35218	15.00	15.00	9.44±0.57	8.93±0.17	24.03±0.42	13.73±0.49	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	15.00	- <sup>d</sup>	9.11±0.27	-	26.75±0.66	14.77±0.05	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15.00	30.00	11.61±0.27	9.49±0.87	-	-	21.85±1.76
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	7.50	30.00	13.78±0.92	10.33±0.66	-	-	25.06±1.92
<i>L. garvieae</i>	30.00	30.00	14.33±1,09	9.24±0.13	30.17±2.39	11.77±1.48	-
<i>V.anguillarum</i> A4	15.00	30.00	16.08±0.18	9.83±0.16	29.72±1.51	10.76±0.66	-
<i>Y. ruckeri</i>	30.00	30.00	13.17±0.63	9.31±0.17	29.50±0.71	17.16±0.62	-

AEE: Extrait acétate d'éthyle.

BE: Extrait butanolique.

Amp : Ampiciline. GN : Gentamicine. FCA : Fluconazole.

<sup>a</sup>: Concentration minimale bactéricidale (CMB).

<sup>b</sup>: Concentration minimale fongicide (CMF).

<sup>c</sup>: Diamètre de la zone d'inhibition incluant le diamètre du disque.

\* Les valeurs sont indiquées en tant que moyennes  $\pm$  écart-type de trois expériences distinctes.

<sup>d</sup>: Indique pas d'activité antimicrobienne.

La méthode de diffusion du disque a produit une zone claire avec des diamètres allant de  $7,42 \pm 0,35$  à  $16,08 \pm 0,18$  mm. Les diamètres obtenus sont très faibles par rapport à l'ampicilline ( $24,03 \pm 0,42$  à  $37,23 \pm 0,21$  mm). La gamme CMB et CMF était de 3,75 à 30 mg / ml. Aucune différence significative n'a été observée entre les extraits acétate d'éthyle et butanoliques. Les extraits testés ont démontrés la plus faible concentration d'inhibition pour *B.cereus* RSKK 863 indiquant que cette souche est la plus sensible. Aucun effet n'a été détecté pour l'extrait butanolique sur *L. monocytogenes* ATCC 7644. Parmi les trois classes de micro-organismes, *G. microcephala* semble avoir plus d'effet sur les bactéries à Gram-positives. Alors que, pour les bactéries à Gram négatives, les deux extraits semblent avoir le même effet sur *E. coli* O157: H7, ATCC 11229 et ATCC 35218. Les valeurs de CMB les plus élevées ont été obtenues pour les bactéries de poissons (*L. garvieae*, *V.anguillarumA4*, *Y. ruckeri*) indiquant un effet moins prononcé. Les CMF de l'extrait butanolique sont deux et quatre fois plus élevés que l'extrait acétate d'éthyle pour *C. albicans* ATCC 10231 et *C. glabrata* RSKK 04019, respectivement. Les résultats suggèrent que le solvant acétate d'éthyle pourrait être le meilleur solvant en termes d'essai d'activité antifongique.

Nos résultats sont en accord avec les rapports précédents sur le genre *Genista*. Erdemoglu et al. [12] ont étudié les activités antibactériennes et antifongiques de l'extrait alcaloïde de *G. vuralii* et ont rapporté un effet sur *Staphylococcus aureus* et *Candida krusei*. L'extrait alcaloïde de *G. microcephala* a également été trouvé pour inhiber la croissance de *Escherichia coli* [13], dans d'autres études trouvé que les extraits aqueux et éthanoliques de *G. microcephala* n'inhibent pas la croissance sur *Escherichia coli*, mais ont un effet sur *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermis* [14]. De plus, Bouchouka et al. [2] ont rapporté une bonne activité de *G.sahara* sur la souche bactérienne *S.aureus*.

### II.3.2. Activité antimicrobienne de l'extrait des acides gras

L'activité antimicrobienne des composants des acides gras des fleurs, des parties aériennes et un mélange des deux parties de *G. microcephala* a également été étudiée et illustrée dans (Tableau 35, Figure 67). Selon les résultats de la méthode de diffusion sur disque, toutes les parties testées présentent une faible activité sur les levures, les bactéries à Gram négatif, Gram positif et les bactéries de poissons de diamètre variant de  $7,16 \pm 0,17$  à  $10,61 \pm 0,11$ . L'antibiotique et l'antifongique utilisés comme témoin présentent des valeurs remarquablement

plus élevées avec une plage de  $24,03 \pm 0,42$ - $37,23 \pm 0,21$  et de  $21,85 \pm 1,76$ - $25,06 \pm 1,92$  pour la gentamicine et le fluconazole, respectivement.

En ce qui concerne CMB et CMF, la valeur la plus faible a été obtenue pour l'inhibition de *B.cereus* RSKK 863 par partie aérienne (3,75 mg / ml). Les fleurs semblent agir de la même manière sur *Y. enterocolitica* NCTC 11175, *M. luteus* NRRL B-4375, *Y. enterocolitica* NCTC 11175, *E. coli* O157 : H7, ATCC 11229 et ATCC 35218. Alors que la partie aérienne et un mélange des deux parties de *G. microcephala* n'a pas affecté la croissance de toutes les bactéries citées. Les valeurs de CMB les plus élevées ont été obtenues pour les bactéries de poisson. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les activités antimicrobiennes des composants des acides gras des fleurs, des parties aériennes et un mélange des deux parties de *G. microcephala* sur les bactéries des poissons.

Des recherches récentes sur la composition en huile distillée de *G. microcephala* ont montré une teneur en acide gras de 64,4% avec 0,8% d'acide caprylique, 21,5% d'acide laurique, 8,7% d'acide myristique, 29,6% d'acide palmitique, 1,1% d'octadécan-9.12-diénoate linoléique et 0,2% d'acide stéarique. Signifie que la nature de cette huile est un mélange des acides gras. Cette étude est limitée pour trois bactéries mais notre étude est très variable, nous avons utilisé douze bactéries, deux bactéries de poissons et deux levures pathogènes, exercice sur trois parties de plante : les fleurs, la partie aérienne et le mélange des deux parties. On peut dire que notre étude complète l'étude de Lograda et al. [15].



**Figure 67:** L'activité antimicrobienne de l'extrait des acides gras.

Tableau 35 : L'activité antimicrobienne de l'extrait des acides gras de *G.microcephala*.

Les microorganismes	CMB <sup>[a]</sup> /CMF <sup>[b]</sup> (mg/ml)			Le diamètre des zones d'inhibitions <sup>[c]*</sup> (mm)			Le diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques <sup>[c]*</sup> (mm)		
	fleur-E	Aérienne-E	Mix-E	Fleur-E (1000 µg/disc)	Aérienne-E (1000 µg/disc)	Mix-E (1000 µg/disc)	Amp	GN	FCA
<i>B.cereus</i> RSKK 863	7.50	3.75	7.50	9.65±0.44	10.01±0.70	9.54±0.39	37.23±0.21	13.89±0.68	-
<i>E. coli</i> O157:H 7	15.00	- <sup>d</sup>	-	8.66±0.41	-	-	26.54±0.89	12.27±1.25	-
<i>M. luteus</i> NRRL B-4375	15.00	-	-	10.36±0.24	-	-	26.25±0.26	13.85±0.21	-
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 11175	15.00	-	-	8.10±0.33	-	-	25.25±0.29	22.13±0.07	-
<i>E. coli</i> ATCC 11229	15.00	-	-	10.61±0.20	-	-	24.72±0.15	12.32±0.61	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.50	-	15.00	10.61±0.11	-	11.65±0.09	24.93±1.34	14.65±0.19	-
<i>E.coli</i> ATCC 35218	15.00	-	-	9.86±0.93	-	-	24.03±0.42	13.73±0.49	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	15.00	30.00	30.00	9.44±0.54	7.16±0.17	7.32±0.36	26.75±0.66	14.77±0.05	-

<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7.50	30.0 0	7.50	10.19±0.5 6	10.15±0.7 4	11.32±0.8 8	-	-	21.85±1.76
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	7.50	15.0 0	15.0 0	10.33±0.1 2	9.36±0.41	10.16±0.4 5	-	-	25.06±1.92
<i>L. garvieae</i>	30.0 0	30.0 0	30.0 0	9.53±0.14	9.43±0.52	7.01±0.36	30.17±2.3 9	11.77±1. 48	-
<i>V. anguillarum</i> A4	30.0 0	30.0 0	30.0 0	9.76±0.70	9.73±0.43	11.97±0.2 2	29.72±1.5 1	10.76±0. 66	-
<i>Y. ruckeri</i>	30.0 0	30.0 0	30.0 0	10.30±0.3 8	9.52±0.11	8.74±0.32	29.50±0.7 1	17.16±0. 62	-

Aérienne-E: partie aérienne de l'extrait végétal acide gras.

Fleur-E: extrait de fleur d'acide gras.

Mix-E: mélange de l'extrait partie aérienne et fleur d'acides gras.

Amp : Ampiciline. GN : Gentamicine. FCA : Fluconazole.

<sup>a</sup>: Concentration minimale bactéricidale (CMB).

<sup>b</sup>: Concentration minimale fongicide (CMF).

<sup>c</sup>: Diamètre de la zone d'inhibition incluant le diamètre du disque.

\* Les valeurs sont indiquées en tant que moyennes ± écart-type de trois expériences distinctes.

<sup>d</sup>: Indique pas d'activité antimicrobienne.

### Conclusion :

Le potentiel antioxydant de *Genista microcephala* Coss & Dur a été déterminé par 3 méthodes différentes : FRAP, CUPRAC, CAT. La plante possède une bonne activité antioxydant grâce à sa composition riche en flavonoïdes et polyphénols, révélée par le screening chimique et par le dosage des polyphénols et flavonoides totaux.

L'extrait acétate d'éthyle a présenté la meilleure activité antibactérienne contre *S. aureus*, *B. cereus* et *Escherichia coli* O157 : H7, tandis que les bactéries de poissons : *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* et *Vibrio anguillarum*. . De plus, les CMF de l'extrait butanolique sont deux et quatre fois supérieurs à ceux de l'extrait acétate d'éthyle pour *C. albicans* ATCC 10231 et *C. glabrata* RSKK 04019. Les résultats de la recherche suggèrent que le solvant acétate d'éthyle pourrait être le meilleur solvant en termes de test d'activité antifongique. Cependant, l'extrait de fleur des acides gras était plus actif contre *Y. enterocolitica* NCTC



11175, *M. luteus* NRRL B-4375, *Y. enterocolitica* NCTC 11175, *E. coli* O157 : H7, ATCC 11229 et ATCC 35218.

**Références Bibliographiques**

- [1] Hanganu, D.; Olah, N.; Benedec, D.; Mocan, A.; Crisan, G.; Vlase, L.; Popicaand, I. & Oniga, I., *Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of Genistatinctoria L. and Genistaellasagittalis (L.) Gams (Fabaceae)*, Pak. J Pharm Sci **2016**, 29 (1), 301-307.
- [2] Bouchouka, E.; Djilani, A. & Bekkouche, A., *Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from Algerian Sahara*. Acta Sci Pol Technol Aliment. **2012**, 11 (1), 61-65.
- [3] Chabbah, K.; Marchioni, E.; Sarri, D.; Menad, A.; Mekkiou, R.; Boumaza, O.; Seghiri, R.; Benayache, S. & Benayache, F., *HPLC-UV profile of GenistaulicinaSpach. (Fabaceae) extracts and in vitro antioxidant activity*. International Journal of Phytomedicine. **2016**, 8 (3), 398-403.
- [4] Orhan, I.E.; Tosun, F.; Tamer, U.; Duran, A.; Alan, B. & Koki, A.F., *Quantification of genistein and daidzein in two endemic Genista species and their antioxidant activity*. J Serb Chem. Soc. **2011**, 76 (1), 35 - 42.
- [5] M'baiogaou, A.; Hema, A.; Ouédraogo, M.; Palé, E.; Naitormbaide, M., Mahamout, Y. & Mouhoussine, N., *Etude comparative des teneurs en polyphénols et enantioxydants totaux d'extraits de graines de 44 variétés de voandzou (Vignasubterranea (L.) Verdcourt)*. Int J Biol. Chem. Sci. **2013**, 7 (2), 861-871.
- [6] Perkins, A.G. & Newbury, F.G., *The colouring matters contained in dyer's broom (Genista tinctoria) and heather (Calluna vulgaris)*. J. Chem. Soc. **1899**, 75: 830-839.
- [7] Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Wanabea, S.; Iton, N.; Shibuya, M. & Fukami, Y., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. The J. Biol. Chem. **1987**, 262 (12), 5592-5595.
- [8] Foti, P.; Erba, D.; Riso, P.; Spadafranca, A.; Criscuoli, F. & Testolin G., *Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes*. Arch Biochem. Biophys. **2005**, 433: 421 - 427.
- [9] Arora, A.; Nair, M.G. & Strasburg, G.M., *Antioxidant Activities of Isoflavones and Their Biological Metabolites in a Liposomal System*. Archives Of Biochemistry and Biophysics, **1998**, 356 (2), 133 - 141.
- [10] Mitchell, J.H.; Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Morrice, P.C.; Collins, A.R. & Duthie, G.G., *Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems*. Arch. Biochem. Biophys. **1998**, 360 (1), 142 - 148.

- [11] Promden, W.; Monthakantirat, O.; Umehara, K.; Noguchi, H. & D.E.-Eknamkul, W., *Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from Dalbergiaparviflora*. *Molecules*. **2014**, 19 (2), 2226-2237.
- [12] Erdemoglu, N.; Tosun, F. & Eroglu, Y., *LC-MS Analysis of daidzein in the Turkish Genista species*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2006, 42 (5), 517-519.
- [13] Edrah S.M.; Alafid F.; Imramovský A.; Altwair K.; Alkhumsi S.I. & Hrdina R., *Phytochemical Screening And Antibacterial Activity Of Genista Microcephala And Rosmarinus Officinalis Extracts From Libyan's Regions*. *Int J. Res. Ayurveda Pharm.* **2017**, 8 (4), 52-56.
- [14] Zellaghi, A.; Rhouati, S.; Creche, J.; Toth, G.; Ahmed, A.A.; Pare, P.W., *Anti-microbial activity of the alkaloid extract of Genistamicrocephala*. *Revista Latino. Amer. Quim.* **2004**, 32: 109-114.
- [15] Lograda, T.; Ramdani, M.; Figueredo, G.; Chalchat, J.C. & Chalard, P., *Essential oil composition and antimicrobial activity of Genista microcephala Coss. Et Dur*. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2012, 2 (1), 75-79.

# **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

### Conclusion Générale

Nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification des métabolites secondaires de type flavonoïdes issus de deux plantes appartenant à la Flore algérienne : *Genista microcephala* Coss & Dur, famille des Fabaceae et *Jurinea humilis* DC, famille des Astéraceae.

En faisant appel aux différentes méthodes modernes, particulièrement les analyses spectroscopiques. Les structures des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D, UV, la spectrométrie de masse (SM) et par la comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu identifier les structures de huit composés comme suit :

Cinq isoflavonoïdes ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *G. microcephala* :

- **Genistein** : 4',5,7-Trihydroxyisoflavone (nouveau dans l'espèce).
- **Daidzein** : 7, 4' - Dihydroxy isoflavone (nouveau dans l'espèce).
- **5-méthoxy Diadzein** (nouveau dans l'espèce).
- **Genistin** : Genistein 7-O- $\beta$ -D-glucoside (nouveau dans l'espèce).
- **Daidzin** : Diadzein 7-O- $\beta$ -D-glucoside (nouveau dans l'espèce).

Trois flavonoïdes ont été isolés de l'extrait n-butanolique de l'espèce *Jurinea humilis*:

- **Lutéoline 3'-O- $\beta$ -D- Glucoside** : 5, 7,4'trihydroxy, 3'-O- $\beta$ -D- glucosyl-flavone (nouveau dans l'espèce et dans le Genre).
- **Isorhamnetine-3-O-rutinoside** : 5, 7,4'tri-hydroxy, 3'methoxy, 3-O-rhamnoglucosyl-flavone (nouveau dans l'espèce et dans le Genre).
- **Rutine** : *Quercétine 3-rutinoside* (nouveau dans l'espèce).

Trois méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydant des extraits acétate d'éthyle et n-butanolique du *Genista microcephala*, ainsi que la détermination du contenu phénolique et flavonique. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour les extraits acétate d'éthyle, n-butanolique et l'extrait des acides gras, contre huit bactéries pathogènes, trois bactéries de poissons et 2 levures pathogènes. Les résultats d'étude des activités biologiques des extraits de l'espèce *G. microcephala* sont comme suit:

- Les extraits acétate d'éthyle et butanol ont manifestés la meilleure activité avec les tests CUPRAC et FRAP.
- La capacité antioxydante totale (CAT) a été évaluée en utilisant un dosage au phosphomolybdène offrant une modeste activité.

## CONCLUSION GENERALE

- L'extrait acétate d'éthyle a manifesté la meilleure activité antioxydant avec tous les tests appliqués (FRAP, CUPRAC, CAT) par rapport à l'extrait butanolique.
- Les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol ont montrés un dosage phénolique total élevé sans différence significative entre les deux solvants utilisés. Par contre la différence de la teneur des phénols totaux s'est révélée être significative avec la valeur la plus élevée pour l'extrait d'acétate d'éthyle  $159,94 \pm 0,11$  mg QE / g d'extrait de plante.

Au cours de cette étude nous avons également réalisés un test antibactérien pour les extraits acétate d'éthyle et butanol plus l'extrait des acides gras vis-à-vis quelques germes pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que l'extrait de *G. microcephala* agit différemment sur les espèces bactériennes testés. On note une meilleure activité antimicrobienne avec l'extrait des acides gras des fleurs.

L'ensemble de ces résultats montrent que les produits d'origine naturelle sont en liaison étroite avec la pharmacologie et la médecine. Enfin les résultats obtenus de cette étude ont fait l'objet d'une publication et quelques communications internationales.

## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales Algériennes, une Fabaceae (*Genista microcephala* coss & dur) et une Asteraceae (*Jurinea humilis* DC). L'étude phytochimique des deux plantes a permis l'identification de cinq isoflavonoïdes des extraits acétate d'éthyle et butanoliques du *G.microcephala* et trois flavonoides de l'extrait butanoliques du *J.humilis*, isolées pour la première fois dans les deux plantes. Les structures ont été élucidés par les différentes méthodes spectrales RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, HMBC et HMQC), UV, la spectrométrie de masse (SM) et par la comparaison avec les données de la littérature. L'étude biologique a été réalisée pour déterminer le contenu phénolique et flavonique et évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes de *Genista microcephala*. L'activité antioxydante a été évaluée par divers tests *in vitro*, y compris pouvoir réducteur de l'ion ferrique (PRAF), la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) et la capacité antioxydante totale (CAT). L'activité antimicrobienne des extraits acétate d'éthyle, des butanoliques, et des acides gras des différentes parties de la plante, a été évaluée contre des bactéries pathogènes humaines, des poissons et des levures pathogènes. Les méthodes utilisées étaient la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des concentrations bactéricides et fongicides minimales (CMB et CMF). L'extrait acétate d'éthyle était le plus actif en ce qui concerne l'activité antioxydant et antimicrobienne. L'activité testée semble être due à la teneur élevée de cet extrait par les isoflavonoïdes.

**Mots clés :** Activité antimicrobienne, activité antioxydante, acides gras, *Genista microcephala*, *Jurinea humilis*, composés phénoliques.

## **Abstract**

This work is concerning the phytochemical study of two Algerian plants, the first belonging to the Fabaceae family (*Genista microcephala* coss & dur) and Asteraceae family (*Jurinea humilis* DC). The phytochemical study of the two Algerian medicinal plants allowed the identification of five isoflavonoids from ethyl acetate and butanol extracts of *G. microcephala* and three flavonoids from butanol extract of *J. humilis*, isolated for the first time in both plants, The structures of compounds were elucidated by various spectroscopic methods spectral: 1D and 2D NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMBC and HMQC), UV, mass spectrometry (MS) and by comparison with literature values. The biological study carried out to determine the phenolic content and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of *Genista microcephala*. Antioxidant activity was evaluated by various *in vitro* tests, including Ferric Ion Reducing Activity (FRAP), Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC), and total antioxidant capacities (TAC). The antimicrobial activity of ethyl acetate and butanolic extracts of *G. microcephala* in addition of fatty acids content of different parts of plant was evaluated against human pathogenic bacteria, fish bacteria and yeast. The used methods were agar diffusion method and the determination of minimal bactericidal and fungicidal concentrations (MBC and MFC). Ethyl acetate extract was the most active regarding antioxidant and antimicrobial assays. The tested activity seems to be due to the high content of this extract on isoflavonoids.

**Key words:** Antimicrobial activity, antioxidant activity, fatty acids, *Genista microcephala*, *Jurinea humilis*, phenolic compounds.



## ملخص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية للنبتين من الجزائر (*Genista microcephala* Coss & Dur) المنتمية للعائلة بقوليات و(*Jurinea humilis* DC) المنتمية للعائلة المركبة. وقد أدت الدراسة الفيتوكيميائية إلى تحديد خمسة من الأيزوفلافونويدات المفصولة من مستخلصات خلاص الايثيل والبيوتانول للنبته *Genista microcephala* Coss & Dur بالإضافة إلى ثلاثة فلافونويدات من المستخلص البيوتانولي من النبتة *J. humilis*. الجدير بالذكر أن هذه المركبات تم فصلها لأول مره من كلا النبتتين. واستخدمت طرق التحليل الطيفي المختلفة في البرهنة على البنى الكيميائية للمركبات المعزولة مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية البعد: ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, HMQC, HMBC) و مطياف الأشعة تحت بنفسجية المرئية (UV) ومطيافية الكتلة (SM). كما كان إهتمامنا بتثمين الفعالية البيولوجية بتقييم الفعالية المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة للنبته *Genista microcephala*. كما كان إهتمامنا بتثمين الفعالية البيولوجية لتحديد محتوى الفينول والفلافونيد و تقييم الفعالية المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة للنبته *Genista microcephala*. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال العديد من الفحوصات المخبرية: (FRAP)، (CUPRAC)، (CAT). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات لكل من مستخلص خلاص الايثيل، بالإضافة إلى مستخلص الأحماض الدهنية لأجزاء مختلفة من النبات المدروس ضد البكتيريا المسببة للأمراض البشرية وبكتيريا الأسماك والخميرة، وقد استخدمنا طريقة الانتشار في تحديد الأثر التثبيطي بتقدير التركيزات الأدنى للبكتريا والفطريات (MBC, MFC). كما كان مستخلص خلاص الايثيل الأكثر نشاطا فيما يتعلق بالفعالية المضادة للأكسدة و يبدو أن هذه الفعالية ترجع لاحتواء المستخلص على العدد المرتفع من الأيزوفلافونويدات.

**كلمات مفتاحية:** النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، الأحماض الدهنية، *J. humilis*، *G. microcephala*، المركبات الفينولي.

**Acta Scientifica Naturalis**

Former Annual of Konstantin Preslavsky University – Chemistry, Physics, Biology, Geography  
Journal homepage: <http://www.shu.bg>

Received: 09.2018

Accepted: 11.2018

**PHENOLIC CONTENTS, *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL  
ACTIVITIES OF *GENISTA MICROCEPHALA* COSS. & DUR.**

**Djamila Maanani<sup>1</sup>, Narimane Segueni<sup>1</sup>, Salah Rhouati<sup>1</sup>, Yavuz Selim Çakmak<sup>2</sup>, Maltem  
Asan-Ozusaglam<sup>2</sup>, Abdghani May<sup>3</sup>, Amar Zellagui<sup>1</sup>, Salah Akkal<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Natural Product and Organic Synthesis Campus Chaabat Ersas, Faculty of Science, Department of Chemistry, University Mentouri–Constantine 1, 25000, Constantine, Algeria.

<sup>2</sup>Scientific and Technological Application and Research Center, Biotechnology Laboratory, Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Arts, Aksaray University, 68100, Aksaray, Turkey.

<sup>3</sup>Chemistry Laboratory of Materials and Living: Activity, Reactivity, Faculty of Science, Department of Chemistry, Campus Chaabat Ersas, University Mentouri–Constantine 1, 25000, Constantine, Algeria.

<sup>4</sup>Unit of Recherche Valorisation of Natural resources, Bioactive molecules and Analyses Physicochemical and Biological (VARENBIOMOL), Department of Chemistry, Faculty of Science, University Mentouri-Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

**Abstract**

*This study was carried out to determine the phenolic contents as well as to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of *Genista microcephala*. Total phenolic and flavonoid compounds were quantified. Antioxidant activity was evaluated by various *in vitro* tests, including Ferric Ion Reducing Activity (FRP), Cuprac Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC), and total antioxidant capacities (TAC). The antimicrobial activity of ethyl acetate and butanolic extracts of *G. microcephala* in*

8

Corresponding author: salah62dz@gmail.com

DOI: 10.2478/asn-2018-0016

©2018 “K.Preslavsky”University of Shumen. All rights reserved

*addition of fatty acids content of different parts of the studied plant was evaluated against human pathogenic bacteria, fish bacteria and two yeast. The used methods were agar diffusion method and the determination of minimal bactericidal and fungicidal concentrations (MBC and MFC). No significant difference was found between the two used solvents on total phenolic content (TPC). While, difference in total flavonoid content (TFC) were found to be significant. Ethylene acetate extract was the most active regarding antioxidant assay. The tested activity seems to be due to the high content of this extract on isoflavonoids. The tested extracts demonstrated the lowest inhibition concentration for B.cereus RSKK 863.*

**Keywords: Antibacterial activity, Antioxidant activity, fatty acids, Genista microcephala, and Phenolics.**

## Introduction

The genus *Genista* represented by 150 species belongs to the family of *Leguminosae*, subfamily *Papilionaceae*. In the Mediterranean basin 16 species including 11 endemics are located [1]. Many *Genista* species possess medicinal properties related to flavonoids, especially isoflavonoids [2, 3].

Flavonoid compounds have attracted the attention of a number of researchers from different disciplines (biology, chemistry, pharmacy and medicine). They are an important family of antioxidants in plants, fruits and vegetables with no adverse effect on human health [4]. In addition they are cardioprotectors, vasodilators and demonstrate anticancer activities [5]. Some of them play the role of phytoalexins to fight against infections caused by fungi, or by bacteria [6]. Polyphenols are also used in the food industry as an additive, dye, aroma or preservative [7].

*G. microcephala* is used in traditional medicine as antimicrobial agent [8]. Chemical investigations on *G. microcephala* lead to the detection and isolation of several compounds with a wide diversity of structure such as alkaloids, isoflavonoids, terpenes and essential oil [9, 10, 11, 12, 13].

Lograda et al., [12] have reported a significant antimicrobial activity of the genus *Genista* on *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. This activity was correlated to alkaloids and essential oils components.

We aimed in the present study to investigate antimicrobial and antioxidant activities of *G. microcephala* extracts using different solvents. Moreover, fatty acid content of different parts, namely: flower, aerial part and a mixture of the two mentioned parts were also tested.

## Methods

### Plant material.

*Genistami crocephala* Coss et Dur. (1.7 Kg) was collected in 2011 (May-June) during the flowering stage from Chilia (35° 19' 05" north, 6° 38' 13" east), a mountain rising to 2,328 meters above sea level and situated in Algerian East on the border of the wilaya of Batna and Khenchela. The plant was authenticated by Prof. Mohamed Kaabache (Department of Biology, Faculty of Science, University Ferhat Abbass, Setif, Algeria). A Voucher specimen (RS / 71) was deposited at the laboratory of natural product of vegetable origin and organic synthesis. Department of Chemistry. University of Mentouri-Constantine 1. Algeria.

### **Chemicals and Reagents.**

Ferric chlorides, potassium ferricyanide, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, trichloroacetic acid (TCA), butylatedhydroxytoluene (BHT), were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, sulfinyl bis methane methyl sulfoxide (DMSO) and methanol, was acquired from (Sigma–Aldrich GmbH, Sternheim, Germany).

### **Preparation of plant extracts.**

Aerial parts of *G. microcephala* Coss & Dur were extracted using the method described by Maanani et al., [10]. In brief, 70% MeOH was used for maceration. The obtained solution was then concentrated and the formed residue was dissolved in water and then successively extracted with methylene chloride, ethylene acetate and n-butanol affording 1.5g, 2.8g and 57g respectively. The extraction is repeated three times for each solvent.

### **Extraction of fatty acids.**

Fatty acids were also extracted using the method described by IUPAC et al., [14]. Aerial parts (220.3g) flower (15g) and a mixture of both plant parts of *G. microcephala* Coss & Dur (101.3g) was extracted using diethyl ether in a soxhlet extractor during 6h at boiling point (34°C). The solvent was evaporated. The fatty acids is first saponified in the presence of alcoholic potash (0.5 N) forms methyl esteres and then trans esterification in the presence of methanol with 14% BF<sub>3</sub> (v/v).

### **Determination of total phenolic content**

The total phenolic content (TPC) was evaluated using Folin-Ciocalteu method involving the reduction of used reagent by phenolic compounds leading to formation of a blue complex. A volume of 0.5 ml of extract was mixed with 0.5 ml of Sodium carbonate (7.5%) and 0.1 ml Folin-Ciocalteu reagent. The tubes were kept 2 h at room temperature in the dark. The absorbance was then measured at 760 nm. Results were expressed as mg gallic acid equivalents per g of plant extract (mgGAE/ g plant extract) [15].

### **Determination of total flavonoid content**

The total flavonoid content (TFC) based on the formation of flavonoids–aluminium complex was estimated by the method described by Quettier-Deleu et al. [16]. Equal volumes of extract and aluminium chloride solution (2%) were mixed. The absorbance

was measured at 415 nm after 15 min of incubation. Total flavonoid contents were expressed as mg quercetin equivalent per g of plant extract (mg QE/ g plant extract).

### **Antioxidant activity**

The antioxidant activity of ethyl acetate and butanolic extracts were evaluated using three different methods: ferric reducing power (FRP), cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and total antioxidant capacity (TAC).

#### **Reducing power assay (FRP).**

The ferric reducing power was determined according to the method described by Oyaizu et al., [17]. The tested extracts were mixed with 0.5 ml of potassium ferric cyanide (1%) and 0.5 ml of 0.2 M phosphate buffer. After 20 min incubation at 50°C, 0.5 ml of ferric chloride (0.1%), 0.4 ml of trichloroacetic acid (10%) and 2 ml distilled water were added. The absorbance was then measured at 700 nm. The results were expressed as mg ascorbic acid equivalent (AAE) per g of plant extract (mg AAE/ g plant extract).

#### **Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC).**

The cupric ion reducing antioxidant capacity was determined followed the method described by Apak et al., [18]. A volume of 0.5 ml of tested extracts, Ammonium acetate buffer (1M, pH 7.0), was added to 1 ml of Chloride dihydrate (10 mM) and 1 ml of neocuproine (7.5 mM), and 0.6 ml of deionized water. After 30 min incubation at room temperature, the absorbance was measured at 450 nm. Butylatedhydroxytoluene (BHT) was used as standard. Results were given as absorbance.

#### **Total antioxidant capacity (TAC).**

The total antioxidant capacity was evaluated by the phosphomolybdenum method as described by Prieto et al., [19]. A mixture of 3 ml of the phosphomolybdenum solution (sulfuric acid 0.6 M, sodiumphosphate 28mM, and ammonium molybdate 4mM) and 1 ml of the tested extract was incubated at 90°C. After 60 min, the absorbance was measured at 695 nm. The results were expressed as mg of ascorbic acid equivalent per g of plant extract (mg AAE/ g plant extract).

### **Antimicrobial activity**

#### **Microbial strains.**

The screening of an eventual antibacterial activity was performed using pathogenic fish bacteria: *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum*. In addition, four gram-positive bacterias (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375), four Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* NCTC 11175) and two yeasts (*Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida glabrata* RSKK 04019) were also tested. Nutrient agar (NA) and Tryptic Soy Agar (TSA) were used for the cultivation of bacteria while Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium was used to culture the yeast. All bacterial

cultures were incubated at 37°C for 24 h whereas the yeast culture was incubated at 30°C for 48 h.

### Inhibitory effect.

The inhibitory effect of ethyl acetate extract, butanolic extract and fatty acids were evaluated using disc diffusion method. All tested extracts were dissolved in sulfinylbismethane methyl sulfoxide (DMSO) to obtain a final concentration of 2 µg/ml and sterilized by filtration using 0.45 µm Millipore. The disc diffusion assay was performed using the method described by Murray et al., [20]. A volume of 100 µl of tested microorganisms previously cultured were adjusted to 0.5 McFarland and pooled in a petri plate. The different extracts were evaluated at a final concentration of 2000 µg/disc for ethylacetate and butanolic extracts and 1000 µg/disc for fatty acids. Ampicillin (Amp, 10µg/disc), Fluconazole (FCA, 25µg/disc), and Gentamycin (CN, 10µg/disc) were used as positive control.

### Micro-well dilution assay.

Micro-well dilution assay of all tested extracts was performed. Minimal bactericidal and fungicidal concentrations (MBC/MFC) values were determined using the protocol described by Chandrasekaran et al., [21] with slight modification. The concentration of tested extracts ranged from 60.00 to 0.94 mg/ml. A standardized suspension of each tested microorganism adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity was used. A positive and a negative control were also used. The MBC and MFC were determined as the lowest concentration of tested extracts with no growth after incubation on the appropriate agar medium.

### Data processing and statistics.

Data were reported as mean ± SD and subjected to statistical analysis using SPSS software (version 20.0) and origin 8. One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc and Bonferroni's tests were used to analyse significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ). The correlation coefficients ( $R^2$ ) for spectrophotometric assays were calculated using the Microsoft Office Excel 2011 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

## Results and Discussion

### Total phenolic and flavonoid contents.

Total phenolic and flavonoid contents (TPC and TFC) of ethyl acetate and butanolic extracts of *Genista microcephala* Coss&Dur are illustrated in table 1.

**Table 1.** Total phenolic and flavonoid contents of *G. microcephala*.

Extract	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg RE/g)
Ethylene acetate	690.32±69.10	159.94±0.11
butanol	661.91±17.21	66.83±5.01

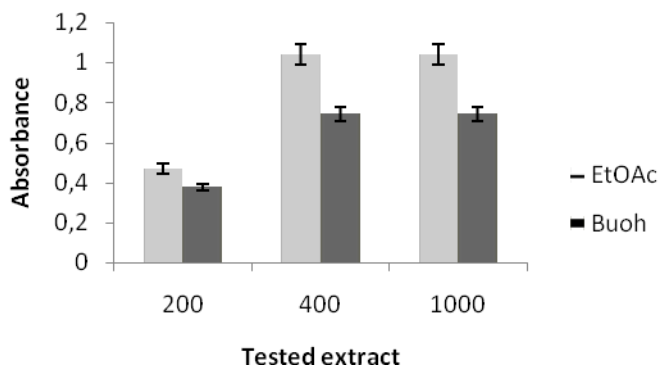
Values are reported as means  $\pm$  S.D. of three measurements. TPC: Total phenolic content (mg GAE g<sup>-1</sup> extract). TFC: Total flavonoid content (mg RE g<sup>-1</sup> extract).

The ethyl acetate and butanolic extracts showed TPC of 690.32 $\pm$ 69.10 and 661.91 $\pm$ 17.21 mg GAE/g respectively with no significant difference between the two used solvents. While, difference in TFC were found to be significant with the highest value for ethyl acetate extract 159.94 $\pm$ 0.11 mg QE/g of plant extract. The finding values are higher than those reported by Hanganu et al., [22] for *G. tinctoria* and *G. Sagittalisare*. While, Bouchouka et al., [23] reported values of 459.28 mg GAE/g and 242 mgQE/g for *G. Sahara*. Our results are in accordance with previous investigation on *Genista* species. TPC and TFC of different extracts of *G. ulcina Spash* were investigated by Chebbah et al., [24]. Ethylene acetate extract exhibited the highest values compared to butanolic extract.

**Antioxidant activity.**

Oxidation is considered as a complex process using different mechanisms. The reductive capabilities of *G.microcephala* extracts was measured using FRP, CUPRAC and TAC assays.

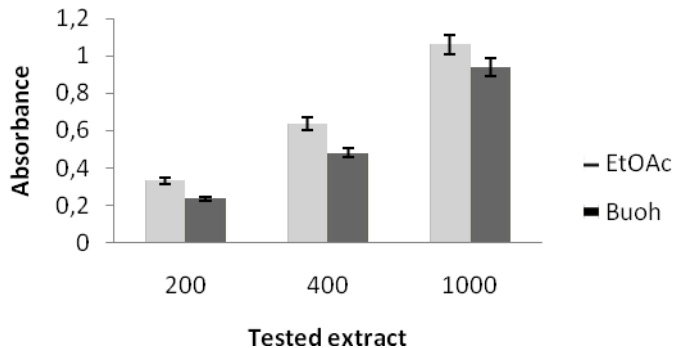
Results of reducing power activity (FRP) are summarized in figure 1. Similar to TPC, no significant difference was found between ethyl acetate and butanolic extracts. However, no correlation was detected between FRP and TPC. In comparison with previous report on *Genista* sp, *G. microcephala* seems to show similar results as *G. vuralii* and *G. sandrasica* reported a values of 1.005 $\pm$ 0.018 and 0.860  $\pm$ 0.046 respectively for a testing concentration of 1000  $\mu$ g/ml[3].



**Figure 1.** Ferric Ion Reducing Power Activity (FRP) activity of *G. microcephala*. Values are reported as means  $\pm$  S.D. Extract were evaluated in a concentration range from 200 to 1000  $\mu$ l/ml.

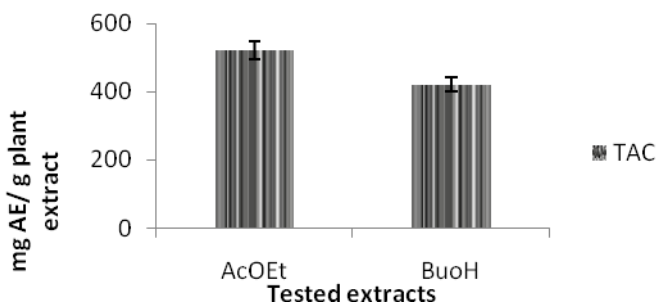
Cupric ion reducing antioxidant capacity method was also used. The cited method is reported as an inexpensive and a simple assay to study plant antioxidant activity [18]. In agreement with TFC, CUPRAC assay demonstrated the higher antioxidant activity for ethyl acetate extract (Figure 2). Difference was found to be significant. Our results are

different from those reported for methanolic extract of *Centaurea urvillei* sub sp. *Hayekiana* (0.64 mg/ml) by Zengin et al., [25].



**Figure 2.** Cupricion reducing power activity (CUPRAC) activity of *G. microcephala*. Values are reported as means  $\pm$  S.D. Extract were evaluated in a concentration range from 200 to 1000  $\mu$ l/ml.

Total antioxidant capacity was evaluated using phosphomolybdenum assay. Results are expressed as ascorbic acid equivalent and represented in figure 3. The lower value was observed for butanolic extract with  $421.08 \pm 31.55$  mg AAE/ g of plant extract. In accordance to previous assays, ethyl acetate extract showed the highest value. *G. microcephala* investigated in the present study demonstrated a notable TAC compared to *Centaurea urvillei* DC sub sp. *Hayekiana* which showed a TAC of 39.70 mg AE/ g of plant extract [25]. A high correlation was observed between TAC assay and TPC and TFC for ethyl acetate extract with a correlation coefficient  $R^2 = 0.99$  and  $0.97$  respectively. This observation is in accordance with previous research on plant extract of *Leguminosae* in particular *Vigna sub terranea* seeds [26].



**Figure 3.** Total antioxidant capacity of *G. microcephala*.

Values are reported as means  $\pm$  S.D.



Our previous investigation of Ethyl acetate extract of *G. microcephala* Coss. & Dur lead to the isolation of four isoflavonoids namely: genistein, daidzein, isopuntine (5-methoxy daidzein), genistin (7-O-β-D-glucopyranosylgenistein) and daidzin (7-O-β-D-glucopyranosyldaidzein)[10]. The isolated flavonoids may be responsible of the observed antioxidant activity. In most of cases the genistein and daidzein and glucose forms are considered as phytoalexins [27,28]. Many studies supported that flavonoids and isoflavonoids possess antioxidant activity [23]. The cited activity is deeply influenced by the presence of free or glycosylated flavonoids [29]. In addition, Foti et al., 2005 demonstrated that genistein and daidzein exhibited a strong antioxidant activity [30]. In comparison with glycosylated forms such as genistein 7-O-glucoside heterosides and 4', 7-di-O-glucoside isoprunetin, free isoflavonoids or the aglycon ones were found to be more active [29]. Other researchers have shown that genistein have low antioxidant ability, suggesting that it may not have such a significant effect as antioxidant [31]. In a recent study reported that genistein and isoprunetin do not show antioxidant activity[32]. Further investigations on isoflavonoids are in need and may help a better comprehension of their role in antioxidant activity of natural product such as plant extract.

### Antimicrobial activity

#### *Antimicrobial activity of extracts*

The antimicrobial activity of ethyl acetate and butanolic extracts of *G. microcephala* against human and fish pathogenic bacteria in addition to yeast was evaluated using agar diffusion method and the determination of MBC and MFC. Results are presented in table 2.

**Table 2.** Antimicrobial activity of *G. microcephala* extracts.

Microorganisms	MBC <sup>[a]</sup> /MFC <sup>[b]</sup> (mg/ml)		Inhibition zone diameter <sup>[c]</sup> (mm)		Antibiotics Inhibition zone diameter <sup>[c]</sup> (mm)		
	AE	BE	AEE (1000 µg/disc)	BE (1000 µg/disc)	Amp	CN	FCA
<i>B.cereus</i> R	3.7	15.0	11.32±0.	10.52±0.	37.23±0.	13.89±0.6	-
SKK 863	5	0	36	11	21	8	-
<i>E. coli</i> O157:H7	7.5	15.0	10.10±0.	8.39±0.6	26.54±0.	12.27±1.2	-
<i>M. luteus</i> NRR	0	0	43	2	89	5	-
L B-4375	15.	15.0	9.62±0.2	9.05±0.3	26.25±0.	13.85±0.2	-
Y.	00	0	0	2	26	1	-
<i>enterocolitica</i> NCTC 11175	15.	30.0	10.08±0.	7.42±0.3	25.25±0.	22.13±0.0	-
<i>E.</i>	00	0	24	5	29	7	-
<i>E.</i>	15.	15.0	10.67±0.	9.09±0.1	24.72±0.	12.32±0.6	-

15

Corresponding author: salah62dz@gmail.com

DOI: 10.2478/asn-2018-0016

©2018 “K.Preslavsky”University of Shumen. All rights reserved

<i>coli</i> ATCC 11229	00	0	37	6	15	1	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.5	7.50	12.49±0.81	9.43±0.74	24.93±1.34	14.65±0.19	-
<i>E.coli</i> ATC C 35218	15.00	15.0	9.44±0.57	8.93±0.17	24.03±0.42	13.73±0.49	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	15.00	- <sup>d</sup>	9.11±0.27	-	26.75±0.66	14.77±0.05	-
<i>C. albicans</i> A TCC 10231	15.00	30.0	11.61±0.27	9.49±0.87	-	-	21.85±1.76
<i>C. glabrata</i> R SKK 04019	7.50	30.0	13.78±0.92	10.33±0.66	-	-	25.06±1.92
<i>L. garvieae</i>	30.00	30.0	14.33±1.09	9.24±0.13	30.17±2.39	11.77±1.48	-
<i>V. anguilla rumA4</i>	15.00	30.0	16.08±0.18	9.83±0.16	29.72±1.51	10.76±0.66	-
<i>Y. ruckeri</i>	30.00	30.0	13.17±0.63	9.31±0.17	29.50±0.71	17.16±0.62	-

AEE: Ethyl acetate extract. BE: butanolic extract. [a]: Minimal Bactericidal Concentration (MBC). [b]: Minimal Fungicidal Concentration (MFC). [c]: Diameter of the inhibition zone including disc diameter.[d]: Indicates no antimicrobial activity. Values are reported as means ± SD of three separate experiments.

Disc diffusion method produced clear zone with diameters ranging from 7.42±0.35 to 16.08±0.18 mm. The obtained diameters are very weak compared to ampicillin (24.03±0.42 to 37.23±0.21mm). MBC and MFC range was 3.75-30 mg/ml. No significant difference was observed between ethyl acetate and butanolic extracts. The tested extracts demonstrated the lowest inhibition concentration for *B.cereus* RSKK 863 indicating that this strain is the most sensitive. No effect was detected for butanolic extract on *L. monocytogenes* ATCC 7644. Among the three classes of microorganisms *G. microcephalaseem* to have more effect on Gram positive bacteria. While, for Gram negative bacteria, the two extracts seem to have the same effect on *E. coli* O157:H7, ATCC 11229 and ATCC 35218. The highest MBC values were obtained for fish bacteria (*L. garvieae*, *V. anguillarumA4*, *Y. ruckeri*) indicating a less pronounced effect. The MFC of butanolic extract are two and four fold higher than ethyl acetate extract for *C. Albicans* ATCC 10231 and *C. Glabrata* RSKK 04019, respectively. The results suggest that ethyl acetate solvent might be the best solvent in term of testing antifungal activity.

Our results are in agreement with previous reports on the genus *Genista*. Erdemoglu et al., [2] investigated antibacterial and antifungal activities of alkaloid extract of *G. vuralii* and reported an effect on *Staphylococcus aureus* and *Candida krusei*. The alkaloid extract of *G. microcephala* was also found to inhibit the growth *Escherichia coli* [9], in other study found that the aqueous and ethanolic extracts of *G. microcephala* did not inhibit the growth of *Escherichia coli* but had an effect on *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermis* [13]. In addition, Bouchouka et al., [23] reported a good activity of *G.sahara* on *S.aureus*.

#### Antimicrobial activity of fatty acids

The antimicrobial activity of fatty acids components of flower, aerial parts and a mixture of both parts of *G. microcephala* was also studied and presented in table 3. According to the results of disc diffusion method, all tested parts presents a weak activity on yeast, Gram negative, Gram positive and fish bacteria with a diameter varying from  $7.16\pm 0.17$  to  $10.61\pm 0.11$ . The antibiotic and antifungal used as a control present a remarkably higher values with a range of  $24.03\pm 0.42$ - $37.23\pm 0.21$  and  $21.85\pm 1.76$ - $25.06\pm 1.92$  for gentamicin and fluconazol, respectively.

Regarding MBC and MFC, the lowest value was obtained for inhibition of *B.cereus* RSKK 863 by aerial part (3.75 mg/ml). Flowers seem to act in the same way on *Y. Enterocolitica* NCTC 11175, *M. luteus* NRRL B-4375, *Y. enterocolitica* NCTC 11175, *E. coli* O157:H7, ATCC 11229 and ATCC 35218. While aerial part and a mixture of both parts of *G. microcephala* did not affect the growth of all cited bacteria. The highest MBC values were obtained for fish bacteria. No significant difference was found between antimicrobial activities of fatty acids components of flower, aerial parts and a mixture of both parts of *G. microcephala* on fish bacteria.

**Table 3.** Antimicrobial activity of *G. microcephala* fatty acids.

Microorganisms strains	MBC <sup>[a]</sup> /MFC <sup>[b]</sup> (mg/ml)			Inhibition zonediameter <sup>[c]</sup> (mm)			Antibiotics Inhibition zonediameter <sup>[c]</sup> (mm)		
	Flower-E	Aerial-E	Mix-E	Flower-E (1000 µg/disc)	Aerial-E (1000 µg/disc)	Mix-E (1000 µg/disc)	Amp	CN	FCA
<i>B.cereus</i> RSKK 863	7.50	3.75	7.50	$9.65\pm 0.44$	$10.01\pm 0.70$	$9.54\pm 0.39$	$37.23\pm 0.21$	$13.89\pm 0.68$	-
<i>E. coli</i> O157:H7	15.00	- <sup>d</sup>	-	$8.66\pm 0.41$	-	-	$26.54\pm 0.89$	$12.27\pm 1.25$	-
<i>M. luteus</i> NRRL B-4375	15.00	-	-	$10.36\pm 0.24$	-	-	$26.25\pm 0.26$	$13.85\pm 0.21$	-
<i>Y. enterocol</i>	15.00	-	-	$8.10\pm 0.33$	-	-	$25.25\pm 0.29$	$22.13\pm 0.07$	-

<i>itica</i> NCT C 11175	15.00	-	-	10.61±0.20	-	-	24.72±0.15	12.32±0.6	-
<i>E. coli</i> ATC C 11229								1	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.50	-	15.00	10.61±0.11	-	11.65±0.09	24.93±1.34	14.65±0.1	-
<i>E. coli</i> AT CC 35218	15.00	-	-	9.86±0.93	-	-	24.03±0.42	13.73±0.4	-
<i>L. monocyt ogenes</i> ATCC 7644	15.00	30.00	30.00	9.44±0.54	7.16±0.17	7.32±0.36	26.75±0.66	14.77±0.0	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7.50	30.00	7.50	10.19±0.56	10.15±0.74	11.32±0.88	-	-	21.85±1.76
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	7.50	15.00	15.00	10.33±0.12	9.36±0.41	10.16±0.45	-	-	25.06±1.92
<i>L. garvieae</i> <i>V. anguill arum</i> A4	30.00	30.00	30.00	9.53±0.14	9.43±0.52	7.01±0.36	30.17±2.39	11.77±1.4	-
<i>Y. ruckeri</i>	30.00	30.00	30.00	9.76±0.70	9.73±0.43	11.97±0.22	29.72±1.51	10.76±0.6	-
	30.00	30.00	30.00	10.30±0.38	9.52±0.11	8.74±0.32	29.50±0.71	17.16±0.6	-

Aerial-E: Aerial part of plant extract fatty acid. Flower-E: flower extract of fatty acid. Mix-E: mixture of the Aerial part extract and flower extract of fatty acids. [a]: Minimal Bactericidal Concentration (MBC). [b]: Minimal Fungicidal Concentration (MFC). [c]: Diameter of the inhibition zone including disc diameter. [d]: Indicates no antimicrobial activity. Values are reported as means ± SD of three separate experiments.

Recent research on distilled oil composition of *G. microcephala* showed a fatty acid content of 64.4% with 0.8% caprylic acid, 21.5% lauric acid, 8.7% myristic acid, 29.6% palmitic acid, 1.1% octadecan-9,12-dienoate methyle, 2.5% linoleic and 0.2% stearic acid. Interesting activity on *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Witch mean that the nature of this oil is fatty acids [12]. The cited study concerned three bacteria strains. We reported here our results on the investigation of antimicrobial activity of *G. microcephala* on twelve bacterias, two fish bacterias and two yeast pathogens. Our study might complete previous investigation on *G. microcephala* performed by Lograda et al., [12].

18

Corresponding author: salah62dz@gmail.com

DOI: 10.2478/asn-2018-0016

©2018 “K.Preslavsky”University of Shumen. All rights reserved

### Conclusion

This study provides information on the antioxidant and antimicrobial capacities of *Genista microcephala* extracts and their maybe use in ethno medicine. Our results demonstrate a good antioxidant activity of ethyl acetate extract in comparison to butanolic extract. In addition, the MFC of butanolic extract are two and four fold higher than ethyl acetate extract for *C. Albicans* ATCC 10231 and *C. Glabrata* RSKK 04019, respectively. The finding results suggest that ethyl acetate solvent might be the best solvent in term of testing antifungal activity.

### Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria.

### Conflicts of Interests

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### References

- [1]. Maire, R., in Les Légumineuses, La flore de l'Afrique du Nord, Paris, *Lechevalier*, **1987**, p123-193.
- [2]. Erdemoglu. N.; Ozkan, S.; Duran, A.; Tosun, F., GC-MS analysis and antimicrobial activity of alkaloid extract from *Genistavuralii*, *Pharmaceutical Biology.*, **2009**, 47(1), 81-85.
- [3]. Orhan, I.E.; Tosun, F.; Tamer, U.; Duran, A.; Alan, B.; Koki, A.F., Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity, *J Serb Chem Soc.*, **2011**, 76(1), 35–42.
- [4]. Lugasi, A.; Hóvári, J.; Sági, V.K.; Bíró, L., The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases, *Acta Biologica Szegediensis.*, **2003**, 47(1-4), 119-125.
- [5]. Hertog, M.G.L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackbourn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B., Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study, *Arch Int Med.*, **1995**, 155, 381-386.
- [6]. Makoi, J.H.J.R.; Ndakidemi, P.A., Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes, *Afr J Biotechnol.*, **2007**, 6(12), 1358-1368.
- [7]. Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie, plantesmédicinales, Paris, *Lavoisier*, **1999**.

- [8]. El Rhaffari, L.; Zaid, A., Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée, dans "Des sources du savoir aux médicaments du futur", *Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes*, IRD, **2002**, p293–318.
- [9]. Zellaghi, A.; Rhouati, S.; Creche, J.; Toth, G.; Ahmed, A.A.; Pare, P.W., Anti-microbial activity of the alkaloid extract of *Genistamicrocephala*, *Revista Latino Amer Quim.*, **2004**, *32*, 109-114.
- [10]. Maanani, D.; Zellaghi, A.; Çakmak, Y.S.; Asan-Ozusaglam, M.; Rhouati, S.; Akkal, S.; Jose, C., Phytochemical and biological activity of *Genistamicrocephala*Coss et Dur, *International Journal of Advances in Science Engineering and Technolog.*, **2017**, *5*(1), 2321-9009.
- [11]. Bouakaz, I.; Beggour, L.; Dibi, A.; Georges, M.; Hamada, H., Isoflavone and triterpenoid isolated from an endemic plant *Genistamicrocephala*Coss&Dur, *J Pharm & Pharmacogn Res.*, **2015**, *3* (1), 1-5.
- [12]. Lograda, T.; Ramdani, M.; Fegueredo, G.; Chalchat, J.C.; Chalarad, P., Essential oil composition and antimicrobial of *Genistamicrocephala*Coss. Et Dur, *Int J Med Arom Plants.*, **2012**, *2*(1), 75-79.
- [13]. Edrah, S.M.; Alafid, F.; Imramovský, A.; Altwair, K.; Alkhumsi, S.I.; Hrdina R., Phytochemical screening and antibacterial activity of *Genistamicrocephala* and *Rosmarinus officinalis* extracts from Libyan's regions, *Int J Res Ayurveda Pharm.*, **2017**, *8*(4), 52-56.
- [14]. IUPAC, Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives, Oxford, *Pergamon Press*, **1979**, p59–66.
- [15]. Singleton, V.L.; Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Vitic.*, **1965**, *16*(3), 144–153.
- [16]. Quettier-Deleu, A.C. ; Gressier, C. B. ; Vasseur, A.J. ; Dine, C.T. ; Brunet, C.C. ; Luyckx, C.M. ; Cazin, C.J. ; Bailleul, B.C. ; Trotin, B.F., Phenolic compounds and antioxidant activities of bekwheat (*Fagopyrum esculentum*Moench) hulls and flour, *J Ethnopharmacol.*, **2000**, *72*, 35-42.
- [17]. Oyaizu, M., Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine, *Jpn J Nutr.*, **1986**, *44*, 307–315.
- [18]. Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E., Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *MicrochimActa.*, **2008**, *160*, 413–419.

- [19]. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M., Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphormolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Anal Biochem.*, **1999**, 269, 337–341.
- [20]. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H., Manual of clinical microbiology, Washington, DC: ASM Press, **1995**, p1327-1341.
- [21]. Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V., Antibacterial and antifungal activity of *Syzygiumjambolanum*seeds, *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, 91, 105-108.
- [22]. Hanganu, D.; Olah, N.; Benedec, D.; Mocan, A.; Crisan, G.; Vlase, L.; Popicaand, I.; Oniga, I., Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genistatinctoria*L. And *Genistaellasagittalis*(L.) Gams (*Fabaceae*), *Pak, J Pharm Sci.*, **2016**, 29(1), 301-307.
- [23]. Bouchouka, E.; Djilani, A. ; Bekkouche, A., Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from Algerian Sahara, *ActaSci Pol Technol Aliment.*, **2012**, 11(1), 61-65.
- [24]. Chabbah, K.; Marchioni, E.; Sarri, D.; Menad, A.; Mekkiou, R.; Boumaza, O.; Seghiri, R.; Benayache, S.; Benayache, F., HPLC-UV profile of *Genistaulicina*Spach. (*Fabaceae*) extracts and in vitro antioxidant activity, *International Journal of Phytomedicine.*, **2016**, 8(3), 398-403.
- [25]. Zengin, G.; Aktumsek, A.; Guler, G.O.; Cakmak, Y.S.; Yildiztugay, E., Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty Acid Composition of *Centaureaurvillei*DC. Sub sp. *Hayekiana*Wagenitz, *Rec Nat Prod.*, **2011**, 5(2), 123-132.
- [26]. Mbaïogaou, A. ; Hema, A. ; Ouédraogo, M. ; Palé, E.; Naitormbaide, M.; Mahamout, Y.; Mouhoussine, N., Etude comparative des teneurs en polyphénols et en antioxydants totaux d'extraits de graines de 44 variétés de voandzou (*Vignasubterranea*(L.)Verdcourt), *Int J Biol Chem Sci.*, **2013**, 7(2), 861-871.
- [27]. Perkins, A.G.; Newbury, F.G., The colouring matters contained in dyer's broom (*Genistatinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*), *J Chem Soc.*, **1899**, 75, 830-839.
- [28]. Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Wanabea, S.; Iton, N.; Shibuya, M.; Fukami, Y., Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *The J Biol Chem.*, **1987**, 262(12), 5592-5595.
- [29]. Foti, P.; Erba, D.; Riso, P.; Spadafranca, A.; Criscuoli, F.; Testolin, G., Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes, *Arch BiochemBiophys.*, **2005**, 433, 421–427.

- [30]. Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M., Antioxidant Activities of Isoflavones and Their Biological Metabolites in a Liposomal System, *Archives Of Biochemistry And Biophysics.*, **1998**, *356*(2), 133–141.
- [31]. Mitchell, J.H.; Gardner, P.T.; Mcphail, D.B.; Morrice, P.C.; Collins, A.R.; Duthie, G.G., Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch BiochemBiophys.*, **1998**, *360*(1), 142–148.
- [32]. Promden, W.; Monthakantirat, O.; Umehara, K.; Noguchi, H.; DE- Eknamkul, W., Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergiaparviflora*, *Molecules*, **2014**, *19*(2), 2226-2237.



## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales Algériennes, une Fabaceae (*Genista microcephala* Coss & Dur) et une Asteraceae (*Jurinea humilis* DC). L'étude phytochimique des deux plantes a permis l'identification de cinq isoflavonoïdes des extraits acétate d'éthyle et butanoliques du *G. microcephala* et trois flavonoïdes de l'extrait butanoliques du *J. humilis*, isolées pour la première fois dans les deux plantes. Les structures ont été élucidées par les différentes méthodes spectrales RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMBC et HMQC), UV, la spectrométrie de masse (SM) et par la comparaison avec les données de la littérature. L'étude biologique a été réalisée pour déterminer le contenu phénolique et flavonique et évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes de *Genista microcephala*. L'activité antioxydante a été évaluée par divers tests *in vitro*, y compris pouvoir réducteur de l'ion ferrique (PRAF), la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) et la capacité antioxydante totale (CAT). L'activité antimicrobienne des extraits acétate d'éthyle, des butanoliques, et des acides gras des différentes parties de la plante, a été évaluée contre des bactéries pathogènes humaines, des poissons et des levures pathogènes. Les méthodes utilisées étaient la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des concentrations bactéricides et fongicides minimales (CMB et CMF). L'extrait acétate d'éthyle était le plus actif en ce qui concerne l'activité antioxydant et antimicrobienne. L'activité testée semble être due à la teneur élevée de cet extrait par les isoflavonoïdes.

**Mots clés:** Activité antimicrobienne, activité antioxydant, acides gras, *Genista microcephala*, *Jurinea humilis*, composés phénoliques.

## Abstract

This work is concerning the phytochemical study of two Algerian plants, the first belonging to the Fabaceae family (*Genista microcephala* Coss & Dur) and Asteraceae family (*Jurinea humilis* DC). The phytochemical study of the two Algerian medicinal plants allowed the identification of five isoflavonoids from ethyl acetate and butanol extracts of *G. microcephala* and three flavonoids from butanol extract of *J. humilis*, isolated for the first time in both plants, The structures of compounds were elucidated by various spectroscopic methods spectral: 1D and 2D NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMBC and HMQC), UV, mass spectrometry (MS) and by comparison with literature values. The biological study carried out to determine the phenolic content and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of *Genista microcephala*. Antioxidant activity was evaluated by various *in vitro* tests, including Ferric Ion Reducing Activity (FRAP), Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC), and total antioxidant capacities (TAC). The antimicrobial activity of ethyl acetate and butanolic extracts of *G. microcephala* in addition of fatty acids content of different parts of plant was evaluated against human pathogenic bacteria, fish bacteria and yeast. The used methods were agar diffusion method and the determination of minimal bactericidal and fungicidal concentrations (MBC and MFC). Ethyl acetate extract was the most active regarding antioxidant and antimicrobial assays. The tested activity seems to be due to the high content of this extract on isoflavonoids.

**Key words:** Antimicrobial activity, antioxidant activity, fatty acids, *Genista microcephala*, *Jurinea humilis*, phenolic compounds.

## ملخص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية للنبتين من الجزائر (*Genista microcephala* Coss & Dur) المنتمية للعائلة بقوليات و (*Jurinea humilis* DC) المنتمية للعائلة المركبة وقد أدت الدراسة الفيتوكيميائية إلى تحديد خمسة من الأيزوفلافونويدات المفصولة من مستخلصات خلاص الأيثيل والبيوتانول للنبته *Genista microcephala* Coss & Dur بالإضافة إلى ثلاثة فلافونويدات من المستخلص البيوتانولي من النبتة *J. humilis*. لجدير بالذكر أن هذه المركبات تم فصلها لأول مره من كلا النبتتين. واستخدمت طرق التحليل الطيفي المختلفة في البرهنة على البنى الكيميائية للمركبات المعزولة مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية البعد: ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT, HMBC, HMQC) و مطياف الأشعة تحت بنفسجية المرئية (UV) ومطيافية الكتلة (SM). كما كان إهتمامنا بتثمين الفعالية البيولوجية بتقييم الفعالية المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة للنبته *Genista microcephala*. كما كان إهتمامنا بتثمين الفعالية البيولوجية لتحديد محتوى الفينول والفلافونيد و تقييم الفعالية المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة للنبته *Genista microcephala*. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال العديد من الفحوصات المخبرية: (FRAP), (CUPRAC), (CAT). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات لكل من مستخلص خلاص الأيثيل، بالإضافة إلى مستخلص الأحماض الدهنية لأجزاء مختلفة من النبات المدروس ضد البكتيريا المسببة للأمراض البشرية وبكتيريا الأسماك والخميرة، وقد استخدمنا طريقة الانتشار في تحديد الأثر التثبيطي بتقدير التركيزات الأدنى للبكتيريا والفطريات (MBC, MFC). كما كان مستخلص خلاص الأيثيل الأكثر نشاطا فيما يتعلق بالفعالية المضادة للأكسدة و يبدو أن هذه الفعالية ترجع لاحتواء المستخلص على العدد المرتفع من الأيزوفلافونويدات.

**كلمات مفتاحية:** النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، الأحماض الدهنية، *Genista microcephala*, *J. humilis*، المركبات الفينولي.