



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

**UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de**

**MASTER**

**FILIERE : Sciences Biologies**

**OPTION: Biochimie appliquée**

**Thème**



*L'étude de l'activité  
antioxydante de la plante  
cytissus villosus*

**Présenté par :**

*Tiboudjert Rania*

*Boudjhine Hayam*

*Soutenu le 06/06 /2016*

**Jury de soutenance :**

**Président :Mr ABAIDIA A (M.A.A)**

**Univ.Abbès Laghrour-Khenchela**

**Promoteur :Mr BOUSSAA A(M.A.A)**

**Univ.Abbès Laghrour-Khenchela**

**Examineur : Melle MESSAI A (M.A.A)**

**Univ.Abbès Laghrour-Khenchela**

**Promotion : Juin 2016**

---

**Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbès Laghrour  
Khenchela**



## *Remerciements*



*Nous remercions tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué notre promoteur BOUSSAA A , qu'a accepté de nous encadrer, nous le remercions infiniment pour son aide, ses orientation, sa patience et sa correction sérieuse de ce travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à Mr ABAIDIA A, Maitre Assistant à l'université Abbès Laghrour d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous offrons nos plus sincères remerciements à l'examinatrice MESSAI A pour ses précisions remarques pour corriger ce travail et pour l'assistance par des conseils objectifs et éclairés.*

*Nous remercions tous nos enseignants, pour leur patience et tout les efforts et leurs conseils pendant nos étude, et nous remercions nos collègues de promotion 2 ème Biochimie appliquée (2015-2016).*



## ***DEDICACES***



*A ma mère, mon Deuxième Souffle, qui m'a mis au monde, veillé sur moi, et qui a su me transmettre ses valeurs et son chaleureux amour durant toutes ces années qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je réussisse à mes études,, qui m'a permis de donner le meilleur de moi-même et me surpasser. Je t'aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien moins que demain. Que Dieu te Garde pour nous.*

*A Mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Je t'aime papa.*

*A ma agréable sœur , Imene et mon frère Mouhamed Adnane.*

*A ma tante Aziza et son mari*

*A Toutes mes cousines*

*A toutes mes chères amies, Khadija, Fahima, Imene, Houda*

*A mon Ame et mon binôme Hayam*

**RANIA**

## **Table des matières**

Liste des tableaux.....	01
Liste des figures.....	02
Liste des abréviations.....	03

## **Revue bibliographique**

Introduction.....	05
-------------------	----

## **Chapitre I : généralités sur la plante**

I. définition des plantes médicinales.....	07
II .La famille de Fabaceae.....	07
III.Définition de Cytisus .....	08
IV.Classification.....	08
V.Description et caractéristiques de la plante.....	09
VI. Optimum écologique .....	11
VI .1caractéristiques climatiques .....	11
VI.2caractéristiques du sol .....	12

## **Chapitre II : stress oxydatif**

I .Le Stress Oxydatif . .....	13
II .Définition des radicaux libres .....	13
III-Définition des espèces oxygénées réactives.....	13
IV-Nature et sources cellulaires des EOR.....	15
V-Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées .....	15
a) Peroxydation lipidique .....	15
b) Oxydation des protéines .....	16

c) Oxydation de l'ADN .....	17
d) Oxydation des glucides .....	17
<b>VI-Définition du stress oxydatif .....</b>	<b>17</b>
<b>VII-Implications pathologiques du stress oxydatif.....</b>	<b>17</b>

### **Chapitre III : l'activité antioxydante**

<b>I-Les antioxydants.....</b>	<b>19</b>
<b>II- Mécanisme d'action.....</b>	<b>19</b>
<b>III-Test antioxydant.....</b>	<b>20</b>
<b>IV-Antioxydants enzymatiques.....</b>	<b>20</b>
<b>V- Antioxydants non enzymatiques.....</b>	<b>21</b>
V-1- Le glutathion.....	21
V-2-L'acide ascorbique.....	22
V-3-Le -tocophérol.....	22
V-4-Les caroténoïdes .....	23
V-5-Les oligoéléments .....	23
V-6-Les protéines plasmatiques.....	24
V-7-Les polyphénols.....	24

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre VI : matériels et méthodes**

<b>I. Matériel .....</b>	<b>27</b>
I.1. Matériel végétal.....	27
I. 2. Matériel de laboratoire .....	27
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>28</b>
II.1. Extraction des composés phénoliques.....	28
II.2. Dosage des polyphénols totaux .....	28

II.3. Dosage des flavonoïdes .....	28
<b>II.4. Activité antioxydante totale (TAC) .....</b>	<b>29</b>
II.4. 1. Principe .....	29
II.4.2- Dosage.....	29
<b>II.5. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ...</b>	<b>29</b>
II.5. 1-Principe .....	29
II.5. 2- Dosage .....	30
<b>II.6. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)....</b>	<b>31</b>
II.6. 1. Principe .....	31
II.6. 2. Dosage .....	32

## **Chapitre V :résultats et discussion**

<b>I. Résultats et discussion.....</b>	<b>34</b>
<b>I. 1. Détermination de rendement d'extraction.....</b>	<b>34</b>
I. 2. Dosage des polyphénols totaux.....	35
I. 3. Dosage des flavonoïdes .....	36
<b>I.2. L'activité antioxydante des extraits de Cytisus villosus.....</b>	<b>36</b>
I.2.1. Test anti radicalaire (DPPH) .....	36
I.2.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) .....	39
I. 2. 3. Activité antioxydante totale (TAC) . .....	40
<b>Conclusion.....</b>	<b>41</b>
<b>Références bibliographique.....</b>	<b>43</b>
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

**ADN** : acide disoxyribonucléique

**ALCL3** : trichlorure d'aluminium

**Asc·** : radical ascorbyle

**AscH** : l'ascorbate

**-TH** : l' - tocophérol

**-T·** : radical -tocophéryle

**Ac** : absorbance du contrôle

**At** : absorbance du test effectué

**AscH**: l'ascorbate

**°C** : degré cellsius

**C** : cyteusus

**DPPH** : le 2,2 -diphenyl-1- picrylhydrazyl

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**FeCl3**

**FRAP** : Ferric reducing antioxidant power

**GSH** : glutathion réduit

**GSSG** : glutathion oxide

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** eau oxygéné

**I %**: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

**IC50** : concentration inhibitrice de 50 %

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** : ferricyanure de potassium

**min** : minute

**Mo** ; molybdène

**MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : ions molybdate

**mM** : mili molaire

**MnSOD**

**nm** : nanomètre

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**NaNO<sub>2</sub>** : acide gallique, nitrite de sodium

**O<sub>2</sub>** : 1 oxygène

**pH** : potentiel d'hydrogène

**SODs** : Les superoxyde dismutases

**TAC** : Activité antioxydante totale

**TCA** : acide trichloracétique

**UV** : ultraviolet

:



## Liste des tableaux

**Tableau I :**Caractéristiques de la plante *Cytisus villosus*

**Tableau II.** Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques

**Tableau III .**Les principales affections liées au stress oxydatif

**TableauV.** Teneur des extraits éthanolique et méthanolique de *C villosus* en polyphénole

Totaux

**Tableau VI.** Teneur en flavonoïdes des extraits éthanolique et méthanolique de *C. villosus*

## Liste des figures

**Figure 1** : Arbre phylogénique de *Cytisus villosus*

**Figure2** :L'espèce de *Cytisus villosus* (A) L'arbre,(B)Fleurs,(C)Feuilles

**Figure3** : Régénération du GSH par la GSH réductase

**Figure4** :. Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique (Pincemail et al., 1999).

**Figure5** Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).

**Figure6** :Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: 2R=OH, 1R =3R =H; Quérétine: 1R=2R=OH, 3R=H; Myricétine: 1R=2R=3R=OH.

**Figure7**- Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (POPOVICI et al., 2009).

**Figure8**- Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).

**Figure 9**- Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (PRIOR et al., 2005)

## Liste des abréviations

**ADN** : acide disoxyribonucléique

**ALCL3** : trichlorure d'aluminium

**Asc·** : radical ascorbyle

**AscH** : l'ascorbate

**-TH** : l' - tocophérol

**-T·** : radical -tocophéryle

**Ac** : absorbance du contrôle

**At** : absorbance du test effectué

**AscH**: l'ascorbate

**°C** : degré cellsius

**C** : cyteusus

**DPPH** : le 2,2 -diphenyl-1- picrylhydrazyl

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**FeCl3**

**FRAP** : Ferric reducing antioxidant power

**GSH** : glutathion réduit

**GSSG** : glutathion oxide

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** eau oxygéné

**I %**: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

**IC50** : concentration inhibitrice de 50 %

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** : ferricyanure de potassium

**min** : minute

**Mo** ; molybdène

**MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : ions molybdate

**mM** : mili molaire

**MnSOD**

**nm** : nanomètre

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**NaNO<sub>2</sub>** : acide gallique, nitrite de sodium

**O<sub>2</sub>** : 1 oxygène

**pH** : potentiel d'hydrogène

**SODs** : Les superoxyde dismutases

**TAC** : Activité antioxydante totale

**TCA** : acide trichloracétique

**UV** : ultraviolet

:





# INTRODUCTION

# Introduction

---

## Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Actuellement plus de 80 % de la population africaine ont recours aux drogues faites essentiellement de matières végétales qui poussent autour de leur ville. En plus dans le monde, près de 25% des prescriptions sont à base de plantes et 60 à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle. (**A-M. Diallo, 2005**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Cytisus*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions méditerranéennes de l'Europe et de l'Afrique. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces ; *Cytisus villosus* . Cette plante utilisée en décoction contre les rhumatismes, pour cicatriser les plaies et les blessures, les hémorroïdes, et les gaz.

A notre connaissance, jusqu'à ce jour là, il n'y a aucune étude sur cette plante néanmoins son utilisation abondante dans le domaine phytothérapeutique dans la région de la grande et la petite Kabylie.

Le présent travail porte sur une recherche de l'activité antioxydant de *Cytisus villosus* .Il comprend deux parties :

Une Partie théorique :

Les principaux chapitres de cette partie sont traités selon le plan suivant :

# Introduction

---

- Dans le premier chapitre de ce travail, nous présenterons une définition des plantes médicinales et une description botanique de la plante *C. villosus*
- Le deuxième chapitre, sera consacré aux généralités sur le stress oxydatif.
- Le dernier chapitre sur l'activité antioxydante enzymatique et non enzymatique

Une Partie pratique :

- Préparation des extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de la plante *C. villosus*.
  - Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes des extraits éthanolique et méthanolique de *Cytisus villosus*.
  - Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *C.villosus* par les tests de DPPH, la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power), Capacité antioxydant totale (TAC).
- ✓ Enfin nous achèverons ce travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus



SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE



## I- Définition des plantes médicinales

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**GHABRIER, 2010**).

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**SANAGO, 2006**).

## II-La famille de Fabaceae

La grande famille des Fabaceae (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue.

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (**Wojciechowski et al., 2004**).

Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (**Dupont et al., 2007**).

Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semiarides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat.

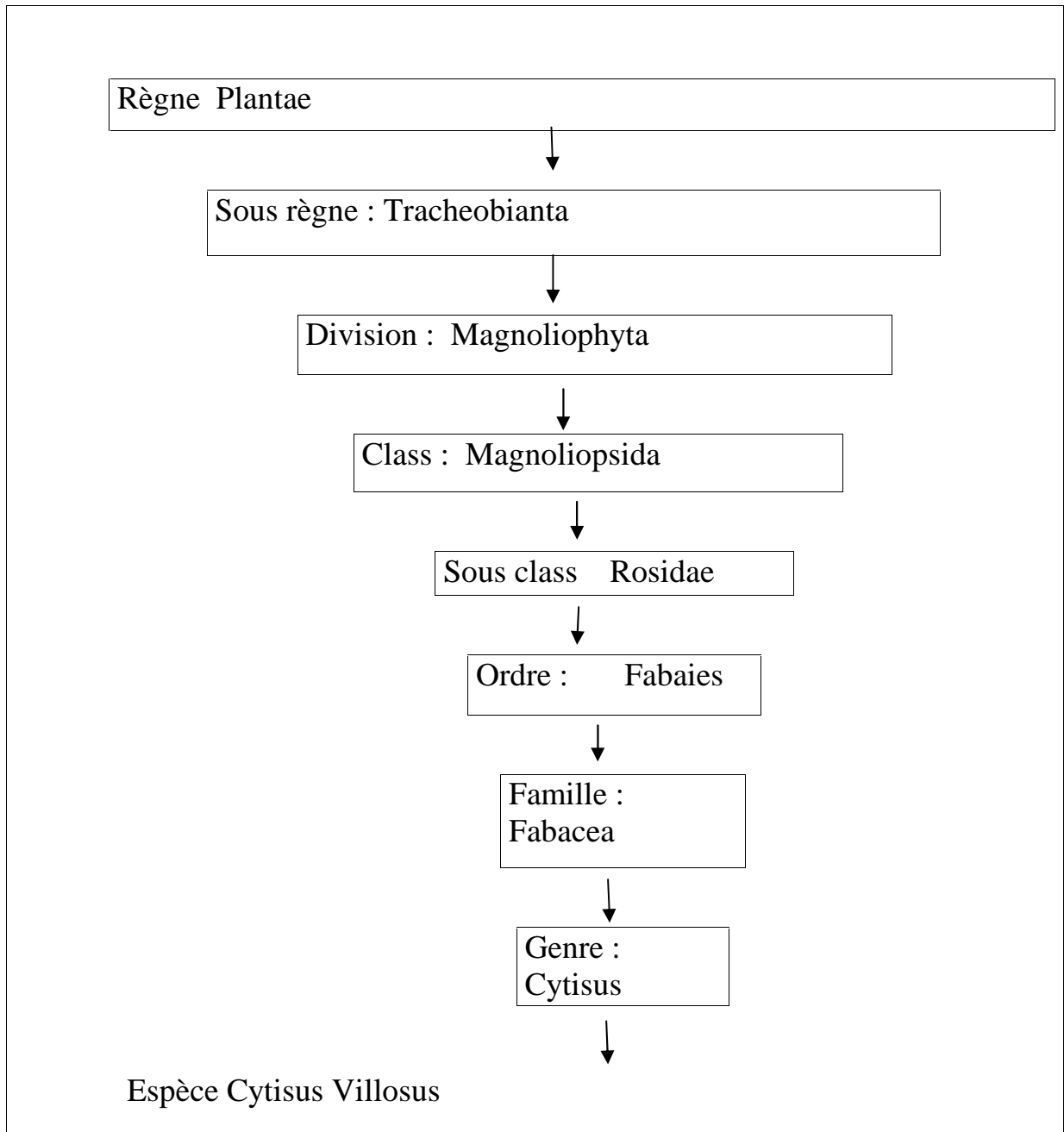
En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (**Wojciechowski et al., 2004**).

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

### III-Définition de Cytisus

Cytisus est un genre de plantes de la famille des Fabaceae. Ses espèces sont généralement appelées « genêts » ou « cytises ». C'est le genre du genêt à balais. Il contient 27 espèces parmi eux : *Cytisus candicans*, *Cytisus battandieri* - Genêt Ananas, *Cytisus scoparius* (L.) Link - genêt à balais, *Cytisus villosus* Pourr. ([Madagascar Catalogue](#) ; [BioLib](#) : [Cytisus Desf.](#))

### IV-Classification



**Figure 1** : Arbre phylogénique de *Cytisus villosus* ([ITIS](#) : [Cytisus Desf](#))

## V-Description et caractéristiques de la plante

Ce petit cytise possède des feuilles à trois folioles très velues. Ses fleurs sont jaunes, l'étendard est ponctué de rouge sur la face avant et fortement recourbé sur le pétiole. Les dents du calice sont noirâtres. (site 6)



**Figure2** :L'espèce de Cytisus villosus (A) L'arbre,(B)Fleurs,(C)Feuilles (site 1).

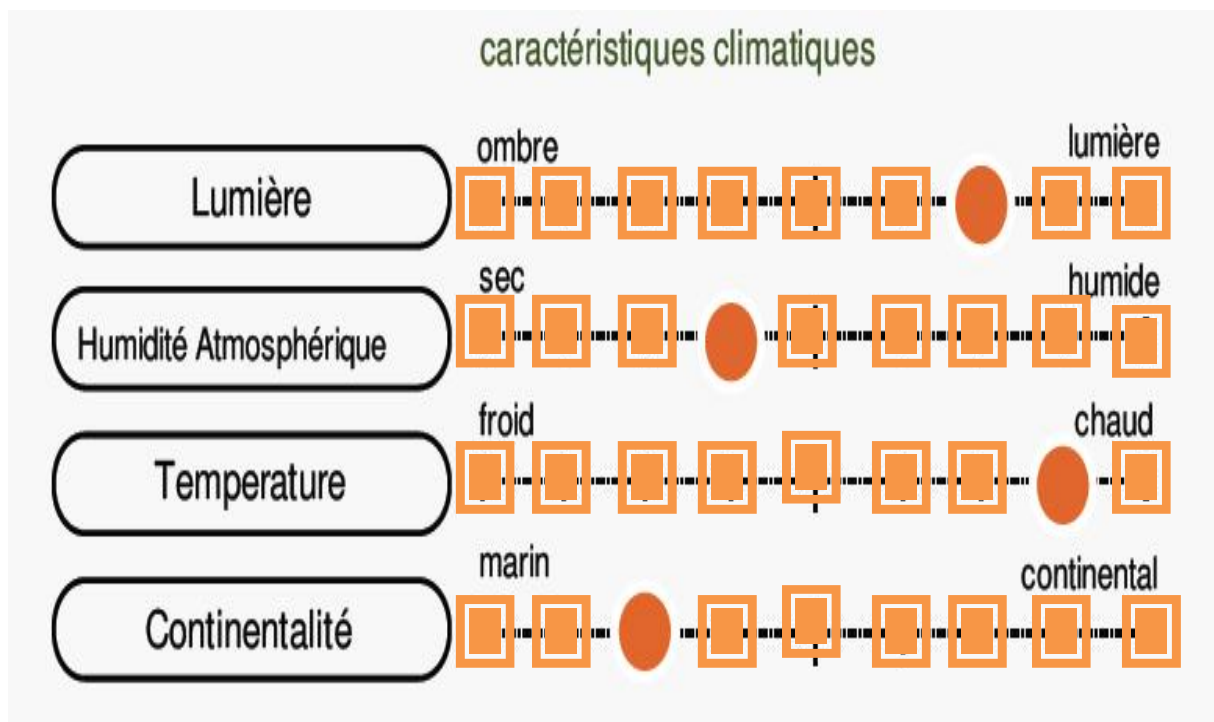
## Quelques caractéristiques

Tableau I :Caractéristiques de la plante *Cytisus villosus* (site 7)

<b>caractérisations</b>	
<b>Catégorie</b>	Arbuste
<b>Nom commun</b>	Cytise à trois fleurs
<b>Famille</b>	Fabaceae
<b>Synonyme</b>	<i>Cytisus triflorus</i> L'Her. , <i>Genista triflora</i> Rouy
<b>Origine</b>	Afrique du nord , Europe ( Méditerranée ) , Turquie
<b>Taille plante</b>	0,5-2m
<b>Diamètre corolle</b>	14-16 mm
<b>Epoque de floraison</b>	De Avril à Mai
<b>Feuillage</b>	Persistant
<b>Croissance</b>	Moyenne
<b>Sol</b>	Drainant
<b>Exposition</b>	Soleil
<b>Type végétatif</b>	Vivace

## VI-Optimum écologique

### VI.1-caractéristiques climatiques



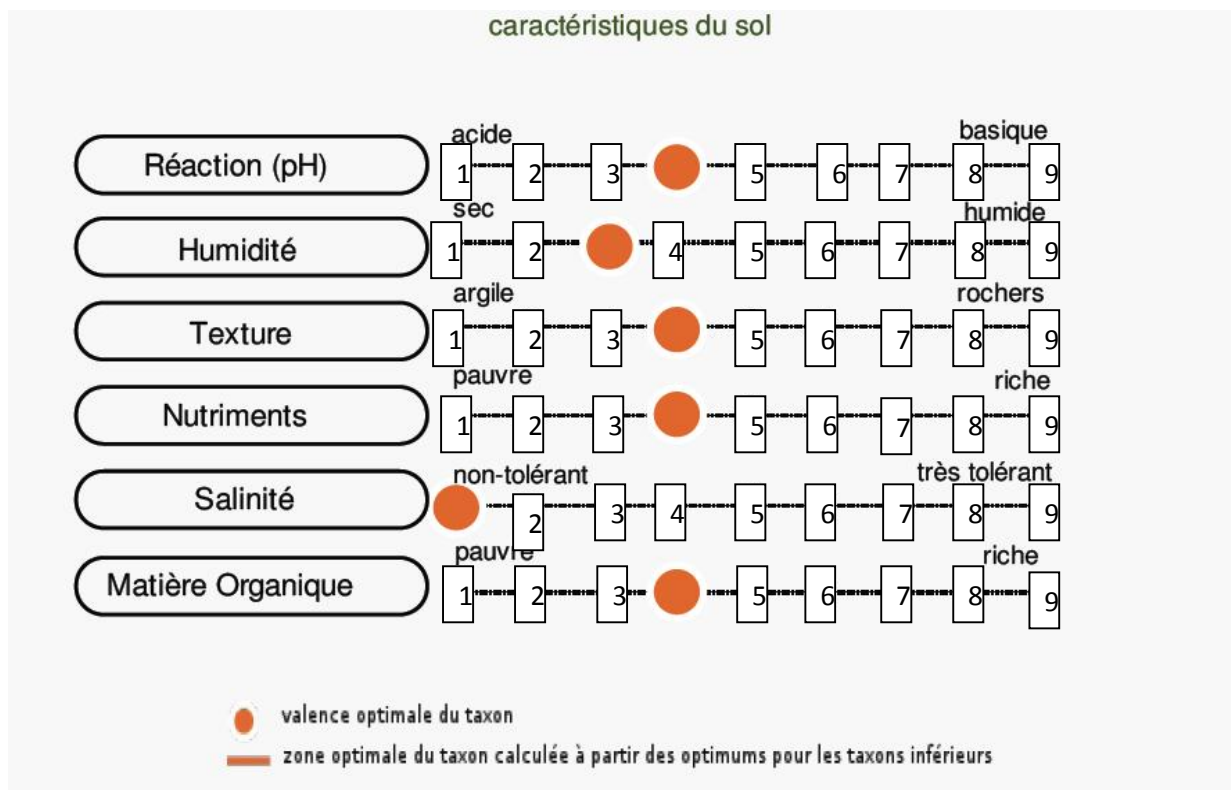
**Lumière** 1 : hypersciaphiles 2 : sciaphiles 3 : intermédiaires 4 : hémisciaphiles 5 : intermédiaires 6 : hémihéliophiles 7 : intermédiaires 8 : héliophiles 9 : hyperhéliophiles

**Température** 1 : alpines à nivales, altiméditerranéennes 2 : subalpines, oroméditerranéennes 3 : montagnardes 4 : collinéennes, psychroatlantiques 5 : planitiales à montagnardes 6 : planitiales thermophiles, thermoatlantiques, thermocontinentales, subméditerranéennes, supraméditerranéennes 7 : euryméditerranéennes, méditerranéo-atlantiques 8 : mésoméditerranéennes 9 : thermoméditerranéennes à subdésertiques

**Humidité atmosphérique** 1 : aéroxérophiles 2 : intermédiaires 3 : aéromésoxérophiles 4 : intermédiaires 5 : aéromésohydriques 6 : intermédiaires 7 : aéromésohygrophiles 8 : intermédiaires 9 : aérohydrophiles

**Continentalité** 1 : marines à maritimes 2 : hyperocéaniques 3 : océaniques 4 : subocéaniques 5 : intermédiaires 6 : précontinentales 7 : subcontinentales 8 : continentales 9 : hypercontinentales (site 5).

VI.2-caractéristiques du sol



**Réaction (pH)** 1 : hyperacidophiles 2 : acidophiles 3 : intermédiaires 4 : acidoclines 5 : intermédiaires 6 : neutroclines 7 : neutrophiles 8 : basophiles 9 : hyperbasophiles

**Humidité** 1 : hyperxérophiles 10 : amphibies permanentes 11 : aquatiques superficielles 12 : aquatiques profondes 2 : perxérophiles 3 : xérophiles 4 : mésoxérophiles 5 : mésohydriques 6 : mésohygrophiles 7 : hygrophiles 8 : hydrophiles 9 : amphibies saisonnières

**Texture** 1 : argile 2 : intermédiaire 3 : limon 4 : sable fin 5 : sable grossier 6 : graviers 7 : galets 8 : blocs, fentes des parois 9 : dalle

**Nutriments** 1 : hyperoligotrophiles 2 : oligotrophiles 3 : intermédiaires 4 : mésooligotrophiles 5 : mésotrophiles 6 : mésoeutrophiles 7 : intermédiaires 8 : eutrophiles 9 : polytrophiles

**Salinité** 0 : ne supportant pas le sel 1 : hyperoligohalines, [0-0,1% Cl-] 2 : peroligohalines, [0,1-0,3% Cl-] 3 : oligohalines, [0,3-0,5% Cl-] 4 : mesooligohalines, [0,5-0,7% Cl-] 5 : mesohalines, [0,7-0,9% Cl-] 6 : mesoeuhalines, [0,9-1,2% Cl-] 7 : euhalines, [1,2-1,6% Cl-] 8 : polyhalines, [1,6-2,3% Cl-] 9 : hyperhalines, [>2,3% Cl-]

**Matière Organique** 1 : lithosol, arénosol 2 : mull carbonaté 3 : mull actif 4 : mull acide 5 : moder 6 : mor, hydromor, xéromor 7 : ranker, tangel 8 : anmoor, gyttja 9 : tourbe (site 5).



## CHAPITRE II

## I-Le Stress Oxydatif

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines.

Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène ?

## II-Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes. ( **Lehucher-Michel et al ,2001**)

Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical ( **Koechlin-Ramonatxo , 2006**)

Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rapatrier leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron ( **Lehucher-Michel et al ,2001**).

L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne ( **Koechlin-Ramonatxo , 2006**) qui se caractérise par trois étapes ; (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante.

## III-Définition des espèces oxygénées réactives

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc....) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite ( **Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman, 2004**) .(Tableau II).

**Tableau II.** Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Bartosz, 2003**)

Nom	Symbole
<b>Espèces Radicalaires</b>	
Anion superoxyde	$\text{O}_2^-$
Radical hydroxyle	OH
Monoxyde d'azote	NO
<b>Espèces non radicalaires</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Acide hypochlorique	HOCL
Oxygène singulet	$\text{O}_2$
Peroxynitrite	ONOO

L'instabilité des EOR rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures, elles sont très élevées et peuvent aller de  $10^5$  à  $10^{10}$   $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La durée de vie des EOR est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde ( **Lehucher-Michel *et al*, 2001**).

En effet, la toxicité des EOR n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production ( **Kohen *et al*, 2002**).

## IV-Nature et sources cellulaires des EOR

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimuli spécifique.

## V-Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

La surproduction des ERO est responsable des lésions directes des molécules biologiques ainsi que des lésions cytotoxiques et mutagènes par les produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

L'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. Les radicaux hydroxyles sont au contraire les plus dommageables pouvant s'attaquer à toutes les molécules biologiques à savoir l'ADN, les protéines et les lipides (**Gardès-Albert *et al.*, 2003; Ahsan *et al.*, 2003**). En fait, Verdán et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que la réaction de Fenton productrice de radicaux hydroxyles est la cause primaire de la mort cellulaire par l'endommagement de l'ADN.

Par ailleurs, la réactivité du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité de traverser facilement les membranes cellulaires des organites dans le cytoplasme et par conséquent il oxyde un nombre élevé de composés et structures cellulaires (**Gião *et al.*, 2010**).

### a) Peroxydation lipidique

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO sont les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (**Ahsan *et al.*, 2003**). Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (**Evans, 2000**).

Dans une première étape de la peroxydation, les acides gras se transforment en peroxydes lipidiques puis sous l'action des métaux de transition ils se décomposent en une série de sous-produits à savoir les aldéhydes et les hydrocarbures.

La malonedialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (HNE) sont des exemples d'aldéhydes résultants de la peroxydation lipidique et sont utilisés comme marqueurs suivis lors de la détection de peroxydation lipidique chez les patients (**Pincemail *et al.*, 1999**). Les ERO ainsi que la MDA et le HNE peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un nombre de changements structuraux et fonctionnels (**Aruoma, 1999**). Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (**Pincemail *et al.*, 1999**).

### b) Oxydation des protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées.

L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulfhydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques biologiques (**Ahsan *et al.*, 2003**). Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (**Aruoma, 1999; Favier, 2003**). Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérase (**Aruoma, 1999**).

D'autre part, la surproduction des espèces réactives du nitrogène conduit aux réactions de nitrosylation des protéines et par conséquent à l'altération de leurs structures et l'inhibition de leurs fonctions (**Valko *et al.*, 2007**).

### c) Oxydation de l'ADN

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (**Beckman et Ames, 1998**). La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. La thymine glycol est le produit d'oxydation majeur, et sa présence dans l'urine sert d'indicateur du dommage de l'ADN. La réduction de la guanine résulte de l'ouverture de sa structure cyclique formant le formamidopyrimidine. Son oxydation, cependant, conduit à la formation du 8-hydroxy-2' déoxyguanosine, un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de bio-marqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (**Pincemail et al., 1999**).

### d) Oxydation des glucides

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH. qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (**Favier, 2003**).

## VI-Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes ( **Sorg, 2004**).

## VII-Implications pathologiques du stress oxydatif

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré ( **Favier, 2003**).

En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de

pathologies humaines différentes (**Pincemail,2002**) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**Tableau III**)

Le rôle du stress oxydant à été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement ( **Lehucher-Michel *et al*,2001**) ; ( **Sorg, 2004**) ; (**Martínez-Cayuela, 1995**) ;(**Valko *et al* 2007**).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés ( **Sohal *et al*,2002**).

**Tableau III** .Les principales affections liées au stress oxydatif

<b>Pathologie</b>	<b>Référence</b>
Lésions de reperfusion post-ischémique	( <b>Zweier et Talukder, 2006</b> )
Maladies auto-immunes	( <b>Halliwell et guetteridge, 1999</b> )
Arthrite rhumatoïde	( <b>Ahsan <i>et al.</i>, 2003</b> )
Maladies inflammatoires	( <b>Densiov et Afanas'ev, 2005</b> )
Athérosclérose	( <b>Harrison <i>et al</i>, 2003</b> )
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	( <b>Sorg, 2004</b> )
Emphysème	( <b>Lechuer-Michel <i>et al.</i>, 2001</b> )
Diabète sucré	( <b>Pal Yu, 1994</b> )
Certains cancers	( <b>Valko <i>et al.</i>, 2007</b> )
Anémie drépanocytaire	( <b>Martinez-Cayuela, 1995</b> )



**CHAPITRE III**

## **I-Les antioxydants**

Au sens large, un antioxydant est un composé qui inhibe ou retarde l'oxydation des substrats, même si le composé est présent en concentration plus faible de façon significative que le substrat oxydé. Les composés antioxydants peuvent être recyclés dans la cellule ou bien ils sont irréversiblement endommagés, mais leurs produits d'oxydation sont moins nuisibles, pouvant être convertis en substances inoffensives (**Halliwell, 1995; Halliwell et Gutteridge, 2007; Matkowski, 2008**).

L'intérêt porté aux antioxydants est grandissant. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler la production des ERO (Espèce réactive de l'oxygène).

Les antioxydants pourraient atténuer le stress oxydatif d'un tissu indirectement en renforçant les défenses naturelles des cellules et/ou directement par le scavenger des radicaux libres (**Pincemail *et al.*, 2002**).

## **II- Mécanisme d'action**

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Z.Hellal ;2011**).

### III-Test antioxydant

Les tests antioxydants peuvent révéler différents mécanismes d'action en fonction des caractéristiques de l'essai particulier. On utilise des méthodes simples comprenant des radicaux libres "scavenging" artificiels, stables et colorés, tels que le 2,2 -diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Re *et al.*, 1999; Molyneux, 2004).

### IV-Antioxydants enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les cellules humaines possèdent une enzyme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier, 2003).

Due à sa relative stabilité, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases (Blokhina *et al.*, 2003).

Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (Aruoma, 1999).

La glutathion réductase, qui est une enzyme contenant le FAD, génère GSH à partir de GSSG via le NADPH comme source de pouvoir réducteur (Aruoma, 1999).

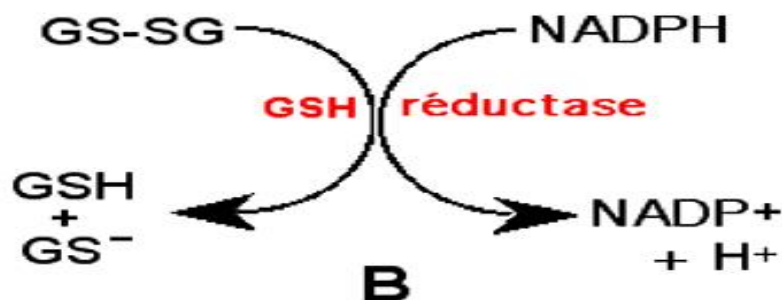
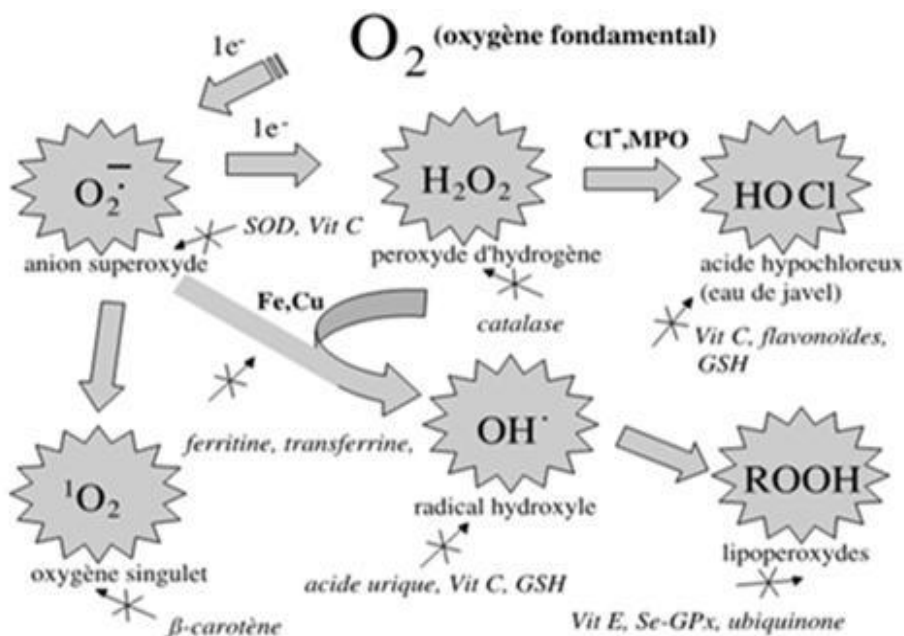


Figure3 : Régénération du GSH par la GSH réductase (site 4)

Ces enzymes sont le principal système de protection car elles détruisent non seulement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol.

Cependant, d'autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases sont impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme et utilisent le NADPH comme donneur d'équivalent réducteur, celui-ci constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).



**Figure4** :. Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique (Pincemail *et al.*, 1999).

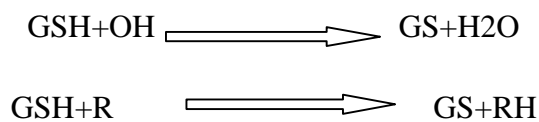
## V- Antioxydants non enzymatiques

### V-1- Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant, voire, de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses

espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux 24 hydroxyles tel que montré dans la réaction 1 (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).

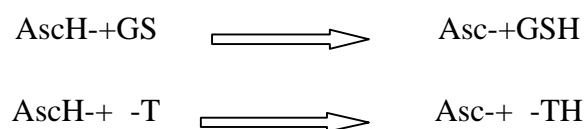
Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux. Dans ce cas, un phénomène de "réparation" des radicaux R· en produits réduits RH se produit (**Lal, 1994**).



### V-2-L'acide ascorbique

L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH. que très peu réactifs tels que les radicaux O<sub>2</sub>·. Sa capacité de donation d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse (**Blokhina *et al.*, 2003**).

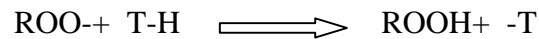
En réagissant avec ces divers radicaux, l'ascorbate (AscH<sup>-</sup>) est oxydé en radical ascorbyle (Asc·) qui est relativement inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l'α-tocophérol (α-TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle. (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**)



### V-3-Le α-tocophérol

Parmi les tocophérols naturels, le α-tocophérol (vitamine E) est le plus efficace in vivo. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO·), alkoxy (LO·) et alkyl (L·) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique. La réaction entre les radicaux lipidiques et le α-tocophérol (α-TH) se passe au niveau de l'interphase membrane-eau où ce dernier perd un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle (α-T·), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (**Blokhina *et al.*, 2003**).

Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**)



#### **V-4-Les caroténoïdes**

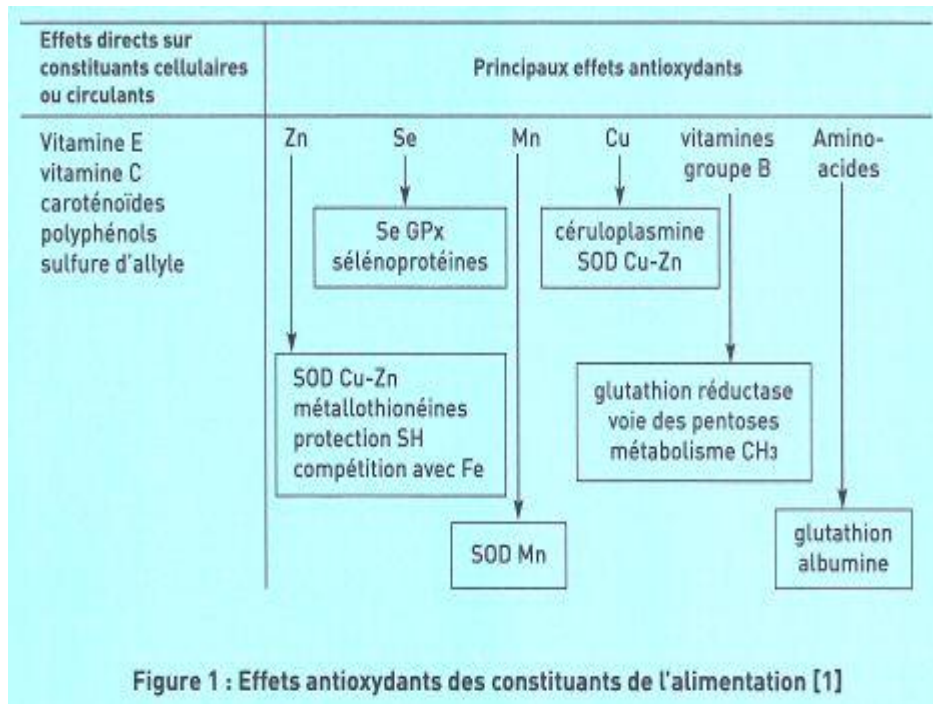
Les caroténoïdes tel que le  $\beta$ -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique.

En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet,  $^1\text{O}_2$ , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autres produits végétaux (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).

#### **V-5-Les oligoéléments**

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (figure 5). D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium).

La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (**Roussel, 2009**).



**Figure5.** Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).

### V-6-Les protéines plasmatiques

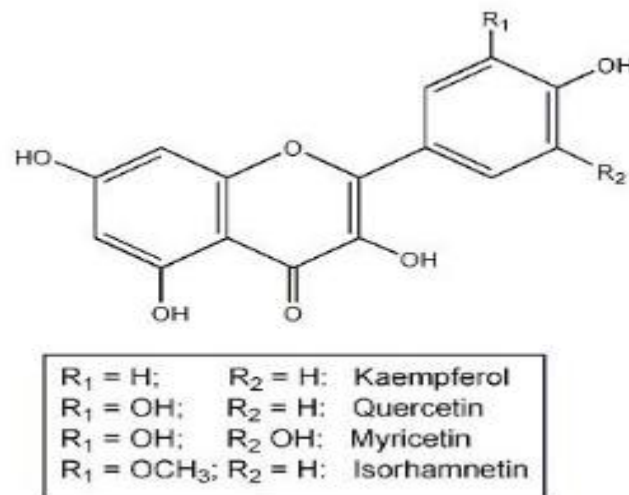
Les transferrines sont des protéines plasmatiques douées d'activité antioxydante car elles possèdent une capacité de fixation importante au fer. Elles se trouvent saturées à 30% en ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre dans le sang de sujets sains. Dans des cas pathologiques, le fer peut être libéré de ces protéines de transport (ferritine, lactoferrine) et se retrouver dans le sang sous une forme libre capable d'initier des réactions productrices de ERO (Pincemail *et al.*, 1999).

### V-7-Les polyphénols

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (Hu, 2003; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011).

Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (Ketsawatsakul *et al.*, 2000) ainsi que de chélater les différents métaux de transition (Gulcin *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011). Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférol quercétine et myricétine ou l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule (figure 6) (Le *et al.*, 2007).

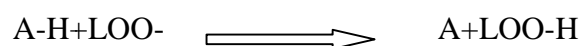


**Figure 6 :** Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: 2R=OH, 1R =3R =H; Quercétine:

1R=2R=OH, 3R=H; Myricétine: 1R=2R=3R=OH.

En outre, les polyphénols agissent contre la peroxydation lipidique de deux façons: par la protection des lipides cibles contre les initiateurs de l'oxydation ou par stabulation de la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs entravent la formation des ERO ou éliminent les espèces réactives responsables de l'initiation de l'oxydation comme O<sub>2</sub>·, HO<sub>2</sub>· et OH·.

Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne perdent généralement un atome d'hydrogène en faveur des radicaux propagateurs de l'oxydation (LOO·) pour stopper la propagation de la peroxydation (Laguerre, 2007) selon la réaction cidessous.



Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Il a été postulé par Verdan et ses collaborateurs (2011) que la quercétine et myricétine

forment des complexes avec les différents métaux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , etc.) via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3- 28 hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C.

Néanmoins, les deux groupes 3- hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal .

En plus, les flavonoïdes sont des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la production des ERO. En effet, Sandhar et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que les flavonoles quercétine, kaempferol et galangine, ainsi que le flavone apigénine sont des inhibiteurs des enzymes du cytochrome P450 impliquées dans la production des ERO.



## **I. Matériel**

### **I.1. Matériel végétal**

Les feuilles de *Cytisus villosus* ont été récoltées au mois de Mars 2016 dans la région d'El-Milia wilaya de Jijel. Dans la période le mois de Mars 2016 au début de la saison de floraison. Les feuilles ensuite ont été lavées et séchées à l'abri de la lumière, broyées et conservées à l'obscurité.

### **I. 2. Matériel de laboratoire**

- ✓ Spectrophotomètre
- ✓ Etuve.
- ✓ Rotavapeur (Büchi).
- ✓ Balance de précision.
- ✓ Agitateur.
- ✓ Bain-marie
- ✓ Centrifugeuse.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Extraction des composés phénoliques**

Les extraits ont été préparés selon la technique décrite par **Isbilir et al. (2012)** avec quelque modifications ; une prise d'essai de 30g de poudre de *Cytisus villosus* a été mise à macérer dans 300 ml du solvant (méthanol et ethanol) absolu sous agitation à température ambiante pendant une nuit (24h). L'extrait a ensuite été centrifugé à 4000 tours pendant 20 min.

L'extrait récupéré a été filtré sur un papier filtre N°4 puis évaporé à sec sous pression réduite à 40°C au Rota-vapeur. Le résidu sec pesé est conservé à -18°C.

## **II.2. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en phénols totaux des extraits méthanolique et éthanolique de *C. villosus* a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait de *C. villosus* à concentration de 2mg/ml est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

## **II.3. Dosage des flavonoïdes**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Une quantité de 500 µl des extraits méthanoliques et éthanoliques (2mg/ml) est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10 % (m/v) est rajouté. Après une incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g).

La concentration en flavonoïdes contenus dans les extraits a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard .

## **II.4. Activité antioxydante totale (TAC) :**

### **II.4. 1. Principe**

La capacité antioxydant totale (TAC) des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (**PRIETO *et al.*, 1999**).

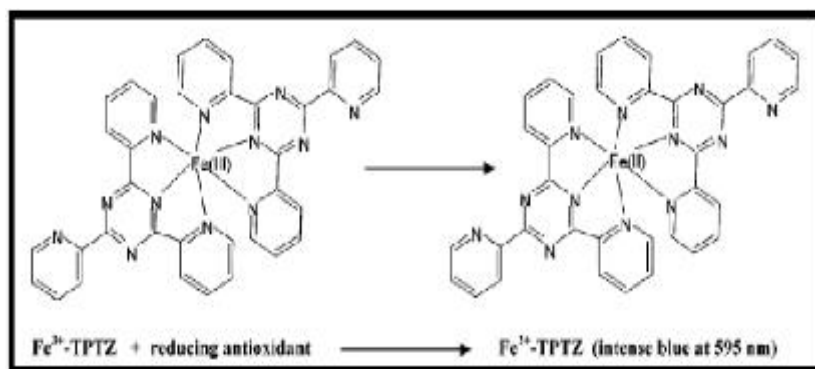
### **II.4.2- Dosage**

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique et éthanolique de différentes concentrations (0.1, 0.2, 0.4 et 0.8 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution du réactif (0.6 M acide sulfurique (1ml), 28 mM phosphate de sodium (1ml) et 4 mM molybdate d'ammonium (1ml)). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à partir de la courbe d'étalonnage (**Prieto *et al.*, 1999**).

## **II.5. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :**

### **II.5. 1-Principe :**

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **OYAIKU (1986) (BOUGANDOURA, 2013)**. La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (**OU *et al.*, 2001**) selon la figure



**Figure7** :- Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (PRIOR *et al.*, 2005)

TPTZ : ferric2,4,6-tripyridyl-s-triazine.

Fe<sup>2+</sup>: Ions ferreux.

Fe<sup>3+</sup> : Ions ferriques (PRIOR *et al.*, 2005).

### II.5. 2- Dosage :

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. 1 ml de chaque concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl<sub>3</sub> (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivant :

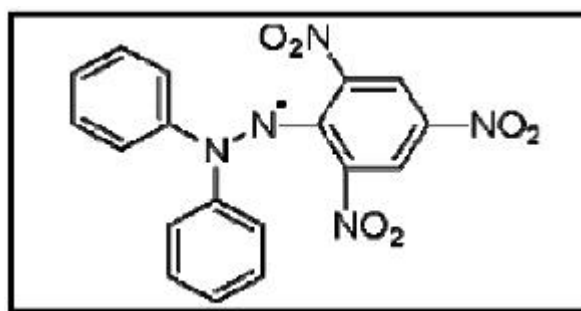
$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100.$$

Ao : est l'absorbance de FeCl<sub>3</sub>.

A1 : est l'absorbance de FeCl<sub>3</sub> solution en présence de l'extrait (GHAISAS et al., 2008).

## II.6. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

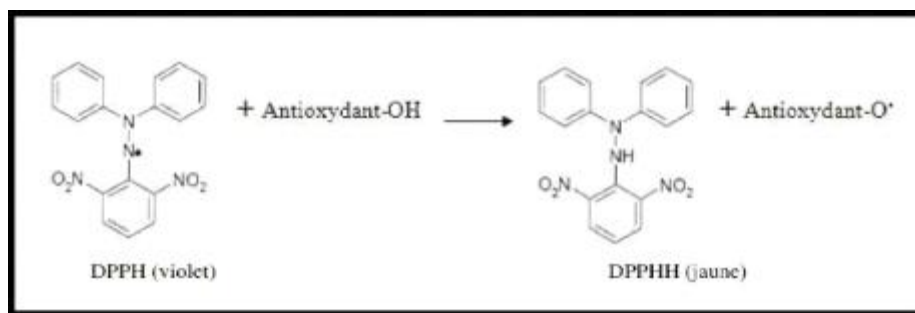
Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( , -diphényl picrylhydrazyl ) fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (BLOIS,1958; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Fig8.) (POPOVICI *et al.*, 2009)



**Figure8-** Structure chimique du radical libre DPPH  
(2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)  
(POPOVICI *et al.*, 2009).

### II.6. 1. Principe

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényl-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (MOLYNEUX, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Fig9.) (MAATAOUI *et al.*, 2006).



**Figure9-** Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).

## II.6. 2. Dosage

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Benhammou *et al.* (2007)**. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

Un volume de 50  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50  $\mu$ l du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration .

Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

Où :

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Ac : absorbance du contrôle

At : absorbance du test effectué

Calcul des IC50 : L' IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH . Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.



## II. Résultats et discussion

L'extraction éthanolique et l'extraction méthanolique ont été faites après avoir séché la plante à l'ombre et l'avoir rendu en poudre. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (Marston et Hostettmann, 2006).

Le séchage de la plante à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Jones et Kinghorn, 2005). L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière à pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage.

### I. 1. Détermination de rendement d'extraction

Les extractions des composés phénoliques de notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanolique et éthanolique. Le rendement qui a été déterminé par rapport à 30 g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau IV**

**tableau IV** :Le rendement de l'extrait méthanolique et éthanolique de *Cytisus villosus*.

Extrait	Méthanolique	Ethanolique
Rendement (%)	13.33	6.66

Les résultats obtenus (**Tableau**) montrent que le rendement en extrait méthanolique des feuilles de *Cytisus villosus* (13,33%) est légèrement supérieur à celui de l'extrait éthanolique (6,66%). L'analyse statistique, par le test ANOVA suivi par le test de comparaison multiple (HSD), a montré une différence très hautement significative entre les deux extraits avec ( $p > 0,001$ ).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction

solide-liquide des polyphénols : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenu à température ambiante (Majhenic *et al.*, 2007).

## I. 2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux, de l'extraits méthanolique et éthanolique de *C. villosus* a été déterminée en utilisant la méthode de Folin Ciocalteu. Les résultats exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche. sont présentés dans le tableau V

**Tableau V.** Teneur des extraits éthanolique et méthanolique de *C villosus* en polyphénols totaux.

Extrait	Polyphénols
Ethanolique	65,53 ± 2,55
Méthanolique	134 ,73 ± 3,25

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, que l'extrait éthanolique avec des valeurs de 134,73 et 65,53 mg eq Ac. Gallique/g , respectivement. De plus une différence très hautement significative a été détectée par l'analyse statistique des résultats ( $p>0,001$ ).

La variabilité des teneurs en polyphénols chez ces espèces végétales est du probablement à la composition phénoliques des extraits (Hayouni *et al.*, 2007), aux facteurs génotypiques (El-Waziry, 2007), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (Ksouri *et al.*, 2008), la nature du sol et le type du microclimat (Atmani *et al.*, 2009) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes.

Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode Folin, elle n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton *et al.*, 1999).

### I. 3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique et éthanolique des feuilles de *C. villosus* a été déterminée en utilisant de trichlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en mg eq la quercétine/g matière sèche (**tableau VI**)

**Tableau VI.** Teneur en flavonoïdes des extraits éthanolique et méthanolique des feuilles de *C. villosus*

Extrait	Flavonoïdes
Ethanolique	11,26 ±4,72
Méthanolique	9,89 ±1,60

L'analyse statistique des résultats du tableauVI n'a montré aucune différence significative entre l'extrait méthanolique et éthanolique concernant la teneur en flavonoïdes avec ( $p>0,05$ ). L'analyse par la régression linéaire n'a montré aucune corrélation entre le taux des polyphénols et la teneur en flavonoïdes avec ( $p>0,05$ ) et  $R^2=0,04$ .

D'après les teneurs obtenues dans notre étude, nous pouvons dire que les feuilles de *C. villosus* constituent une source non négligeable de flavonoïdes.

**Maisuthisakul et al., (2008)** ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits éthanoliques de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. D'un autre coté, **Bilusic Vundac et ses collaborateurs, 2007** ont démontré une corrélation négative ( $R = -0.26$ ) entre la teneur des polyphénols totaux de 7 espèces de *Stachys taxa* et celle des flavonoïdes.

### I.2. L'activité antioxydante des extraits de *Cytisus villosus*

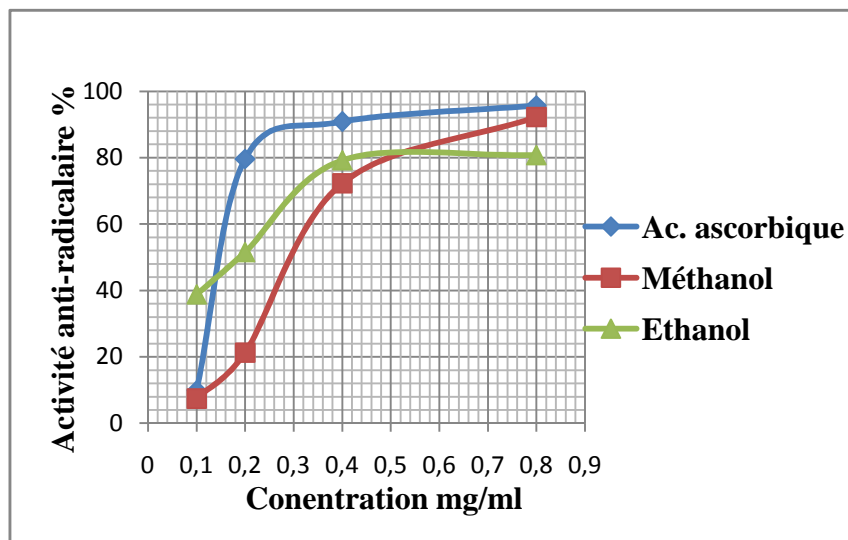
#### I.2.1. Test anti radicalaire (DPPH)

Pour détecter l'activité antiradicalire des différents extraits de *Cytisus villosus*, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en

routine en repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration.

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité anti radicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC50, qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus montrent que les extraits éthanolique et méthanolique de *C. villosus* ont une activité anti radicalaire concentration dépendante (Figure 10)

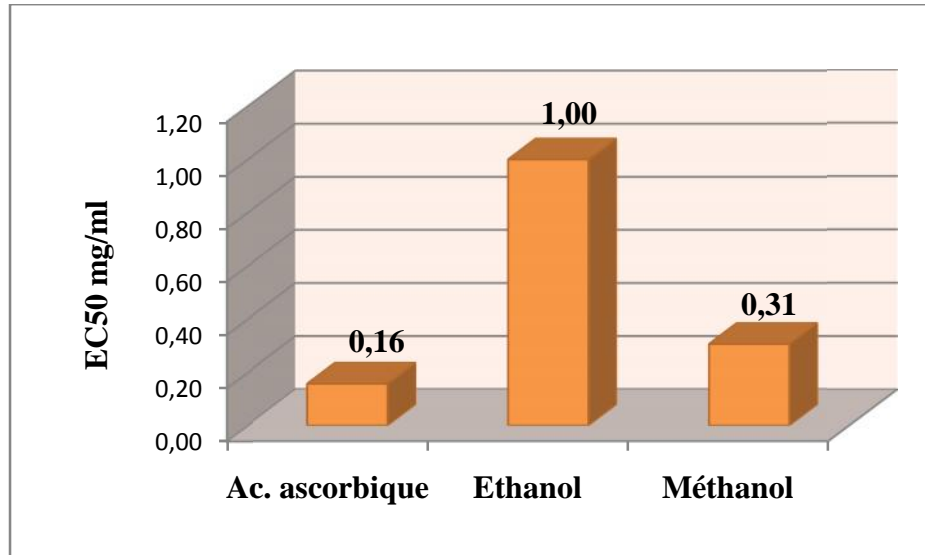


**Figure10** :Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait éthanolique de *C.villosus* et l'anti-oxydant standard (L'acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH.

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure 10) révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence sont des anti-radicalaires.

L'extrait méthanolique a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée (92.30%), suivie par l'extrait éthanolique (80.76%).Ces deux derniers ont présenté une différence très hautement significative dans leur activité ( $P < 0.001$ ). L'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant standard à montré un effet maximal de 95,77% envers le radical DPPH à une concentration de 0.8 mg/ml.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus révèlent que les extraits possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante, les EC50 de chacun des différents extraits ont été déterminées, les résultats sont présentés dans la figure 11



**Figure 11** : Résultats des concentration effectrices 50% de l'activité anti radicalaire.

A partir de figure, on observe que l'extrait de méthanol a montre une EC50 la plus petite (0.31mg/ml), tandis que la valeur de l'EC50 est de 1mg/ml pour l'extrait éthanolique, avec une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ).

Selon (**Turkmen et al., 2007**) les polyphénols semble être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. (**Turkmen et al., 2007**) ont constaté que les extraits du thé noir ayant une activité anti-oxydante très élevée, ont également un contenu plus élevé en polyphénols.

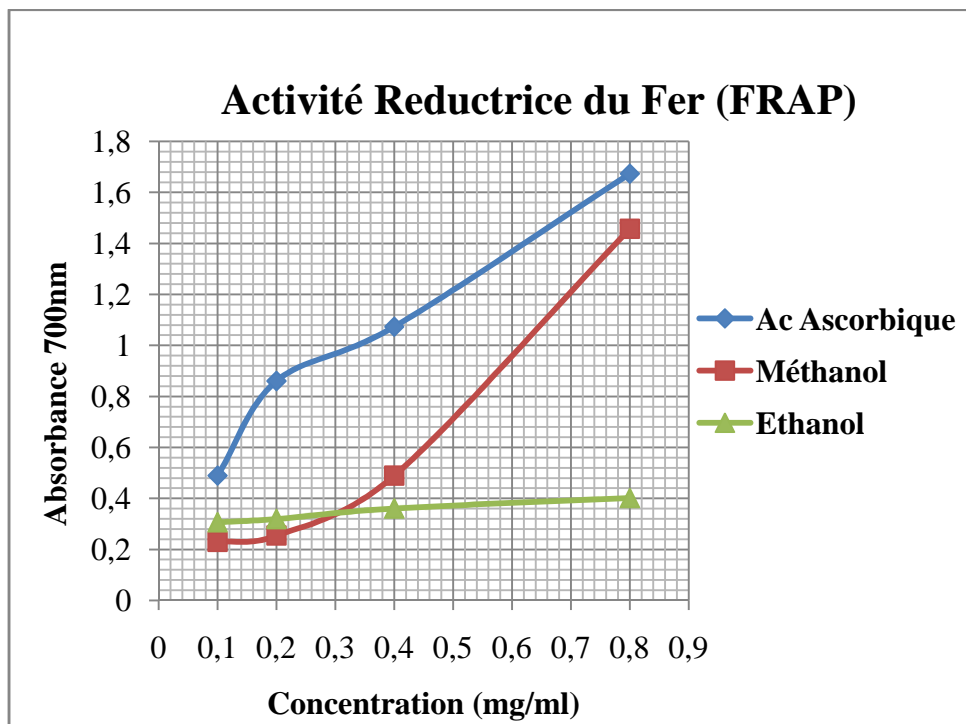
Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**).

D'un autre coté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (**Falleh et al., 2008**).

### I.2.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux des solutions standards de l'acide ascorbique. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de concentration. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

On résume les résultats des tests du pouvoir réductrice dans la figure 12:



**Figure 12 :** Activité réductrice des extraits éthanolique et méthanolique de *Cytisus villosus* et de l'acide ascorbique vis-à-vis du fer ferreux.

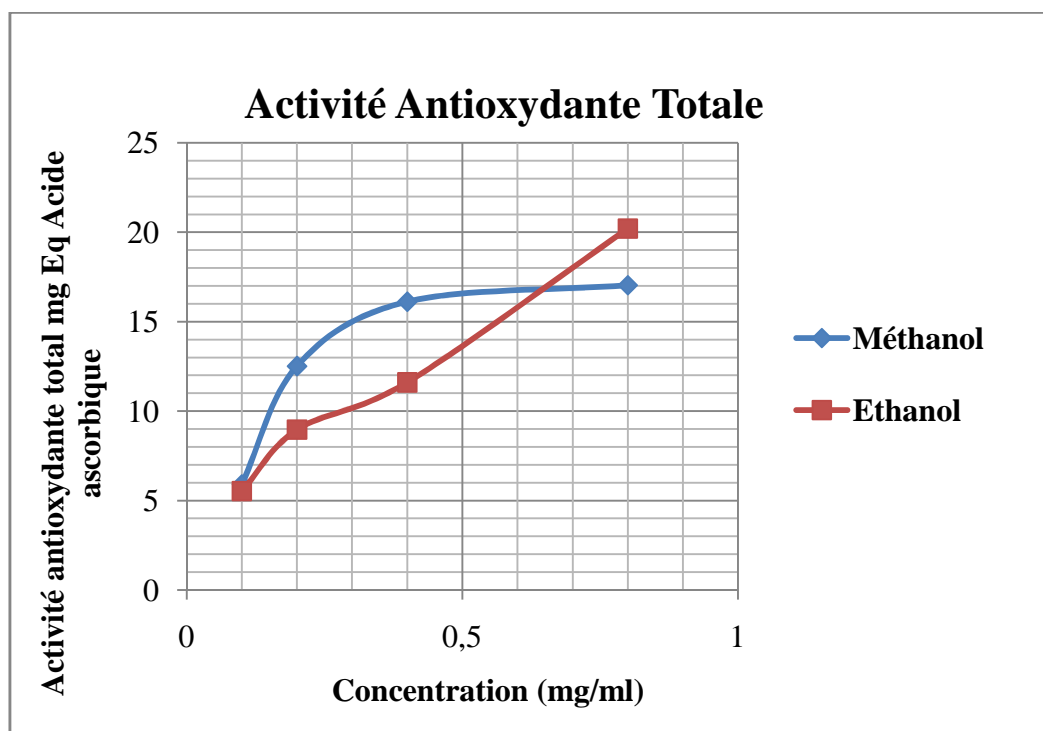
Selon les résultats de la figure 12 l'extrait méthanolique a montré une activité réductrice élevée par rapport à l'extrait éthanolique avec des absorbance de 1,458 et 0,402 respectivement.

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang *et al.*, 2008). Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim *et al.*, 2001).

Par ailleurs, la plupart des activités antioxydantes non enzymatiques telles que le piégeage du radical libre et l'inhibition de la peroxydation est mis en place par la réaction rédox (Zhu *et al.*, 2002).

#### I. 2. 4. Activité antioxydante totale (TAC)

L'activité antioxydante totale a été déterminée pour les deux extraits et exprimée en mg Eq Acide ascorbique/g. Les résultats sont montrés dans la figure 13



**Figure 13** : L'activité antioxydante total mgEqA asorbique des extraits méthanolique et éthanolique de Cytisus villosus

Un effet anti radicalaire maximal de 17,04 mg EAA/g est exercé par l'extrait méthanolique et de 20,21mg EAA/g par l'extrait éthanolique à une concentration de 0.8 mg/ml. L'analyse statistique a montrée une différence significative entre les deux extraits (p 0.05).

Miliauskas *et al* (2004) qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre d'une part.

La régression linéaire n'a montré aucune corrélation entre le taux des polyphénols et l'activité anti oxydante totale. Cette confirmation est largement répandue dans la littérature (Sun *et al.*,

**2005).** Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols exhibe une activité antioxydante puissante (**Moure *et al.*, 2001**).

Nos résultats on montré que l'extrait méthanolique ayant une meilleure activité antioxydante, et que les feuille de *Cytisus villosus* peuvent être une source non négligeable des substances à activité antioxydante.



## Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, différents aspects de *Cytisus villosus* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes des extraits bruts.

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes était conséquente.

Concernant l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage de radical DPPH et de réduction de fer, et la capacité antioxydant totale (TAC).

Nous avons constaté pour l'activité antioxydante par la méthode réduction de fer, que tous les extraits de la plante étudiée ont la capacité de réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration. Comme nous avons remarqué que les extraits présentent une capacité intéressante pour réduire le fer par rapport à l'acide ascorbique.

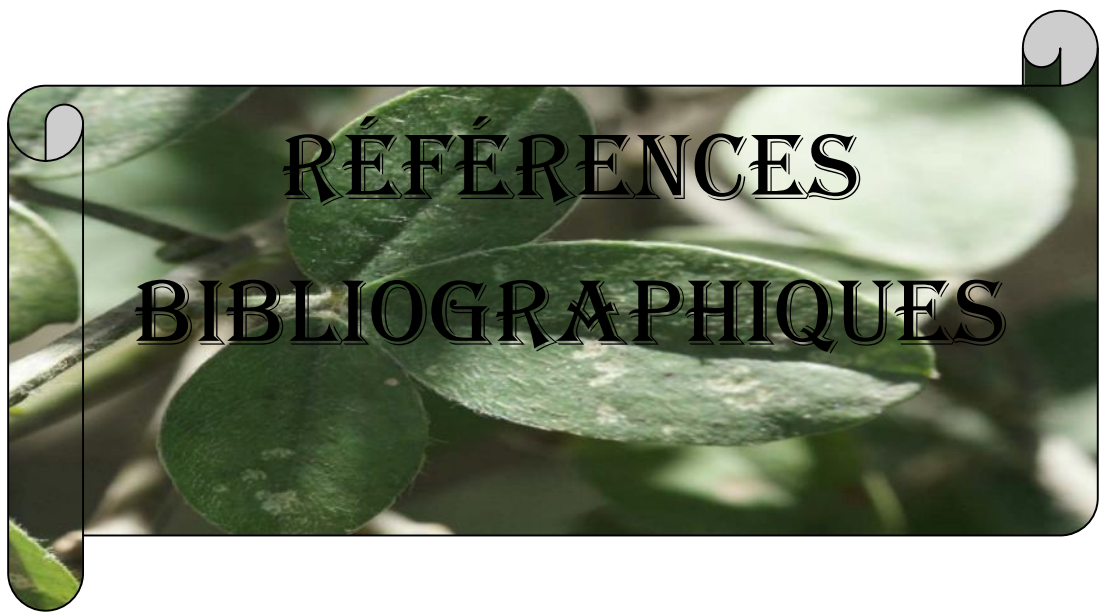
Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH et en comparant les IC50 des différents extraits testés par rapport a l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydante très importante.

Par ailleurs, à partir des résultats d'évaluation de la réduction de molybdène, on a remarqué une activité antioxydante importante, et que les deux extraits de la plante étudiée ont la capacité de réduire le molybdène qui augmente en fonction de la concentration aussi.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que *Cytisus villosus* est riche en Phénols Totaux et en Flavonoïdes. Les extraits donnent une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage de radicaux libres, la réduction de fer et la réduction de molybdène.

Notre perspective d'avenir est d'étudier chaque extrait séparément puis isoler et identifier les différents composés qui existent.

Enfin, nous recommandons une culture des plantes médicinales et alimentaires pour permettre à la population d'avoir des médicaments et des denrées alimentaires moins chers et d'éviter la disparition de certaines espèces intéressantes.



## Références

### (A)

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

**Ahsan, H., Ali, A., Ali, R. (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*.131: 398-404.

**A-M. Diallo (2005).** Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Photochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée).Thèse de Doctorat. Université de Bamako.

**Athamena S., Chalghem I., Kassah –Laouar A., Laroui S., Khebri S., (2010).** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. Vol 11 (1)

**Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache,N., Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

**Aruoma O I (1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8 (1), 53-63.

### (B)

**Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. et Pinkas M (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*.

**Bartosz, G. (2003)** .Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.

**Beckman K B et Ames B N (1998).** The Free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2), 547-581.

**Benhammou N., Bekkara A., Kadifkova P.( 2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*,29(3), 155-161

**Bilusic Vundac, V., Brantner, A.H., Plazibat, M. (2007)** Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chem.* (in press).

[BioLib](#) : [Cytisus Desf.](#)

**Blokhina O, Virolainen E et Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, 91, 179-194

**Boizot N., et Charpentier .J.P (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

**Bougandoura N., Bendimerad N( 2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie.* (9)

**Bubonja-Sonje M, Giacometti J et Abram M (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.

(C)

**Congo M ( 2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso

(D)

**Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005)** IN:Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds:Taylor & Francis Group(U.S.A), Pp: 703-861

**Dupont F. et Guignard J.L (2007)** . *Abrégé de Botanique* 14ème édition. Editions Masson, Paris; 285

**(E)**

**El-Waziry, A.M. (2007).** Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.

**Evans W J (2000).** Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 647-652.

**(F)**

**Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M et Abdelly C (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

**Favier A (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115

**(G)**

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

**Ghabrier J. Y.( 2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165.

**GhaisasM., Navghare V., TAKAWALE A., Zope V., Deshpande A.( 2008).** Invitro antioxidant activity of *tectona grandis* linn. *Pharmacologyonline*

**Gião M S, Leitão I , Pereira A, Borges A B, Guedes C J , Fernandes J C, Belo L, Santos-Silva A, Hogg T A, Pintado M E and Malcata F X (2010).** Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. *Food Control*, 21, 633-638.

**Graham H.D. (1992).** Stabilisation of the Prussian blue colour in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 40:801-805.

**Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M et Aboul-Enein H Y (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53

**(H)**

**Hagerman A E et Butler L G (1989).** Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15 (6), 1795-1810.

**Halliwell, A., Gutteridge, J.M.C. (1990)** The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 280: 1-8.

**Halliwell, B.(1995).** Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol* 49, 1341-1348.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.(2007).** Free radicals in biology and medicine. Ed, Clarendon Press, Oxford

**Halliwell, B., Whiteman, M. (2004)** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.

**Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003)** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 91: 7-11.

**Hayouni, E.A., Abedrabba. M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.

**Huang D., Ou B. Et Prior R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem.* 53:1841-1856. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 544-551.

**Hubert J. ( 2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

**Hu F B (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview.

(I)

[ITIS](#) : [Cytisus Desf](#)

(J)

**Jones W P et Kinghorn A D (2005).** Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.

(K)

**Koehlin-Ramonatxo, C. (2006)** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*.20:165-177

**Kohen, R., Nyska, A. (2002)** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*.30: 620-650.

**Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249

(L)

**Laguerre M, Lecomte J et Villeneuve P (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.

**Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001)** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.

**Le K, Chiu F and Ng K (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363.

(M)

**Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. (1)

[Madagascar Catalogue](#)

**Maisuthisakul, P; Suttajit, M; Pongsawatmmit, R. (2007).** Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants, *Food Chemistry*, 100: 1409-1418

**Majhenic L., kerget M.S., Knez Z. ( 2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, **104**, 1258–1268.

**Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. (2007).** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. **12**: 423-432.

**Martínez-Cayuela, M. (1995)** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*.77: 147-161.

**Maurice N (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris,

**McManus J P, Davis K G, Lilley T H et Haslam E (1981).** The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 309-311.

**Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A.,(2013).** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa l. *Lebanese Science Journal*. Vol 14 (1)

**Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., van Beek, T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85: 231–237

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

**Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M.J., Parajo, J. C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72: 145–171.

**(O)**

**OU B., Hampsch-Woodill M., Prior R L.,(2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

**Oyaizu, M., (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

**(P)**

**Pal Yu, B. (1994)** Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *PhysiopathologicalReviews*. 74: 139-155.

**Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.(2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16(4), 233-239.

**Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).

**Popovici C., Saykova I., Tylkowski B.(2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*

**Prieto P., Pineda M., Aguilar M.,(1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*.

**Prior R L., Wu X., Schaich K., (2005).** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . *Agric. Food Chem*.

**(R)**

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evens, C.,( 1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237.

**Roussel A M (2009).** Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, pp: 7.

**(S)**

**Sango R.(2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.

**Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M et Sharma P (2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.

**Seidel V (2005).** Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. *Natural products isolation*. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.

**Singleton V L., Rossi J A.(1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*.

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

**Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002)** Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis,*Free radical biology & medicine*. 33: 575-586.

**Sorg, O.(2004)** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes RendusBiologies*.327: 649-662.

**Sun, T., Ho, C-H. (2005).** Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743–749.

(T)

**Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. **12**:484-496.

(V)

**Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007)** .Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*.39: 44-84.

**Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P et Brumaghim J L (2011).** Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1314-1322.

(W)

**Wojciechowski M.F., Lavin M. et Sanderson M.J (2004).** A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 2004; 11: 1846-

(Y)

**Yang C., Landau M., Huang M. T., Newmark H.L.(2001).** Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds». *Anna. Rev. Nutr.*, **21**, 381- 406.

**Yildirim, A; Mavi ,A; Kara, A.A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4083-4089.

**Yi Z., Yan Y., Liang Y., et Zeng B. (2008).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of PericarpiumCitriReticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid.*LWT*, 41:597-603

(Z)

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

**Zhu Q.T., Hackman R.M., Ensunsa J.L., Holt R.R., Keen C.L. (2002)**. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6929–6934.

**Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006)**. The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*.70: 181-190.

## Références électroniques

**SITE1** :[http://www.florealpes.com/photos/cytisusvill\\_9.jpg?PHPSESSID=0a72039f5036d91c7df80dd406b795b0](http://www.florealpes.com/photos/cytisusvill_9.jpg?PHPSESSID=0a72039f5036d91c7df80dd406b795b0)

**SITE2** : <http://api.tela-botanica.org/img:000113399CRS.jpg>

**SITE3** : <http://quelle-est-cette-fleur.com/img/especes/hd/cytise-velu-3.jpg>

**SITE4** :<http://www2.ulg.ac.be/cord/incinq/osix.gif>

**SITE5** : [www.tela-botanica.org/bdtx-nn-21084](http://www.tela-botanica.org/bdtx-nn-21084)

**SITE6** : [www.florealpes.com/fiche\\_cytisusvill.php](http://www.florealpes.com/fiche_cytisusvill.php)

**SITE7**[www.plantes-ornementales.com/c-villosus.html](http://www.plantes-ornementales.com/c-villosus.html)

## Résumé

*Cytisus villosus* est une plante médicinale appartenant à la famille des Fabaceae, cette espèce connue sous le nom de «*Cytisus triflorus* L'Her», est très répandue dans L'afrique du nord, Europe (Méditerranée), Turquie. Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant deux solvants à savoir le méthanol et l'éthanol. Les rendements respectifs sont : 13.33% -6.66%.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 65,53 - 134,73 mg EAG/g Ps dans les extraits éthanolique et méthanolique respectivement.

Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AlCl<sub>3</sub>, leur teneur est de 11,26 -9,89 mg EQ/g Ps dans les extraits éthanolique et méthanolique respectivement.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de réduction de radical libre DPPH et la réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et l'activité antioxydante totale (TAC). Pour le premier test L'CI50 à été estimée à 0.19 - 0.29 µg/ml pour les extraits de l'éthanol et méthanol respectivement. Alors que celle du témoin positif L'acide ascorbique est de 0.15 µg/ml. Pour le second test (FRAP), les résultats montre que l'extrait méthanolique ayant une activité réductrice plus élevée que l'extrait éthanolique. Pour l'activité antioxydante totale, Les résultats sont de l'ordre 17,04 mg EqAA -20,21 mg EqAA pour les extraits de méthanol et éthanol respectivement.

**Mots clés :** Fabaceae, *Cytisus villosus*, extraits organiques, activité antioxydante.

هي نبتة طبية تنتمي لعائلة البقوليات, تتواجد هذه النبتة بكثرة في شمال إفريقيا, الدول الأوروبية المطلة  
, و تركيا. تم الحصول على مستخلصات النبتة العضوية عن طريق النقع في المذيبات  
العضوية (الإيثانول و الميثانول). %13.33 % 6.66 .

تم تحديد المحتوى الكلي للبوليفينول باستعمال محلول فولين سيوكالتو. الذي وجدناه يساوي 65.35  
134.73 مغ مكافئ حمض الغاليك الايثانول والميثانول على التوالي.

حددت كمية الفلافونويد باستعمال كلورور الالمينيوم 9.89 11.26 مغ مكافئ الكارسييتين.

. طريقة ارجاع الجذور الحرة, و ارجاع شوارد الحديد,

والقدرة الاجمالية المضادة للاكسدة. بالنسبة للتجربة الاولى قمنا بقياس التركيز المثبط 50.

تراكيز 0.19 0.29 ميكرو غ/مل بالنسبة لمستخلص الميثانول والايثانول على التوالي, في حين كان التركيز  
بالنسبة للشاهد 0.15 ميكرو غرام/ . بالنسبة للتجربة الثانية, اظهرت النتائج ان مستخلص الميثانول  
لديه قوة ارجاعية اكبر من مستخلص الايثانول. كانت القيم 17.04

20.21 مغ مكافئ حمض الاسكوربيك بالنسبة للمستخلص الميثانولي والايثانولي على التوالي.

الكلمات المفتاحية: البقوليات, , المستخلصات العضوية, .

## Abstract

*Cytisus villosus* is a medicinal herb belonging to the family of Fabaceae, this species known under the name of “*Cytisus triflorus* Her”, is widespread in North Africa, Europe (the Mediterranean), and Turkey. The organic extracts were obtained by maceration using two solvents: methanol and ethanol. The respective outputs are: 13.33% -6.66%.

The total content of phenol compounds was given using the Folin-Ciocalteu reagent, the results were of 65.53 - 134,73 mg EAG/g for the ethanol and metabolic extract respectively.

The flavonoïdes were evaluated using the  $AlCl_3$  method, their content was de11, 26 - 9.89 mg EQ/g for ethanolic and methanolic the extracts respectively.

The antioxidant activity was evaluated using three different methods: method of free reduction of radical the iron DPPH and reduction: FRAP (Ferric Reducing AntioxidantPower) and the total antioxydant activity (TAC). For the first test the IC50 at estimated at 0.19 -0.29  $\mu$ g/ml for the extracts of ethanol and methanol respectively. Where as that of the positive witness ascorbic Lacide is of 0.15 $\mu$ g/ml. For the second test (FRAP) the results have shown the the methanol extract has more reducing power than ethanol extract. And for the third test it was estimated à17,04 Mg EqAA -20.21Mg EqAA for the extracts of methanol and ethanol respectively.

**Keywords:** Fabaceae, *Cytisus villosus*, organic extracts, antioxydant activity.