

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

N° ...../SNV/2018

## THÈSE

Présentée par

**MERIANE DJAMILA**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE**

## THÈME

**Etude biologique et phytochimique de *Calobota saharae*  
(Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E. van Wyk**

Soutenue publiquement le ...../...../2018

### DEVANT LE JURY

|            |                              |                                         |
|------------|------------------------------|-----------------------------------------|
| Président  | <b>FENNI Mohamed</b>         | <b>Pr. UFA Sétif 1</b>                  |
| Directeur  | <b>BOUTEFNOUCHET Sabrina</b> | <b>MC. Univ. Paris Descartes-France</b> |
| Examineurs | <b>MICHEL Sylvie</b>         | <b>Pr. Univ. Paris Descartes-France</b> |
|            | <b>DAHAMNA Saliha</b>        | <b>Pr. UFA Sétif 1</b>                  |
|            | <b>SARRI Madani</b>          | <b>Pr. Univ de M'Sila</b>               |

*Laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques (LPAMC)*

## ملخص

تتواجد النباتات الصحراوية الخاصة أساسا في النظم البيئية الحساسة، لا سيما في المناطق شبه الصحراوية في شمال الصحراء. تتميز هذه النباتات بتكيفها مع المناخ الجاف والتربة ذات الملوحة العالية. تركزت دراسة النوع *Calobota saharae* على جوانب مختلفة: البيئة النباتية، الشكل، التركيب الكيميائي وبعض الأنشطة البيولوجية. أظهرت الدراسة المورفولوجية توافق مع ضم الأنواع *Calobota saharae* (Dur & Coss). Boatwr. B.E.van ضمن قبيلة Crotalarieae وليس في قبيلة Genistae. كما أظهر تحليل التربة الرملية في موطن النبات بأنها فقيرة من حيث محتواها من المواد العضوية والنيتروجين. بين أيضا تحليل كمية النيتروجين بطريقة كجيلدال (Kjeldahl) بأن تركيزه متغير في مختلف أجزاء النبات وبأن المعدل الأعلى يكون في البذور (بروتين 32%). تبين أيضا من تحليل القلويدات بأنها موجودة في جميع أجزاء النبات (4.2%)، لكن يبدو أن تركزها يكون في الأجزاء الخضراء (الفروع والقشرة). تم تحديد في المجموع 3 قلويدات: ammodendrine، N-acétylhystrine و N-formylammodendrine. تراوحت نسبة الفلافونويدات على مستوى العينات الجذرية التي تم جمعها في شهر أوت والزهور التي تم جمعها في مارس بين 0.2% إلى 2.6% و نسبة عديدات الفينول بين 9.32% و 1.99%. سمحت التنقية بواسطة HPLC التحضيرية من عزل 5-O-Méthoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine (5OMeC8CG) التي تحوي النشاط المضاد للأكسدة (DPPH) باستعمال البيوتوغرافيا HPTLC (bioautography) و dereplication الممزوجة مع الطيف الكتلي (HPTLC-MS) بمحاصرة المتطرف. كما تم تحديد الجزيئات الرئيسية التي تساهم في النشاط المضاد للأكسدة وهي 3،4،5،7-tétrahydroxyisoflavones، ficiisoflavone، 5-methoxy-7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone و 4،5،7-dihydroxy-4-methoxy isoflavone. كما تبين أن 5-O-methoxy-8-glucopyranosyl-D-β-C-genisteine لا يساهم إلا قليلا في النشاط المزيح للجذور. أما فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا فإن السلالات الإشريكية، المكورات العنقودية، الكلبسيلا، السراتية، تمثل حساسية للقلويدات المعزولة من *Calobota saharae* في حين أن السلالة الزائفة، التي تعرف عموما بمقاومتها للمضادات الحيوية فهي تمثل حساسية متوسطة للمواد التي تم اختبارها.

**الكلمات المفتاحية:** مضاد للبكتيريا، مضاد للأكسدة، فلافونويد، قلويدات، Fabaceae، *Calobota saharae*، Chemotaxonomy.

## Résumé

La flore saharienne, particulière se retrouve notamment dans des écosystèmes sensibles et notamment dans les zones semi-désertiques du Sahara septentrional. Elle est très remarquable par son adaptation à un climat sec et à un sol à forte salinité. L'étude de l'espèce endémique *Calobota saharae* présentée dans ce travail a porté sur différents aspects : écologie de la plante, morphologie, composition phytochimique et quelques activités biologiques.

L'étude morphologique est en accord avec la description faite de l'espèce *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, dans la tribu des Crotalariae et non plus dans la tribu des Genistae. Au niveau de l'habitat de la plante, l'analyse du sol a montré que le sol dunaire est pauvre en matière organique et en azote. Le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl dans les différents organes de la plante est variable, cependant le taux est maximal dans la graine (32% de protéines).

Les alcaloïdes sont présents dans quasiment toutes les parties de la plante (rendement moyen est de 4.2%), mais semblent se concentrer dans les parties vertes (rameaux et péricarpes). Au total, 3 alcaloïdes pipéridiniques ont été identifiés: ammodendrine, *N*-acétylhystrine et *N*-formylammodendrine.

La teneur en flavonoïdes varie de 0.212 à 2.614%, et la teneur en polyphénols totaux de 1.996 à 9.328%. Les teneurs les plus élevées sont observées pour les échantillons de racines collectées au mois d'Aout et celui de fleurs collectées au mois de mars. Une purification par HPLC préparative a permis d'isoler 5-O-Methoxy-8-C-  $\beta$  -D-glucopyranosyl-genistein (**5OMeC8CG**). La bioautographie par HPTLC et la déréplication par couplage à la spectrométrie de masse (HPTLC-MS) a permis une identification putative des composés phénoliques présentant une activité antioxydante (piégeage du radical DPPH). Les molécules principales identifiées comme contributrices à l'activité antioxydante ont été identifiées putativement comme étant la 3',4', 5,7-tétrahydroxyisoflavones, la ficuisoflavone, 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8- glucopyranosylisoflavone et la 4',5-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone-4'-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside. La 5-O-methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine ne participe que faiblement à l'activité antiradicalaire des extraits.

Concernant l'activité antibactérienne, les souches *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, présentent une sensibilité aux extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae*. La souche *Pseudomonas*, généralement résistante aux antibiotiques présente une sensibilité intermédiaire aux produits testés.

**Mots clés :** Antibactérien, Antioxydant, Alcaloïdes, Flavonoïdes, *Calobota saharae*, Fabaceae, Chimie taxonomie.

## Abstract

The Saharan flora, found in sensitive ecosystems and particularly in the semi-desert areas of the northern Sahara, is very remarkable for its adaptation to a dry climate and a high salinity soil. The Present study of endemic species *Calobota saharae* focused on different aspects: plant ecology, morphology, phytochemical composition and biological activities.

The morphological study is consistent with the description of *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, in the Crotalariae tribe and no longer in the Genistae tribe. At the level of the plant habitat, soil analysis has shown that the dune soil is poor in organic matter and nitrogen. The determination of the total nitrogen by the Kjeldahl method in the various organs of the plant is variable, however the rate is maximum in the seed (32% of proteins).

The alkaloids are present in almost all parts of the plant (4.2%), but seem to focus in the green parts (branches and pericarp). In total 3 piperidine alkaloids were identified: ammodendrine, N-acétylhystrine and N-formylammodendrine.

Flavonoid content varies between 0,2-2,6%, and total polyphenol content of 9.32% to 1.99% highest levels are observed for root samples collected in the month of August and the flowers collected in March. Purification by preparative HPLC made it possible to isolate 5-O-Methoxy-8-C-  $\beta$  -D-glucopyranosyl-genistein (**5OMeC8CG**). HPTLC bioautography and Mass Spectrometry Coupled Dereplication (HPTLC-MS) allowed for putative identification of phenolic compounds with antioxidant activity (DPPH radical scavenging). Main molecules identified as contributing to the antioxidant activity were identified as putative 3', 4', 5,7-tétrahydroxyisoflavones, the ficuisoflavone, 5-methoxy-4', 7-trihydroxy-8- gluco-pyranosyl-isoflavone and 4' 5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'-O-  $\beta$  -D-glucopyranoside. 5-O-methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-genistein only contributes slightly to the antiradical activity of the extracts.

Concerning the antibacterial activity, the strains *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, have a sensitivity to alkaloidal extracts of *Calobota saharae*. The *Pseudomonas* strain, generally resistant to antibiotics has an intermediate sensitivity to the products test.

**Keywords:** Antibactérien, Antioxydant, Alkaloids, Flavonoids, *Calobota saharae*, Fabaceae, Chemotaxonomy.



## DÉDICACES

- À la mémoire de ma très chère mère,
- À la mémoire de mon très cher père,  
*Que Dieu le tout puissant vous accorde son paradis éternel (amine).*
- À mon cher mari et à mes enfants la prunelle de mes yeux (Intissar, Mohamed Abdeljalil et Abdellah bassem), vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me réconforter et m'encourager dans les moments les plus difficiles.
- À ma grande et charmante famille et belle famille ;

Enfin, à mes chers collègues Chouaha, Tvetelina, Abou Dang et Sergio

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé santé, courage et foi.

L'aboutissement de ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration de plusieurs années, il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais en premier remercier grandement ma directrice de thèse, Madame Boutefnouchet Sabrina, Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris Descartes, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigué.

Un grand merci à Monsieur Kaabeche Mohamed, Professeur de l'université Ferhat Abbas de Sétif, dont le thème de recherche a été à l'origine de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Madame Sylvie Michel, Professeur à l'Université Paris Descartes, Directrice du Laboratoire de Pharmacognosie qui m'a accueillie pour quelques années au sein de son laboratoire. C'est grâce à elle que j'ai pu concilier avec bonheur recherche théorique et appliquée pendant cette thèse. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a témoignée et je l'assure de ma profonde reconnaissance. Ces remerciements s'accompagne d'un hommage au regretté Professeur François Tillequin qui a été à l'initiative du démarrage de ces travaux de recherche au sein du laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Descartes.

Je tiens à remercier Monsieur Fenni Mohamed d'avoir accepté d'être président de ce jury de thèse et pour sa participation scientifique, et je remercie vivement les membres de jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, Madame Dehamna Saliha Professeur à l'université Ferhat Abbas de Sétif, et Monsieur Sarri Madani Maître de conférences à Université de M'Sila.

Je suis également très reconnaissante envers Monsieur Gregory Genta-Jouve Maître de Conférences à l'Université Paris Descartes pour son aide dans la réalisation des analyses en HPTLC-MS, ainsi qu'envers Madame Elisabeth Seguin, Professeur à l'Université de Rouen, et Monsieur Philippe Vérité, pour leur contribution dans la réalisation des analyses de CPG-MS ayant permis la détermination des structures des alcaloïdes de la plante

Ce travail a nécessité des déplacements sur site et des activités de terrain, aussi c'est avec plaisir que je remercie vivement les forestiers de la Conservation des Forêts de la Wilaya de M'sila (Boussaâda), particulièrement sont chef de service Madame Dali Zahia et ceux qui ont bien voulu nous accompagner sur le terrain sans oublier Monsieur Maamouri Adelrazek et Mademoiselle Labadi Wafa.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Descartes: Brigitte, François-Hugues, Thomas, Xavier et particulièrement Monsieur Olivier Hermet et Madame Chouaha Bouzidi pour leur aide pendant la période de mon travail au laboratoire.

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Aperçu de la phylogénie des légumineuses .....                                                                          | 8  |
| <b>Figure 2.</b> Schéma fleur général papilionacées .....                                                                                | 9  |
| <b>Figure 3.</b> Phylogénie groupe Cap de la tribu des Crotalariaeae (Boatwright <i>et al.</i> ,2008) .....                              | 15 |
| <b>Figure 4.</b> Phylogénie groupe Cap de la tribu des Crotalariaeae (Boatwright <i>et al.</i> ,2010) .....                              | 16 |
| <b>Figure 5.</b> Morphologie de <i>Calobota saharae</i> .....                                                                            | 18 |
| <b>Figure 6.</b> Carte : Localisation de la ville de Bou Saada, a la bordure Chott El Hodna, a la bordure Nord de l'Atlas saharien ..... | 20 |
| <b>Figure 7.</b> Localisation de la région d'étude .....                                                                                 | 21 |
| <b>Figure 8.</b> Précipitations mensuelles de la station d'Oued Maiter Bou Saada.....                                                    | 23 |
| <b>Figure 9.</b> Diagramme Ombrothermique de la station d'étude ( <b>Oued Maiter Bous Saada</b> ) .....                                  | 25 |
| <b>Figure 10.</b> Climagramme d'EMBERGER.....                                                                                            | 26 |
| <b>Figure 11.</b> Les principales classes de métabolites secondaires chez les végétaux .....                                             | 28 |
| <b>Figure 12.</b> Les principales classes d'alcaloïdes et leurs précurseurs chez les Fabacées .....                                      | 31 |
| <b>Figure 13.</b> Principaux groupes d'alcaloïdes issus de la Lysine .....                                                               | 32 |
| <b>Figure 14.</b> Schéma de la biosynthèse des pyrrolizidines .....                                                                      | 34 |
| <b>Figure 15.</b> . Schéma des alcaloïdes issus du L-tryptophane .....                                                                   | 34 |
| <b>Figure 16.</b> Biogenèse des alcaloides isoquinoleiques.....                                                                          | 35 |
| <b>Figure 17.</b> Schéma des alcaloïdes imidazoliques issus de l'histidine .....                                                         | 35 |
| <b>Figure 18.</b> Schéma (F) de distribution des alcaloïdes dans de la Famille des Fabaceae .....                                        | 36 |
| <b>Figure 19.</b> Schéma de la répartition des alcaloïdes au sein de la sous-famille des Papilionoideae .....                            | 37 |
| <b>Figure 20.</b> Structure des alcaloïdes au sien du clade Genistoides (Papilionoideae).....                                            | 38 |
| <b>Figure 21.</b> Structure des alcaloïdes dans les 9 genres de la tribu des Crotalariaeae .....                                         | 41 |
| <b>Figure 22.</b> Diagramme des voies biogénétiques des genres de la tribu des Crotalariaeae .....                                       | 42 |
| <b>Figure 23.</b> Schéma des vois biogénétiquesdes composés phénoliques .....                                                            | 44 |
| <b>Figure 24.</b> Structure des trois classes de composés phénoliques retrouvées chez les Fabacées .                                     | 45 |
| <b>Figure 25.</b> Différentes Variétés Structurales des flavonoides chez les Fabacées.....                                               | 45 |
| <b>Figure 26.</b> Voie de synthèse des isoflavonoïdes par l'enzyme isoflavone synthase (IFS) chez les Fabacées.....                      | 46 |
| <b>Figure 27 (A).</b> Distribution des isoflavones (rouge) dans de la Famille des Fabaceae .....                                         | 47 |
| <b>Figure 28 (B).</b> Distribution du rotenone (bleu) et de labufoténine (rouge) dans de la des Fabaceae .....                           | 48 |
| <b>Figure 29.</b> Structure des composés isoflavonoïques au sein de la tribu des <i>Genisteeae</i> .....                                 | 49 |

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 30.</b> Structure des composés flavonoïques au sein de la tribu des Genisteae.....                                                                                            | 51 |
| <b>Figure 31.</b> Structure des flavonoides et isoflavones chez <i>Calobota saharae</i> .....                                                                                           | 52 |
| <b>Figure 32.</b> Structure des alcaloïdes quinolizidiniques au sein de <i>Calobota saharae</i> .....                                                                                   | 55 |
| <b>Figure 33.</b> Physiopathologie du stress oxydant .....                                                                                                                              | 57 |
| <b>Figure 34.</b> Schéma des principales espèces réactives de l'oxygène.....                                                                                                            | 58 |
| <b>Figure 35.</b> Les propriétés anti oxydantes des flavonoïdes (quercetine) .....                                                                                                      | 58 |
| <b>Figure 36.</b> Mécanismes d'action des flavonoïdes .....                                                                                                                             | 59 |
| <b>Figure 37.</b> Schéma structurale entre plusieurs types de phytoestrogènes et l'oestradiol .....                                                                                     | 62 |
| <b>Figure 38.</b> Structure des isoflavones de soja .....                                                                                                                               | 63 |
| <b>Figure 39.</b> Hydrolyse des hétérosides d'isoflavones de soja dans l'intestin et formation d'équol.....                                                                             | 64 |
| <b>Figure 40.</b> Structure moléculaire de la génistéine et du 17 $\beta$ -oestradiol .....                                                                                             | 65 |
| <b>Figure 41.</b> Mécanismes impliqués dans l'activité antitumorale de la génistéine .....                                                                                              | 67 |
| <b>Figure 42.</b> Effet de la C8CG sur la viabilité cellulaire et sur l'apoptose .....                                                                                                  | 69 |
| <b>Figure 43.</b> Schéma d'un extracteur Soxhlet .....                                                                                                                                  | 74 |
| <b>Figure 44.</b> Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux.....                                                                                                                     | 75 |
| <b>Figure 45.</b> Protocole d'extraction des alcaloïdes type I et type II .....                                                                                                         | 76 |
| <b>Figure 46.</b> Protocole d'extraction à chaud des racines (mars) et des fleurs de <i>C.saharae</i> .....                                                                             | 78 |
| <b>Figure 47.</b> Chromatographie sur couche mince.....                                                                                                                                 | 79 |
| <b>Figure 48.</b> Schéma d'une chaîne de CLHP en mode analytique ou préparatif .....                                                                                                    | 82 |
| <b>Figure 49.</b> Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....                                                                                                                           | 82 |
| <b>Figure 50.</b> Chromatographie en phase gazeuse couple au spectre de masse (CPG/MS) .....                                                                                            | 83 |
| <b>Figure 51.</b> Pics chromatographiques de CPG/MS.....                                                                                                                                | 83 |
| <b>Figure 52.</b> Structure moléculaire du radical 1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl (DPPH•).....                                                                                         | 85 |
| <b>Figure 53.</b> CCM de la bioautographie sur des extraits de <i>Swietenia mahagoni</i> .....                                                                                          | 87 |
| <b>Figure 54.</b> Photos des appareils HPTLC-MS /TLC (ATS4) .....                                                                                                                       | 89 |
| <b>Figure 55.</b> Photo de l'appareil résonance magnétique nucléaire (RMN) .....                                                                                                        | 90 |
| <b>Figure 56.</b> Photo de la Station Oued Maiter, El-Maadher (Bou Saada, Mars 2003).....                                                                                               | 92 |
| <b>Figure 57.</b> Photo prise pendant la reconnaissance du matériel <i>Calobota saharae</i> ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.- E. van.)) Oued Maiter, El-Maadher (Bou Saada, Mars 2010)..... | 94 |
| <b>Figure 58.</b> Aspect morphologique de deux espèces fixatrices de dunes colonisent le même endroit ( <i>Retama retam</i> et <i>Calobota saharae</i> ) de la station d'étude .....    | 95 |
| <b>Figure 59 (a, b).</b> Rameaux pubescents et florifères de <i>C.saharae</i> .....                                                                                                     | 97 |
| <b>Figure 60.</b> Folioles de <i>C.saharae</i> (a : face inférieure) ; (b : face supérieure) .....                                                                                      | 98 |
| <b>Figure 61.</b> Pédoncules florifères de <i>C.saharae</i> .....                                                                                                                       | 98 |
| <b>Figure 62.</b> Fleur <i>C.saharae</i> (genêt saharien).....                                                                                                                          | 99 |

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 63.</b> Les étamines de <i>C. saharae</i> .....                                                               | 99  |
| <b>Figure 64.</b> Différentes tailles des anthères (long, moyen et court) de <i>C. saharae</i> .....                    | 100 |
| <b>Figure 65.</b> Ovaire de <i>C. saharae</i> .....                                                                     | 100 |
| <b>Figure 66.</b> Gousses de <i>C. saharae</i> .....                                                                    | 101 |
| <b>Figure 67.</b> Graines de <i>C. saharae</i> .....                                                                    | 101 |
| <b>Figure 68.</b> Différentes formes des racines de <i>C. saharae</i> .....                                             | 102 |
| <b>Figure 69.</b> CCM récapitulative révélation Dragendorff .....                                                       | 109 |
| <b>Figure 70 .</b> CCM récapitulative révélateur Iodoplatinate.....                                                     | 109 |
| <b>Figure 71.</b> CCM Récapitulative, révélateur : Iode .....                                                           | 110 |
| <b>Figure 72.</b> CCM récapitulativerévélateur : la ninhydrine.....                                                     | 110 |
| <b>Figure 73.</b> Plaque de CCM récapitulative montrant la présence de l'ammodendrine.....                              | 111 |
| <b>Figure 74.</b> Chromatogramme de l'extrait des rameaux mars de <i>C saharae</i> typeII (E4)<br>Agrandissement .....  | 113 |
| <b>Figure 75.</b> Chromatogramme de l'extrait des racines mars de <i>C saharae</i> typeII (E2).....                     | 113 |
| <b>Figure 76.</b> Chromatogramme de l'extrait des rameaux d'aout de <i>C saharae</i> typeII (E3).....                   | 113 |
| <b>Figure 77.</b> Chromatogramme de l'extrait des fleurs de <i>C saharae</i> type II (E5).....                          | 114 |
| <b>Figure 78.</b> Chromatogramme de l'extrait des téguments de <i>C saharae</i> Type II (E6).....                       | 114 |
| <b>Figure 79.</b> Chromatogramme de l'extrait des graines de <i>C saharae</i> type II (E7) .....                        | 114 |
| <b>Figure 80.</b> Structure des alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques identifiés chez <i>C. saharae</i> .....  | 115 |
| <b>Figure 81.</b> Plaque CCM extraits type I et type II des échantillons de <i>C saharae</i> .....                      | 119 |
| <b>Figure 82.</b> CCMSuivi du fractionnement par HPLC de l'extait methanolique des racines de <i>C. saharae</i> .....   | 120 |
| <b>Figure 83.</b> CCM des fractions HPLC (F <sub>12-19</sub> ) racines de mars de <i>C saharae</i> ) .....              | 122 |
| <b>Figure 84.</b> Structure du composé F2 .....                                                                         | 122 |
| <b>Figure 85 .</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé pur présent dans la fraction 2 (F2) .....   | 124 |
| <b>Figure 86.</b> CCM Suivi du fractionnement par HPLC de l'extrait methanolique des fleurs de <i>C.saharae</i> .....   | 125 |
| <b>Figure 87.</b> CCM des différentes fractions par HPLC de l'extrait methanolique des fleurs de <i>C saharae</i> ..... | 126 |
| <b>Figure 88.</b> Chromatogrammes 2D de l'extrait méthanolique de fleurs.....                                           | 127 |
| <b>Figure 89.</b> Chromatogrammes 3D de l'extrait méthanolique de fleurs.....                                           | 127 |
| <b>Figure 90.</b> Chromatogrammes 2D du 7-O-glucoside de lutéoline .....                                                | 128 |
| <b>Figure 91.</b> Chromatogrammes 3D du 7-O-glucoside de lutéoline .....                                                | 128 |
| <b>Figure 92</b> Chromatogramme 2D de l'isoflavone.....                                                                 | 128 |
| <b>Figure 93.</b> Chromatogramme 3D de l'isoflavone.....                                                                | 128 |
| <b>Figure 94.</b> Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (E1) de <i>C.saharae</i> ...               | 131 |

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 95.</b> Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout ( <b>E1</b> ) de <i>C.saharae</i> ...                             | 132 |
| <b>Figure 96.</b> Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout ( <b>E1</b> ) de <i>C.saharae</i> ...                             | 132 |
| <b>Figure 97.</b> Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout ( <b>E1</b> ) de <i>C.saharae</i> ...                             | 133 |
| <b>Figure 98.</b> Analyse HPTLC des extraits méthanoliques des septes échantillons de <i>C. saharae</i><br>une phase mobile « apolaire » ..... | 134 |
| <b>Figure 99.</b> Analyse HPTLC des extraits méthanoliques des septes échantillons de <i>C.saharae</i> .<br>Phase mobile polaire .....         | 135 |
| <b>Figure 100.</b> Chromatographie sur couche mince haute performance CCMHP ou HPTLC).....                                                     | 135 |
| <b>Figure 101.</b> Structure du composé phénolique (flavonoïdes et isoflavonoïdes).....                                                        | 137 |
| <b>Figure 102.</b> Structures putatives des composés identifiés de <i>C. saharae</i> .....                                                     | 139 |

## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Moyenne des précipitations mensuelles et annuelles de station d'étude .....                                                      | 23  |
| <b>Tableau 2.</b> Régime saisonnier de station d'étude. (1996 – 2015) .....                                                                        | 23  |
| <b>Tableau 3.</b> Températures moyennes mensuelles, minimales et maximales enregistrées en degré Celsius dans la station d'étude (1996-2015) ..... | 24  |
| <b>Tableau 4.</b> Valeurs du quotient pluviothermique d'Oued Maiter Bou Saada .....                                                                | 26  |
| <b>Tableau 5.</b> Les données Métrologique de la Station Ain Diss (2015).....                                                                      | 27  |
| <b>Tableau 6.</b> Les principales classes d'alcaloïdes présents chez les Fabacées.....                                                             | 30  |
| <b>Tableau 7.</b> Répartition de certains alcaloïdes dans le groupe Genistoides .....                                                              | 39  |
| <b>Tableau 8.</b> Alcaloïdes signalés dans les 9 genres de la tribu des Crotalarieae.....                                                          | 40  |
| <b>Tableau 9.</b> Distribution des alcaloïdes dans l'espèce <i>Calobota saharae</i> ( <i>Spartidium</i> ).....                                     | 43  |
| <b>Tableau 10'.</b> Répartition de 4 flavonoïdes a sens large dans les graines de plusieurs espèces des tribus du clade genistoïdes .....          | 50  |
| <b>Tableau 10.</b> Distribution des flavonoïdes et isoflavones chez <i>Calobota saharae</i> .....                                                  | 52  |
| <b>Tableau 11.</b> Affinités des récepteurs ostrogéniques.....                                                                                     | 63  |
| <b>Tableau 12.</b> Comparaison entre Chromatographie Couche Mince et à Chromatographie Couche Mince Haute Performance (CCM / CCMHP).....           | 85  |
| <b>Tableau 13.</b> Stade phénologique de <i>C. saharae</i> .....                                                                                   | 96  |
| <b>Tableau 14.</b> Echantillons de <i>Calobota saharae</i> récoltés pendant différentes saisons .....                                              | 104 |
| <b>Tableau 15.</b> Teneurs en alcaloïdes totaux .....                                                                                              | 107 |
| <b>Tableau 16.</b> Dépôts des échantillons pour chaque type d'extractions (Type I, Type II) .....                                                  | 108 |
| <b>Tableau 17.</b> Dépôts d'échantillons réalisés selon l'extraction (Type II) .....                                                               | 111 |
| <b>Tableau 18.</b> Identifications des alcaloïdes par GC-MS dans les différents échantillons de <i>C. saharae</i> .....                            | 112 |
| <b>Tableau 19.</b> Composition et distribution des alcaloïdes de <i>C. saharae</i> dans différentes régions selon les auteurs.....                 | 116 |
| <b>Tableau 20.</b> Teneur de polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits de <i>C. saharae</i> ...                                       | 118 |
| <b>Tableau 21.</b> Dépôts des échantillons pour chaque type d'extractions (Type I, Type II) .....                                                  | 119 |
| <b>Tableau 22.</b> Masse des fractions issues de la CLHP préparative (extrait méthanolique racines de mars de <i>C. saharae</i> ) .....            | 121 |
| <b>Tableau 23.</b> Masse des fractions issues de la CLHP préparative (extrait méthanolique des fleurs de Mars de <i>C. saharae</i> .....           | 125 |
| <b>Tableau 24.</b> Rendement des extraits méthanoliques secs de <i>C. saharae</i> ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. Van.Wyk).....                    | 129 |
| <b>Tableau 25.</b> Structures probables des composés de <i>C. saharae</i> analysés par HPTLC-MS ....                                               | 138 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

**2HIS** : La 2-hydroxyisoflavanone synthase  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AP** : activated protein  
**APEH** : automne printemps été hiver  
**APG III**: Angiosperm Phylogeny Group  
**ARN** : acide ribonucléique  
**C D4** : cluster de différenciation 4 ou classe de différenciation 4  
**C8CG**: *8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine*  
**CCM** : chromatographie sur couche mince  
**CCMHP ou HPTLC** : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance  
**CD8** : cluster de différenciation 8  
**CHI** : chalcone Isomérase  
**CHS** : chalcone synthase  
**CMI** : concentration minimale inhibitrice  
**DIP** : alcaloïdes pipéridiniques  
**DL50** : La dose létale à 50%  
**DO**: densité optique  
**EDCF**: endothelium-derived contracting factor  
**EDHF**: endothelium-derived hyperpolarizing factor  
**EDTA**: ethylene diamine tetra acetic Acid  
**EGF**: epidermal growth factor  
**ERO** : espèces réactives de l'azote  
**Ery**: alcaloïde d'Erythrina (alcaloïdes isoquinoléiques)  
**FCR**: réactif de Folin Ciocalteu  
**FHT**: Flavanone-3-Hydroxylase  
**FLS**: Flavonol Synthase  
**FOXO**: Forkhead box o protein  
**FS** : Flavone Synthase  
**GSH-peroxydase** : glutathion peroxydase, catalase  
**HO**: le radical hydroxyle  
**HT29**: human colorectal adenocarcinoma cell line  
**Idz** : alcaloïdes indolizidiniques  
**IFS**: l'isoflavone synthase  
**ILC6** : la sixième conférence internationale des légumineuses  
**Imi** : alcaloïdes Imidazoliques  
**Ind** : alcaloïdes indoliques dérivés du tryptophane  
**IRLC**: Inverted-repeat-lacking clad  
**ITS**: spacer internal transcribed  
**LDL**: low density lipoproteins



**LNCaP:** androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma

**LPWG:** Legum.Phylogeny.Working.Group

**MH :** Mueller Hinton agar ou bouillon

**nAChRs :** récepteurs nicotiniques centraux à l'acétylcholine

**NaOH:** soude ADA: Angylocalyceae Dipterygeae Amburaneae

**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory

**NFAT:** nuclear factor of activated T cells and

**NF- $\kappa$ B:** nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**NIH-3T3:** mouse embryonic fibroblast cells

**PA:** alcaloïdes pyrrolizidiniques

**PC3:** human prostate cancer cell line

**PE :** phényléthanolamines

**PG/MS :** Chromatographie en phase gazeuse avec spectre de masse

**PGE2:** prostaglandine E2

**PNAA:** Les acides aminés non protéiques

**QA :** alcaloïdes quinolizidiniques

**rbcl :** Ribulose Biphosphate Carboxylase Large

**SiO<sub>2</sub> :** Silice

**SK-OV-3:** human ovarian cancer cell line

**SOD:** superoxyde-dismutase,

**TLC:** Thin-Layer Chromatography

**VIH :** virus immunodeficiency humaine

# SOMMAIRE

|                    |   |
|--------------------|---|
| INTRODUCTION ..... | 1 |
|--------------------|---|

## PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### CHAPITRE I : ASPECTS BOTANQUES ET ECOLOGIQUES D'UNE LEGUMINEUSE ENDEMIQUE SAHARIENNE

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>A - ASPECTS BOTANQUES .....</b>                                                                                                                                  | <b>5</b>  |
| <b>1. La famille des Fabaceae .....</b>                                                                                                                             | <b>5</b>  |
| 1.1. Classification botanique de la famille .....                                                                                                                   | 5         |
| 1.2. Caractères botaniques des Fabaceae.....                                                                                                                        | 6         |
| 1.2.1. Appareil végétatif.....                                                                                                                                      | 6         |
| 1.2.2. Appareil reproducteur .....                                                                                                                                  | 7         |
| 1.3. La phylogénie des Fabaceae .....                                                                                                                               | 7         |
| <b>2. La sous-famille des Papilionoideae .....</b>                                                                                                                  | <b>8</b>  |
| 2.1. Caractères botaniques.....                                                                                                                                     | 8         |
| 2.2. Phylogénie des papilionoideae .....                                                                                                                            | 9         |
| <b>3. Historique et classification de <i>Calobota saharae</i>.....</b>                                                                                              | <b>10</b> |
| 3.1. La 1 <sup>ère</sup> description de <i>Genista saharae</i> par Cosson et Durieu, en 1855).....                                                                  | 11        |
| 3.2. Description du <i>Spartidium saharae</i> par POMEL en 1874 .....                                                                                               | 12        |
| 3.3. Passage de <i>Spartidium saharae</i> (Pomel) des Genisteae aux Crotalarie .....                                                                                | 13        |
| 3.4. Passage de <i>Spartidium saharae</i> (Pomel) au genre <i>Lebeckia</i> puis <i>Calobota</i> au sein de la tribu des Crotalarieae (Boawtright et al. 2009) ..... | 13        |
| 3.5. Evolution des genres <i>Lebeckia</i> et <i>Calobota</i> au sein de la tribu des Crotalarieae.....                                                              | 14        |
| <b>4. Description anatomique de <i>Calobota saharae</i>.....</b>                                                                                                    | <b>17</b> |
| <b>4.1. Relations avec les autres espèces du genre <i>Calobota</i>.....</b>                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>4.2. Distribution et localisation.....</b>                                                                                                                       | <b>19</b> |
| <b>B : Ecologie de l'espèce au niveau de la station de Bou Saada.....</b>                                                                                           | <b>20</b> |
| 1. Localisation géographique et topographique .....                                                                                                                 | 20        |
| 2. Hydrographie et sol .....                                                                                                                                        | 22        |
| 3. Climat de la zone d'étude .....                                                                                                                                  | 22        |
| 3.1. Pluviosité (précipitations) .....                                                                                                                              | 22        |
| 3.1.1. Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles .....                                                                                                    | 22        |
| 3.1.2. Régime saisonnier de la station d'étude .....                                                                                                                | 23        |
| 3.2. La température.....                                                                                                                                            | 24        |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 4. Synthèse climatique.....                                      | 24 |
| 4.1. Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussen1953 .....   | 24 |
| 4.2. Quotient pluviométrique et climatique d'Emberger, 1955..... | 25 |
| 5. Autres facteurs climatiques .....                             | 27 |

## CHAPITRE II : ASPECTS PHYTOCHIMIQUES

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Généralités sur le métabolisme secondaire .....</b>                                                        | <b>28</b> |
| <b>2. Les métabolismes secondaires chez les légumineuses (alcaloïdes et polyphénols) .....</b>                   | <b>29</b> |
| <b>2.1. Les alcaloïdes de Fabacées.....</b>                                                                      | <b>29</b> |
| 2.1.1. Classification et biosynthèse des alcaloïdes .....                                                        | 29        |
| 2.1.1.1. Alcaloïdes issus de la Lysine : alcaloïdes pipéridiniques , quinolizidiniques et indolizidiniques ..... | 31        |
| 2.1.1.2. Alcaloïdes issus de l'ornithine : alcaloïdes pyrrolizidiniques .....                                    | 33        |
| 2.1.1.3. Alcaloïdes issus de Tryptophane .....                                                                   | 34        |
| 2.1.1.4. Alcaloïdes issus de phenylalanine et tyrosine .....                                                     | 34        |
| 2.1.1.5 Alcaloïdes issus d'Histidine .....                                                                       | 35        |
| 2.1.2. Distribution des alcaloïdes dans la Famille des Fabaceae.....                                             | 36        |
| 2.1.3. Distribution des alcaloïdes dans sous Famille des papilionoideae.....                                     | 37        |
| 2.1.4. Distribution des alcaloïdes dans le groupe Genistoides .....                                              | 38        |
| 2.1.5. Distribution des alcaloïdes dans quelques genres de la tribu des Crotalarieae .....                       | 39        |
| 2.1.6. Distribution des alcaloïdes dans l'espèce <i>Calobota saharae</i> (Boatwright& B-E Van wyk) .....         | 42        |
| <b>2.2. Les composés phénoliques des Fabaceae.....</b>                                                           | <b>44</b> |
| 2.2.1. Les flavonoïdes .....                                                                                     | 45        |
| 2.2.2. Les isoflavonoïdes.....                                                                                   | 46        |
| 2.2.2.1 Distribution des isoflavones chez les Fabaceae .....                                                     | 47        |
| 2.2.2.2 Distribution des flavonoides et isoflavones dans le Clade des Genistoides.....                           | 49        |
| 2.2.2.3 Distribution des flavonoides et isoflavones chez <i>Calobota saharae</i> ( <i>Genista saharae</i> ) .    | 51        |

## CHAPITRE III: PROPRIETES BIOLOGIQUES DES ALCALOIDES ET DES FLAVONOIDES

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Propriétés des alcaloïdes .....</b>                                       | <b>54</b> |
| 1.1. Alcaloïdes quinolizidiniques .....                                         | 54        |
| 1.1.1. Activité agoniste nicotinique.....                                       | 54        |
| 1.1.2. Toxicité des alcaloïdes quinolizidiniques .....                          | 56        |
| 1.2. Alcaloïdes pipéridiniques : ammodendrine et N-acétylhystrine .....         | 56        |
| 1.3. Alcaloïdes quinolizidiniques : nouvelles perspectives thérapeutiques ..... | 56        |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.1. Développement de ligands nicotiniques.....                       | 56        |
| 1.3.2. Action sur le virus Influenza A .....                            | 56        |
| <b>2. Propriétés des flavonoïdes .....</b>                              | <b>56</b> |
| 2.1. Propriétés antioxydante .....                                      | 57        |
| 2.2. Activité anti-inflammatoire .....                                  | 59        |
| 2.3. Activité anti-allergiques .....                                    | 59        |
| 2.4. Effet sur le système cardiovasculaire .....                        | 60        |
| 2.5. Activité chimiopréventive .....                                    | 60        |
| 2.6. Activité anti-ulcéreuse.....                                       | 61        |
| 2.7. Les flavonoïdes : inhibiteurs d'enzymes ?.....                     | 61        |
| <b>3. Propriétés spécifiques aux isoflavonoides .....</b>               | <b>62</b> |
| 3.1. Propriétés phytoestrogéniques.....                                 | 62        |
| 3.2. Autres propriétés de la genistéine et ses dérivés glycosylés ..... | 64        |
| 3.3. Propriétés antioxydantes de la génistéine et ses dérivés .....     | 65        |
| 3.4. Propriétés antitumorales de la génistéine et ses dérivés.....      | 66        |
| 3.5. Propriétés antivirales de la genisteine et ses dérivés .....       | 68        |
| <b>4. Toxicité des flavonoïdes .....</b>                                | <b>68</b> |
| 4.1.. Interactions hormonales .....                                     | 69        |
| 4.2. Maturation des organes sexuels.....                                | 69        |

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Méthodes d'étude botanique</b>                                                                                       |           |
| 1.1. Reconnaissance et récolte du matériel végétal .....                                                                   | 71        |
| 1.2. Méthodes d'études biométrique et analyse biologique .....                                                             | 71        |
| <b>2. Analyse physico-chimique .....</b>                                                                                   | <b>72</b> |
| 2.1. Analyse pédologique .....                                                                                             | 72        |
| 2.2. Dosage de l'azote total de la partie aérienne de la plante .....                                                      | 72        |
| <b>3. Méthodes Phytochimiques .....</b>                                                                                    | <b>73</b> |
| <b>3.1. Méthodes d'extraction .....</b>                                                                                    | <b>73</b> |
| 3.1.1 .Extraction au Soxhelt .....                                                                                         | 73        |
| 3.1.2. Extraction des alcaloïdes.....                                                                                      | 74        |
| 3.1.2.1. Extraction pour le dosage des alcaloïdes totaux.....                                                              | 74        |
| 3.1.2.2. Extraction des alcaloïdes pour analyse CCM.....                                                                   | 75        |
| <b>3.1.3. Extraction des flavonoides des fleurs et des racines de mars de <i>C saharae</i> pour analyse par HPLC .....</b> | <b>77</b> |
| 3.1.3.1. Préparation de l'extrait methanoliques.....                                                                       | 77        |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3.2. Fractionnement par CLHP préparative .....                                                                             | 77        |
| <b>3.2. Méthodes chromatographiques.....</b>                                                                                   | <b>79</b> |
| 3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC) .....                                                                     | 79        |
| 3.2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....                                                                  | 81        |
| 3.2.2.1. Chromatographie liquide haute performance analytique et préparative (CLHP).....                                       | 81        |
| 3.2.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG), CPG/MS .....                                                                  | 82        |
| <b>3.3. Méthodes de dosage.....</b>                                                                                            | <b>83</b> |
| 3.3.1. Dosage de l'azote total et des alcaloïdes totaux .....                                                                  | 83        |
| 3.3.2. Dosage des polyphénols totaux .....                                                                                     | 83        |
| 3.3.3. Dosage des flavonoïdes .....                                                                                            | 84        |
| <b>3.4. Evaluation de l'activité antioxydante .....</b>                                                                        | <b>85</b> |
| 3.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante par mesure de l'activité antiradicalaire sur le DPPH.....                         | 85        |
| 3.4.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance (CCMHP ou HPTLC). ..... | 85        |
| 3.4.3. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire par mesure de l'activité biologique (bioautographie) .....                  | 86        |
| 3.4.4. Evaluation de l'activité Anti radicalaire par spectrophotométrie UV .....                                               | 87        |
| <b>3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne.....</b>                                                                      | <b>88</b> |
| 3.5.1. L'aromatogramme .....                                                                                                   | 88        |
| 3.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) .....                                                                          | 88        |
| <b>3.6. Matériels d'analyse .....</b>                                                                                          | <b>88</b> |
| 3.6.1. Analyse de l'activité antioxydante par HPTLC-MS .....                                                                   | 89        |
| 3.6.2. Analyse structurale de l'activité antioxydante par Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....                           | 89        |

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS DES TRAVAUX PERSONNELS

### CHAPITRE I : ETUDES BIOLOGIQUES ET BIOMETRIQUES DE L'ESPECE

#### (*Calobota saharae*)

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Matériel végétal .....</b>                             | <b>93</b> |
| 1.1. Collecte.....                                           | 93        |
| 1.2 .Reconnaissance et description du matériel végétal ..... | 94        |
| 1.2.1. Phénologie .....                                      | 95        |
| 1.2.2. Morphologie .....                                     | 96        |

|                                           |     |
|-------------------------------------------|-----|
| 1.2.2.1. Rameaux.....                     | 97  |
| 1.2.2.2. Feuilles .....                   | 97  |
| 1.2.2.3. Fleurs .....                     | 99  |
| 1.2. 2.4. Le Fruit .....                  | 100 |
| 1.2.2.5. Racines .....                    | 102 |
| 1.3. Biométrie.....                       | 102 |
| 1.4. Pédologie du sol .....               | 103 |
| 1.5. Liste des échantillons analysés..... | 103 |

## CHAPITRE II : ANALYSES PHYTOCHIMIQUES

|                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. Alcaloïdes .....</b>                                                                                                    | <b>105</b> |
| 1.1. Dosage de l'azote total de la partie aérienne et souterraine de la plante.....                                           | 105        |
| 1.2. Dosage des Alcaloïdes totaux .....                                                                                       | 106        |
| 1.2.1. Extraction des alcaloïdes totaux .....                                                                                 | 106        |
| 1.2.2. Méthode utilisé dans l'extraction des alcaloïdes .....                                                                 | 106        |
| 1.2.3. Rendements en alcaloïdes totaux .....                                                                                  | 107        |
| 1.3. Analyses par CCM des alcaloïdes .....                                                                                    | 108        |
| 1.3.1. Extraction et analyse des alcaloïdes par Chromatographie sur Couche Mince.....                                         | 108        |
| 1.3.2. Identification de l'ammoudendrine par Chromatographie sur Couche Mince.....                                            | 110        |
| 1.3.3. Analyse et identifications des différents extraits alcaloïdiques par CPG-MS .....                                      | 112        |
| <b>2. Polyphénols .....</b>                                                                                                   | <b>117</b> |
| 2.1. Dosage des polyphénols totaux .....                                                                                      | 117        |
| 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....                                                                                      | 117        |
| 2.3. Analyse par Chromatographie Couche Mince .....                                                                           | 118        |
| 2.4. Extraction purification et analyse des flavonoïdes par chromatographie liquide haute performance préparative (CLHP)..... | 120        |
| 2.4.1. Fractionnement de l'extrait méthanolique de racines (mars) .....                                                       | 120        |
| 2.4.1.1. Préparation de l'extrait .....                                                                                       | 120        |
| 2.4.1.2. Fractionnement par CLHP préparative .....                                                                            | 121        |
| 2.4.1.3. Analyse des fractions HPLC des racines par CCM.....                                                                  | 121        |
| 2.4.1.4. Analyse structurale du composé F2 .....                                                                              | 123        |
| 2.4.2. Fractionnement de l'extrait méthanolique de fleurs.....                                                                | 124        |
| 2.4.2.1 Préparation de l'extrait méthanolique de fleurs pour fractionnement par HPLC.....                                     | 124        |
| 2.4.2.2 Fractionnement par HPLC préparative .....                                                                             | 124        |
| 2.4.2.3. Analyse des fractions HPLC des fleurs par CCM.....                                                                   | 125        |
| 2.5. Analyse par HPLC analytique des extraits méthanoliques de racines et de fleurs.....                                      | 126        |

## CHAPITRE III : ACTIVITES BIOLOGIQUES

### 1. Evaluation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Calobota*

#### *saharae*((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.Wyk)et analyse par CCM normale: Mise au

#### point..... 129

##### 1.1. Préparation des extraits ..... 129

##### 1.2. Préparations des dépôts ..... 130

##### 1.2.1. Extraits de *C. saharae* ..... 130

##### 1.2.2. Témoins ..... 130

##### 1.2.3. Solution de 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ..... 130

##### 1.3. Migration et révélation des Plaques CCM ..... 130

##### 1.4. Résultats obtenus avec le témoin quercétine ..... 130

##### 1.5. Résultats obtenus avec le témoin rutoside et la 5-O-methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (5OMeC8CG)..... 131

### 2. Evaluation de l'activité antradicalaire des différents extraits de *Calobota saharae* par bioautographie sur HPTLC..... 133

#### 2.1. Préparations des dépôts ..... 133

#### 2.2. Eluant ..... 134

#### 2.3. Mise en œuvre ..... 134

#### 2.4. Résultats obtenus avec la phase mobile apolaire ..... 134

#### 2.5. Résultats obtenus avec la phase mobile polaire ..... 135

#### 2.6. Déréplication des extraits par analyse HPTLC-MS ..... 135

##### 2.6.1. Données issue de la consultation du DNP ..... 136

##### 2.6.2. Déréplication ..... 138

##### 2.6.3. Evaluation de l'activité de l'extraits de racines de la 5-O- methoxy -8-C- $\beta$ -D gluco-pyroanosyl-genisteïne..... 139

### 3. Evaluation de l'activité antibactérienne..... 140

#### 3.1. L'aromatogramme ..... 140

#### 3.2. La concentration minimale inhibitrice ..... 140

#### 3.3. L'antibiogramme ..... 141

## CONCLUSION..... 142

## PERSPECTIVE..... 143

## REFERENCES ..... 145

## ANNEXES..... 155

## INTRODUCTION

Les plantes constituent un réservoir de composés biologiquement actifs ayant été utilisés par l'Homme depuis l'aube de l'Humanité. Le développement des connaissances médicales et chimiques ont permis à l'Homme d'en faire des médicaments, ou de servir de modèle à des médicaments de synthèse.

Près de la moitié des médicaments utilisés à travers le monde sont d'origine naturelle (naturelle ou inspirés de modèles naturels) (Newman et Cragg, 2007). Cependant, il semble que seulement 10 % des 250 000 espèces de plantes inventoriées aient fait l'objet de recherches phytochimiques.

L'intérêt grandissant pour les composés d'origine naturelle relance les travaux d'enquêtes ethnobotaniques afin de valoriser des plantes utilisées traditionnellement pour leurs vertus médicinales. L'Afrique du Nord représente une zone de biodiversité élevée au sein de laquelle certaines espèces sont endémiques. L'Algérie, de par sa situation géographique et climatique, possède une flore particulièrement riche et diversifiée depuis longtemps exploitée par la médecine traditionnelle de ses habitants. Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés) (Radford *et al.*, 2011). L'étude de ces plantes représente un intérêt élevé puisque nombreuses d'entre elles n'ont à ce jour pas fait l'objet d'études phytochimiques poussées.

Cette flore particulière se retrouve notamment dans des écosystèmes sensibles et notamment dans les zones semi-désertiques du Sahara septentrional. Dans cette zone existe une végétation diffuse et clairsemée : la flore saharienne, très remarquable par le développement de systèmes d'adaptation à un climat sec et à un sol présentant une forte salinité. Cette flore spontanée possède une importance médicinale et alimentaire, elle représente une source nutritive pour les animaux domestiques et notamment pour les troupeaux de chameaux (Ould el Hadj *et al.*, 2003). Par ailleurs, certaines de ces plantes sont utilisées dans la médecine indigène ou dans le petit artisanat (Ozenda, 1977). Compte- tenu de ces systèmes adaptatifs, l'étude du métabolisme de ces plantes représente également un intérêt dans le domaine de la biologie végétale.

Parmi elle, notre choix s'est porté sur un Fabacée endémique, *Calobota saharae* (Coss. &



Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk (syn. : *Genista saharae*) genêt saharien, *tellegit*, *murkh*, pour laquelle peu de travaux ont été réalisés. Les données rapportant un usage médicinal pour cette espèce sont très peu nombreuses. Les parties aériennes de *C. saharae* seraient traditionnellement utilisées pour traiter les maladies respiratoires et possèderaient des propriétés diurétiques (Bouchouka *et al.*, 2012). Ceci le rapproche d'autres espèces de *Genista* utilisée en médecine traditionnelle.

Certains chercheurs estiment que les taxons du genre *Genista* ainsi que la tribu sont en stade évolutif du fait de la présence des aneuploïdies et la diversité du nombre de base chromosomiques (Lograda, 2010). Le changement de la position taxonomique (*Genista saharae* en *Calobota saharae*), nous a permis de faire une révision sur l'historique de cette espèce. Cette révision avec l'étude phytochimique nous a permis de détecter les facteurs responsables de la séparation du genre et de la tribu sur la base des caractères morphologiques et chimiotaxonomiques.

Dans ce contexte, la présentation de notre étude sera répartie comme suit :

- La première partie comprend trois chapitres et constitue une synthèse bibliographique de l'ensemble de notre thématique :
  - Le premier chapitre s'articule sur l'aspect botanique et l'écologique de l'espèce saharienne avec un historique sur le changement de la classification du genre.
  - Le deuxième chapitre porte sur les métabolites secondaires (alcaloïdes et les flavonoïdes) produits au sein de la famille des Fabaceae à travers ses différentes tribus, et notamment la tribu des Crotalarieae. Ces données de chimiotaxonomie permettent de mieux comprendre la distinction entre *Genista* et *Calobota*.
  - Le troisième chapitre est consacré à une étude sur les propriétés biologiques des alcaloïdes et des composés phénoliques du genre.
- La seconde partie expérimentale décrit les démarches méthodologiques en abordant les analyses quantitatives et qualitatives des extraits de notre plante et l'évaluation de leurs activités biologiques.
- Enfin, dans la troisième partie, on a rapporté les résultats obtenus et les discussions sur trois axes :

- Le premier concernant les résultats portant sur les données de physiologie végétale : caractères morphologiques de la plante, et de son habitat (caractéristique du sol ; pédologique).
- Le deuxième axe porte sur la composition chimique de la plante en fonction des périodes et des parties de la plante : globale dans un premier temps (azote total, alcaloïdes totaux, polyphénols totaux...) et plus fine dans un second temps, avec identification des métabolites secondaires par des méthodes chromatographiques et dérégulatives (GC-MS, HPTLC-MS).
- Dans le dernier volet sont présentés les résultats sur la mise en œuvre et l'évaluation l'activité biologique (antioxydante et antibactérienne).

L'étude sera clôturée par une conclusion et les perspectives envisagées.

# **Partie I**

## **Bibliographie**

## PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### CHAPITRE I : ASPECTS BOTANQUES ET ECOLOGIQUES D'UNE LEGUMINEUSE ENDEMIQUE SAHARIENNE

#### A - ASPECTS BOTANQUES

##### 1. La famille des 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, après les Orchidaceae (23 000 espèces) et les asteraceae (22 000 espèces) (Yahara *et al.*, 2013) avec plus de 770 genres et 19 500 espèces (Azani *et al.*, 2017) réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Les légumineuses sont particulièrement diversifiées, cependant, en forêts à aspect sec et saisonnier et en zones tempérées des arbustives adapté aux climats arides. Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote *via* la symbiose légumineuses-*rhizobium* permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (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).

##### 1.1. Classification botanique de la famille

La classification botanique de cette famille peut être résumée de la façon suivante (Cronquist and Takhtadjan, 1981) :

REGNE : **Végétal**

EMBRANCHEMENT : **Phanérogames** (plantes se reproduisant par les fleurs et les graines)

SOUS-EMBRANCHEMENT : **Angiospermes** (fruit à graine enveloppée par le fruit)

CLASSE : **Dicotylédones** (deux cotylédons)

SOUS-CLASSE : **Dialypétales** (pétales non soudés)

SERIE : **Caliciflores** (étamines insérées sur le calice)

ORDRE : **Fabales**

FAMILLE : **Fabaceae** (fève)

La classification scientifique du genre *Calobota* selon APGIII 2009 est la suivante :

REGNE : **Végétal**

EMBRANCHEMENT : **Phanérogames** (Les plantes pourvues d'organes sexuels visibles)

SOUS-EMBRANCHEMENT : **Angiospermes** (Plante à graines dont l'ovule, fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos).

CLASSE : **Eudicots** (Cotylédons vraies)

SOUS-CLASSE : **Eurosides I** (Fabidées)

ORDRE : **Fabales**

FAMILLE : **Fabaceae**

SOUSFAMILLE : **Papilionoideae**

TRIBU: **Crotalarieae** (Benth) Huth: groupe Genistoids

GENRE: **Calobota** (Eckl & Zeyh)

ESPECE : **Calobota saharae** (COSS. et Dur.) Boatwr. and B-E. van

## 1.2. Caractères botaniques des Fabaceae

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique.

### 1.2.1. Appareil végétatif

Les **racines** sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à *rhizobium* qui se forment si le sol est pauvre en azote (Dupont et Guignard, 2007).

Les **feuilles** sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines, les stipules font place à des épines

(robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin).

### **1.2.2. Appareil reproducteur**

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une réduction du nombre d'étamines 10 et la fleur devient zygomorphe. La préfloraison est imbriquée, descendante ou vexillaire (Morel 2011).

Toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations. Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscence), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres. se dit d'une préfloraison dans laquelle, au sein d'un même verticille, une seule pièce est recouvrante, les autres étant emboîtées les unes dans les autres.

Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, exalbuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja) (Morel 2011).

### **1.3. La phylogénie des Fabacees**

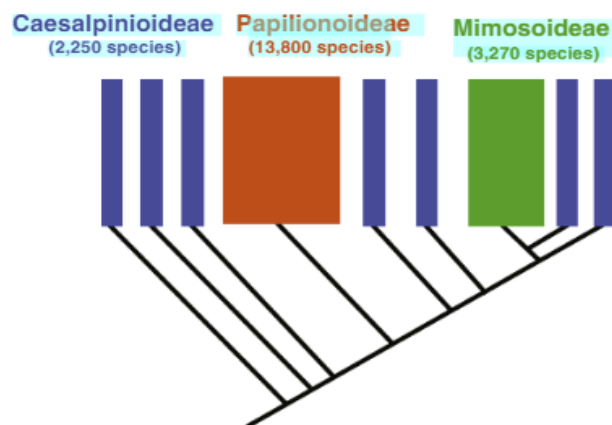
La famille est divisée en trois sous-familles (considérées parfois au cours de l'histoire taxinomique comme des familles à part entière).

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL*, confirmant l'origine monophylétique de cette famille (Wojciechowski *et al.*, 2004). Les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles selon l'APG III 2009 :

- La sous-famille de Bauhinoïdes, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- La sous-famille des Mimosoideae

- La sous-famille des Caesalpinoideae
- La sous-famille des Papilionoideae ou Faboïdeae

De nouveau système de classification pour les légumineuses (la sixième conférence internationale des légumineuses : ILC6) fondées sur plusieurs analyses moléculaires, ont montré que les Faboideae et les Mimosoideae étaient monophylétiques alors que les Caesalpinoideae seraient paraphylétiques. Faboideae (aussi connue sous le nom de Papilionoideae avec 13. 800 espèces), Mimosoideae avec 3. 270 espèces et Caesalpinoidea avec 2. 250 espèces (Borges *et al.*, 2013) voir (Figure.1).



**Figure 1.** Aperçu de la phylogénie des légumineuses (Borges *et al.*, 2013)

## 2. La sous-famille des Papilionoideae

La sous-famille des Papilionoideae est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes qui lui est rattaché : 14 000 espèces, 504 genres (Azani *et al.*, 2017) dispersés dans des biotopes très diversifiés : forêts tropicales humides, savanes, forêts saisonnièrement sèches et régions tempérées du monde. Certains de ses représentants sont bien connus pour leur importance économique notamment agro-alimentaire, car ils comprennent les cultures de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], les haricots culinaires (*Phaseolus* L. spp. et *Vicia faba* L.), l'arachide (*Arachis hypogaea* L.), les lentilles (*Lens culinaris* Medik.), les pois (*Pisum sativum* L.) et la luzerne fourragère (Cardoso *et al.*, 20013).

### 2.1. Caractères botaniques

Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses, et à ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées (Dupont *et al.*, 2007).

La fleur papilionacée est hautement spécialisée.

Cette organisation florale implique une forte symétrie bilatérale et la profondeur en trois dimensions qui limitent souvent l'accès au nectar du pollen, et elle est intimement liée à la pollinisation des abeilles.

La variation dans cette architecture florale a grandement influencé la taxonomie du Papilionoidae (Figure.2).

Les Genres présentant des fleurs ont une plus grande symétrie radiale à symétrie bilatérale, avec des pétales incomplètement différenciées et étamines libres, en revanche, ont été classés dans les tribus " basales" ou "primitives" comme les Sophoreae et les Swartzieae (Cardoso *et al.*, 2013) Voir (Annexe : variations architecturales des fleurs dans le clade Genistoides).



a. Papilionacée (Genêt à balais)



b. Fleur de (Genêt à Balais)

**Figure 2.** Fleur des papilionacées ( [https://fr.wikipedia.org/wiki/Genêt à balai](https://fr.wikipedia.org/wiki/Genêt_à_balai))

## 2.2. Phylogénie des papilionoideae

Du point de vue phylogénétique, la sous-famille des Papilionoidae a été remaniée. Les travaux de Wojciechowski et al., décrivant 7 clades ont été récemment revus par Cardoso et al. qui ne décrit plus que 3 (ou 4) clades, suite à l'analyse phylogénétique basée sur le gène matK, ce qui a résolu les relations et les ramifications profondes des Papilionoidae.

Dans la classification proposée par Cardoso et al, la sous-famille des Papillonoidae comprend trois grands clades qui sont (Cardoso *et al.*, 2013) :

- **Le CladeADA :**

Angylocalyceae (5genres et 21 espèces),

Dipterygeae (4genres et 25 espèces),



Amburaneae (7 genres et 29 espèces),  
Swartzieae (8 genres et 231 espèces),  
Clade Cladrastis (3 genres et 17 espèces),  
Exostyleae (6 genres et 21 espèces),  
Clade Vataireoide (4 genres et 27 espèces),  
Clade Andira (2 genres et 46 espèces).

- **Le Clade des Genistoides**

Genistoides (cœur) :

Sophoreae (14 genres et 122 espèces),  
Podalayrieae (9 genres et 130 espèces),

**Crotalarieae (16 genres et 1227 espèces), (Oskolski *et al.*, 2014 voir annexe)**

Genisteae (25 genres et 618 espèces),  
Genestoides non résolus comme Dermatophyllum

Autres Genistoides :

Ormosieae (6 genres et 139 espèces),  
Brongniartieae (13 genres et 153 espèces),  
Leptolobieae (5 genres et 29 espèces),  
Camoensieae (1 genre et 2 espèces),

- **Le Clade des Dalbergioides :**

Amorpheae (8 genres et 247 espèces)  
Dalbergieae avec 1367 espèces qui comprend 3 clades : Clade Adesmia (6 genres), Clade des Dalbergia (17 genres) et le Clade Pterocarpus (23 genres).  
Baphieae (7 genres et 57 espèces)  
Dalbergioides non résolus comme Aldina, Amphimas

Un quatrième clade est envisagé, il s'agit du clade NPAAA, renfermant des acides aminés non protéinogènes accumulés, cependant sa présence est encore soumise à discussion.

La classification de l'espèce étudiée a évolué et est passée de la tribu des Genisteae à la tribu des Crotalarieae. Nous proposons donc ici la présentation de l'historique de sa classification.

### **3. Historique et la classification de *Calobota saharae***

L'espèce *Calobota saharae* été classée au sein du genre *Spartidium* puis du genre *Genista* pour finalement être décrite comme un *Calobota*. Un historique est proposé ici.

### 3.1. La 1<sup>ère</sup> description de *Genista saharae*

C'est Cosson et Durieu qui décrivent pour la première fois cette espèce en 1855, dans le bulletin de la société Botanique de France (Cosson. et Durieu, 1855). L'espèce est rattachée alors au genre *Genista*. La description qu'ils en font est la suivante :

«'' Arbuste dressée est fortement ramifiée dès ses bases du feuillage, semblable au genre *Retama*, les rameaux et les brindilles légèrement arrondis ,pointus au sommets, peuvent être striés, piquants avec des entre-nœuds et des jeunes rameaux porteurs de fleurs, avec des feuilles successives sans bourgeons; feuilles individuelles sessiles avec une petite bosse d'une forme tuberculeuse; petites feuilles fugaces ,oblongues lancéolées, duveteuses; des fleurs au sommet des rameaux qui le plus souvent forment des inflorescences racemeuses partantes des rameaux floraux elles-mêmes, des inflorescences de 3 à 9 fleurs; les pédicelles du calice sont presque égaux au tube (calice). vers le pédoncule ,au dessus de la partie centrale avec deux bractées et avec des petits bractéoles ( préfeuilles ) linéaires fugaces ( qui tombent) et une calice persistante a certaines endroit duveteuse, en forme de cloche dans sa partie initiale, légèrement allongée, avec une ligne dessous des deux lèvres, la lèvre supérieure et égale à la lèvre inférieure, on retrouve deux lobes avec des parties triangulaires étendues ,plus petits par rapport au tube de la corolle un peu bifurquée et la lèvre inférieure possède trois lobes, avec des parties latérales formant un triangle ,au milieu plus étroit et lancéolé.

Les pétales sont caduques, jaunes, le plus large pétale poilu coté dorsale, triangulaire-ovale de forme, tombant couvre les deux pétales latérales ( ailes )qui sont a leurs pointes voulus ,presque égaux a l'étendard, un peu plus court d'elle (l'étendard) ,cette dernière glabre, perpendiculaire oblique, légèrement pendant vers le bas, cachant les génitales, le gynécée ( pistil) est allongé vers le pétiole, linéaire-lancéolée, glabre , contenant 6-8 ovules, le style est ascendant sous forme d'arc, le stigmate est terminal; le fruit ( immature) est oblongue, de ses deux cotes fins, avec un stipule, papyracée lisse ,beaucoup plus long que le calice.''' »

Dans des zones désertiques d'Algérie vers le fleuve Oued Retemprés de Zioua, pas très loin de Touggourt (Henon, 15 février 1853, fleurit et à peine fructifié) ; dans la région de Mزاب, entre Aleia et Guerrara (Reboud, fleurit, 29 décembre 1854). »

Les deux auteurs proposent de classer l'espèce *Genista saharae* dans le sous-genre *Spartocarpus* (Spach in Ann.sc.nat. Sér. 3, II, 240), section *Retamospartum* (Spachap. Coss. Pl. crit. 154). Il se distingue de toutes les autres espèces de la section et même du genre *Genista* par la forme du calice.

La classification est également décrite dans « Annales Botanices Systematicae » (1857) par Dr Carlo Muller Rebol.

- Plantae : Dicotyledoneae
- Sub classis: Calyciflorae (CDP rod. II.p2)
- Ordo L XXXII: LeguminosaeJuss
- Subordo I: Papilionaceae
- Tribus: Loteae DC
- Sous tribus : Genistea DC (End.gen.PI. P 1252)
- Genre : Genista
- Sous genre : Spartocarpus (spach)
- Section : Retamospartum.

### 3.2. Description du *Spartidium saharae* par POMEL (1874)

Pomel décrit cette espèce en 1874 et la rattache au genre *Spartidium* (Pomel, 1874), qu'il classe également dans la tribu des Lotées. Le genre est distingué du genre *Genista* d'après la différence morphologique du calice, puisque le calice de *Spartidium* est longuement obconique, puis campanulé, à 5- dents triangulaires subégales, celle inférieure étroite, un peu subulée tandis que *Genista* a un calice à deux lobes. Le stigmate est à peine oblique ; la gousse assez longuement stipitée, polysperme, comprimée.

Selon Pomel, *Spartidium saharae* cité dans le livre nouveaux matériaux pour la flore atlantique en 1874 dans la page 173, se basant sur la forme du légume du *Genista saharae* qu'il disait stipitée à l'état adulte, avait fondé pour lui le genre *Spartidium* qu'il rangeait dans les lotées, caractérisé par :

- \* Un calice persistant, turbiné infundibuliforme à tube obconique très distinct du limbe, 5 fide, indistinctement bilabié à dents subégales, les deux supérieures un peu plus séparées.
- \* Un étendard redressé, carène obovée non rostrée un peu ascendante.
- \* Des étamines monadelphes à filets non épaissis, anthères inégales,
- \* Un style subulé, arqué ascendant. Stigmates capités à peine oblique en avant.
- \* Une gousse longuement stipitée, très comprimée, oblongue, polysperme ; funicules non dilatés sur le hile.

#### Zone Géographique :

*Spartidium saharae* (Coss. Dur. Sub. *Genista*) : Oueds sahariens, Zeggueur, Zergoun, Metlili. Il est cité dans la flore de l'Algérie de Battandier et Trabut (Battandier et Trabut ,1888). Ces deux auteurs suppriment le genre *Spartidium* qu'il le considère comme une

section de *Genista* (section *Spartidium*, sous la dénomination de *Genista saharae*). (Battandier et Trabut, 1888).

### 3.3. Passage de *Spartidium saharae* (Pomel) des Genisteeae aux Crotalarieae

Le genre *Spartidium* a été rattaché à la tribu des Crotalarieae par Polhill en 1976, sur la base de la gaine androcée ouverte. Il a utilisé l'orientation des graines dans le fruit comme seul élément distinctif pouvant séparer ce genre de *Lebeckia*. Ce dernier finit par la rattacher au genre *Lebeckia*, puisqu'il considère qu'ils sont indiscernables (Polhill 1976, 1981).

Afin de bien comprendre la reclassification de la tribu des Genisteeae à celle des Crotalarieae, les caractères distinctifs entre les deux tribus sont présentés ci-dessous.

D'un point de vue morphologique la tribu des Genistae se distingue de la tribu des Crotalarieae par :

- L'absence d'un arille, ou la présence d'un arille, mais sur le côté court de la graine,
- Des filaments étamine fusionnés dans un tube fermé avec anthères nettement dimorphique ; pourraient être le synapomorphisme,
- Un calice bilabié

Les Crotalariae quant à elle, se distingue facilement des Genisteeae par l'absence de calices bilabiés

- Présence d'une lèvre supérieure bifide et d'une lèvre inférieure trifide (Boatwright et al. 2008b), (Cordoso et al., 2013). Les deux tribus sont monophylétiques.

### 3. 4. Passage de *Spartidium saharae* (Pomel) au genre *Lebeckia* puis *Calobota* au sein de la tribu des Crotalarieae (Boatwright et al., 2009)

C'est enfin au sein du genre *Lebeckia* puis *Calobota* que cette espèce a été rattachée. La tribu des Crotalariae est surtout endémique d'Afrique, et représente le plus grand sous-clade des Genistoides. Plus de 80% de la diversité des espèces de Crotalariae (1221 genres) provient de seulement deux genres, *Crotalaria* (700 genres) et *Aspalathus* (280 genres) (Cordoso et al., 2013).

Une étude systématique sur les relations génétiques au sein de la tribu des Crotalarieae a été entreprise par Boatwright et al., en 2008 en utilisant des séquences nucléotidiques de ITS (spacer internal transcribed) de ADN ribosomal, le gène *rbcL* plastidiale et les données morphologiques.

Trois grands groupes ont été identifiés au sein de la tribu (Boatwright et al., 2008) :

1- Groupe du Cap, regroupant les genres :

*Aspalathus*, *Wiborgia*, *Lebeckia* (incluant ***Spartidium saharae***), *Rafni*

2- Groupe Lotononis regroupant deux sous groupes :

- Sous-groupe Lotononis strito sensu (incluant *Personia*, *Robynsiophyton* et *Rothia*).
- Sous-groupe Lotononiss.l (Comprenant *Lotononis* section *Leptise* talliés et *Lotononis* section *Listia*).

3-Groupe Crotolaria regroupant les genres : *Crotolaria*, *Bolusia* et *Lotononis* section *Euchlore*.

Le genre *Calobota* a été initialement décrit dans page 191 (Plantarum Africae Australis Extratropicae) par Ecklon et Zeyher en 1836 et se composait de deux espèces, *C. cytisoides* et *C. pulchella*, qui sont en fait la même espèce (maintenant *C. cytisoides*) (Ecklon et Zeyher, 1836).

### 3.5. Evolution des gens *Lebeckia* et *Colobota* au sein de la tribu des crotalarieae

Le genre a été ensuite réduit par Georges Bentham en 1844 (The London Journal Of Botany) à une section d'un concept élargi de *Lebeckia* (Bentham G ,1844). Le rétablissement du genre *Calobota* est proposé par Boatwright en 2009. Ce dernier divise le genre *Lebeckia* en 3 genres sur la base des analyses moléculaires, morphologiques et anatomiques (Figure.3) :

\* ***Lebeckia*** proprement dit comprend les espèces qui étaient auparavant inclus dans la *Lebeckia* section *Lebeckia*.

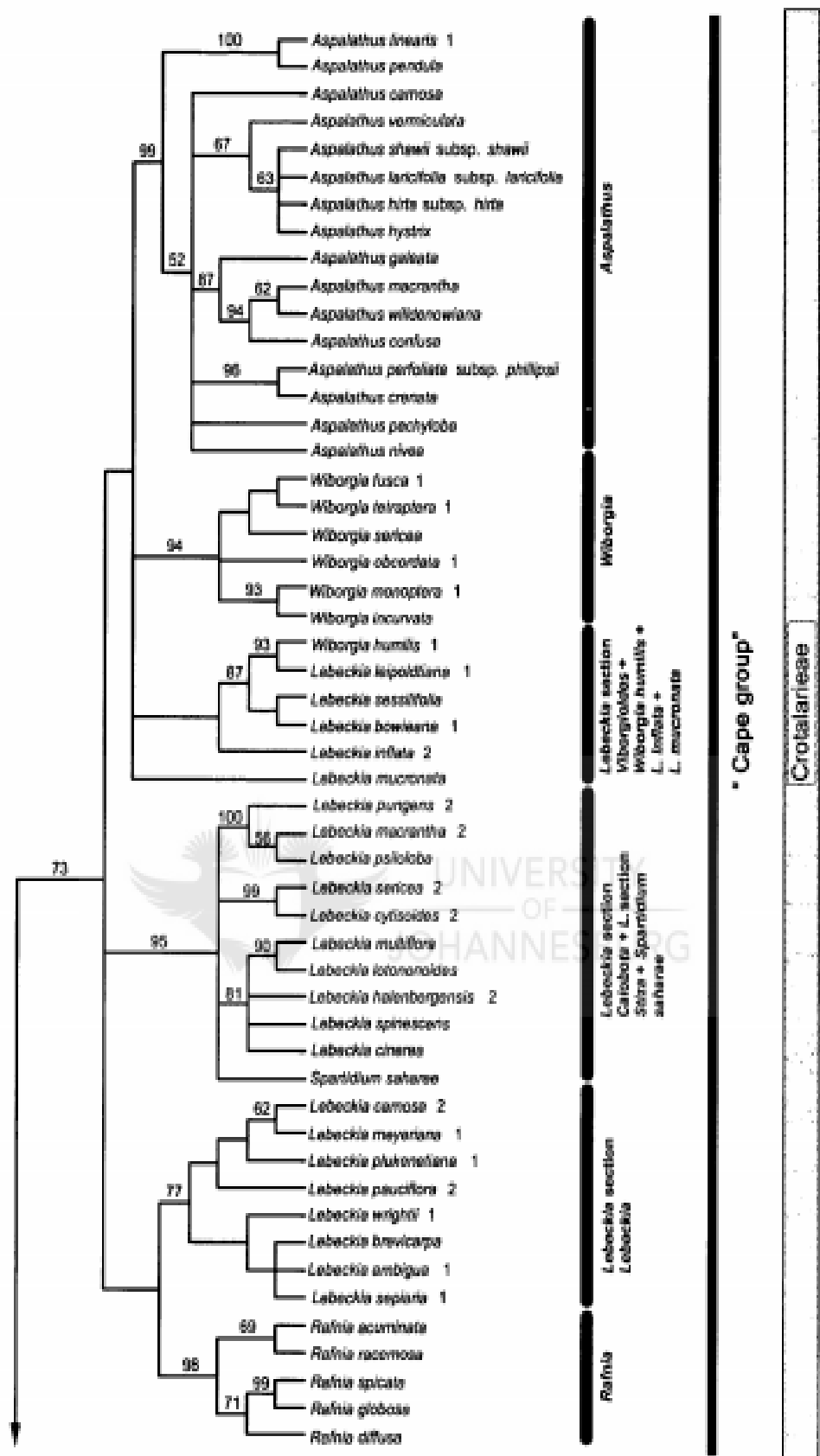
\* ***Calobota*** comprend les espèces qui étaient auparavant inclus dans *Lebeckia* section *Calobota*, dont ***Spartidium saharae***.

\* ***Wiborgia*** comprenant les espèces qui étaient auparavant inclus dans *Lebeckia* section *Viborgioides* Bent également *Wiborgia humilis*.

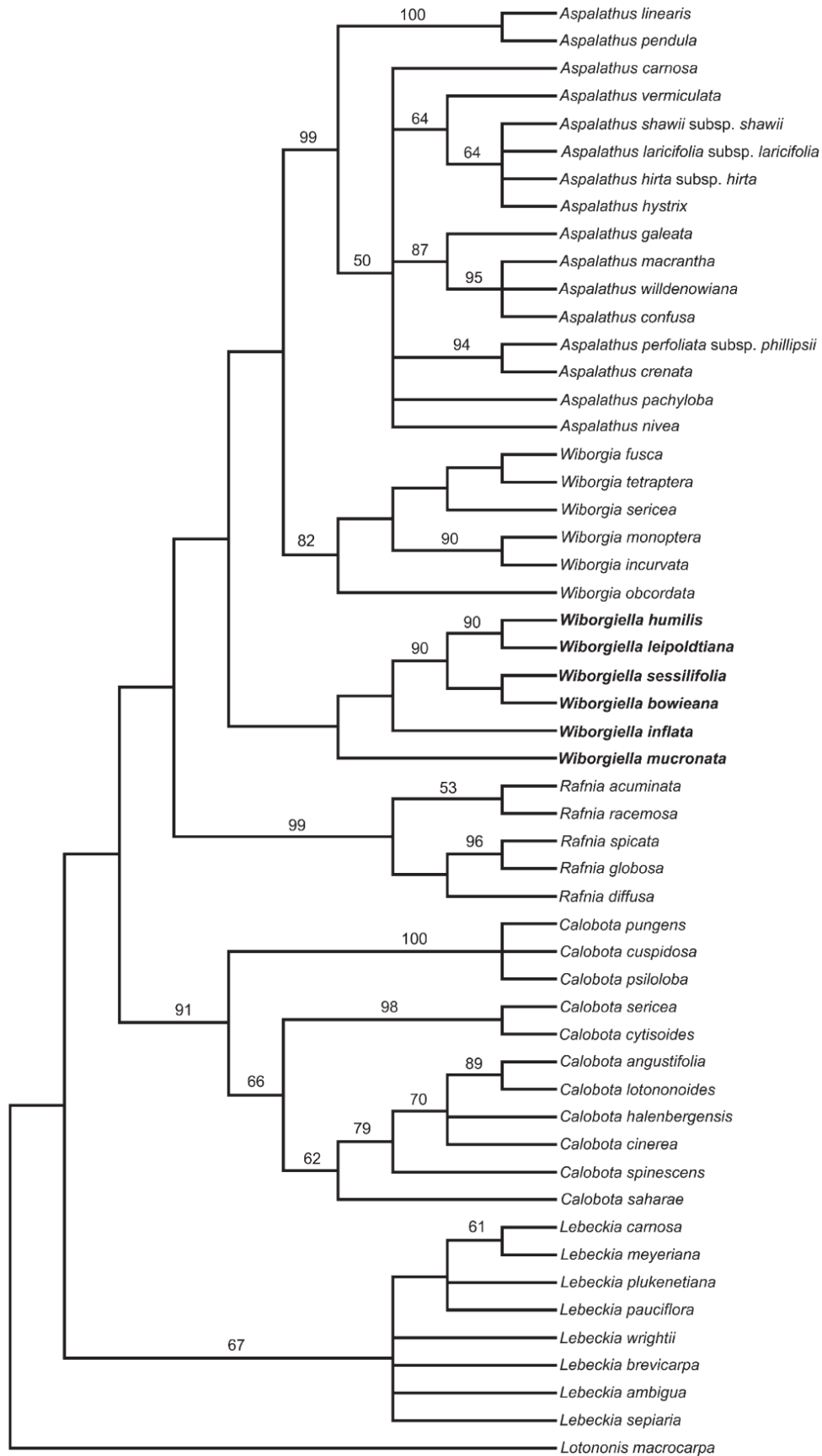
En effet, d'un point de vue anatomique, la plupart des espèces de *Calobota* ont leur graine orientée à angle droit par rapport au placenta, exactement comme dans *Spartidium saharae*. La seule distinction entre les autres espèces de *Calobota* et *Spartidium saharae* est l'origine géographique : elles sont toutes originaires d'Afrique du sud, alors que *Spartidium saharae* est endémique d'Afrique du Nord et a été identifié en Algérie, au Maroc et en Libye.

L'espèce est donc désormais présentée sous la dénomination *Calobota saharae* (Boatwright et al., 2010), voir (Figure 4).

**La dénomination retenue pour cette espèce est donc désormais *Calobota saharae* (Coss. & Durieu) Boatwr. & B.-E. van Wyk**



**Figure 3.** Phylogénie groupe Cap de la tribu des Crotalariae (Boatwright *et al.*, 2008).



**Figure 4.** Phylogénie groupe Cap de la tribu des Crotalarieae (Boatwright *et al.*, 2010).

#### **4. Description anatomique de *Calobota saharae* (Boatwright, 2009)**

Le genre *Calobota* comprend des espèces d'arbustes ou arbustes massifs épineux. Elles se distribuent dans le sud et le sud-ouest de l'Afrique du Sud et en Namibie, à l'exception de *Calobota saharae*, qui est endémique de l'Afrique du Nord, où il se produit sur les dunes de sable de la Libye à l'Algérie et au Maroc (Polhill, 1976) voir (Figure. 5).

##### **-Tiges**

L'espèce est un arbrisseau pouvant aller jusqu'à 2 m. Les tiges sont multiples, de couleur verte, les jeunes tiges sont densément pileuses puis glabres ; sans épines, Les tiges plus âgées sont pileuses ou glabres et portent une écorce brun clair.

##### **- Feuilles**

Les feuilles sont simples, à base cunéiforme et apex aigu. Elles sont sessiles, linéaires, alternes, pileuses sur les deux faces. Elles mesurent de 6 -10 mm de longueur et 1-2 mm de largeur.

##### **- Inflorescences**

La floraison se produit entre le mois Mars à Mai. L'inflorescence comporte 5 à 12 fleurs, et mesure 75 à 150 mm de long.

Les fleurs sont pédonculées (1-2 mm), et possèdent une bractée (1,5-2,0 mm de long), linéaire, pubescente ; et des bractéoles (0,5 - 1.0 mm de long), linéaire, pubescentes.

##### **- Calice (c) :**

Les fleurs mesurent 13 à 17 mm de long. Le calice est n'est pas bilabié mais forme un tube de 4.5-7.0 mm de long, pileux, avec des lobes de 1.5 à 3 mm (Figure 5– c).

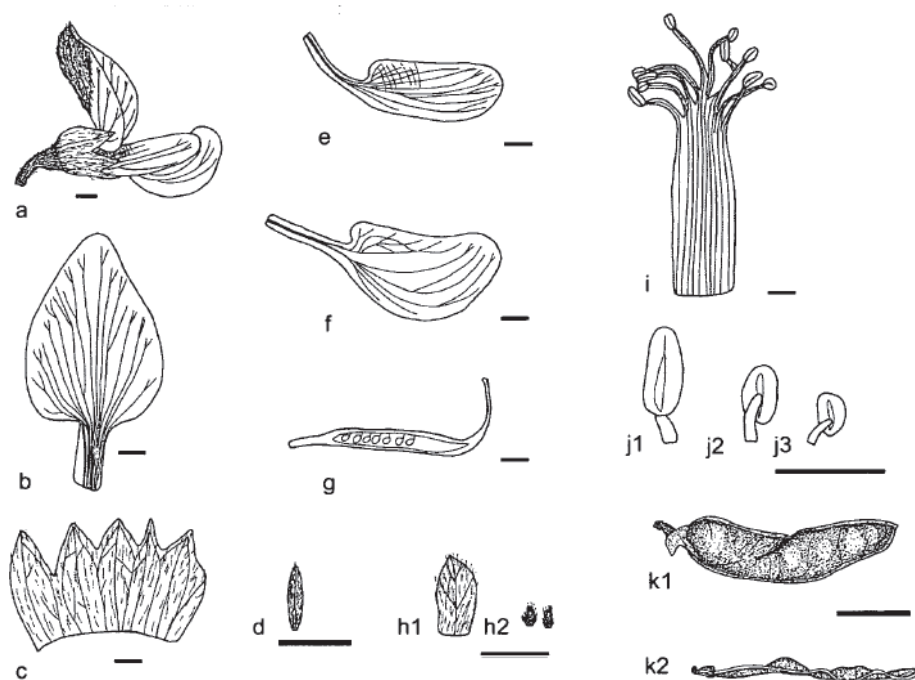
##### **- Pétales :**

La carène (f) est glabre et mesure 12.5-13.0 mm de long, la griffe mesure 4-5 mm et le limbe, en forme de bateau, mesure 8.0 à 8.5 mm de long et 4,5-5,0 mm de large (Figure5 g2).

L'étendard (b) mesure 13-15 mm de long, les griffes sont linéaires (3.5 - 4.0 mm de long), le limbe est ovale (9.5-11.0 mm de long et 7.5-8.0 mm de large), pubescent sur la surface dorsale à apex obtus.

Les ailes (e) mesurent 11.5-14.0 mm de long, la griffe 4.0 - 4.5 mm de long. Le limbe est oblong, mesure 7 à 9 mm de long, 3 - 4 mm de large, glabres, avec 4 rangées de sculpture.





**Figure 5.** Morphologie de *Calobota saharae* (Boatwright, 2009)

(a) fleur, vue latérale ; (b) étendard, (c) surface extérieure du calice (lobes supérieurs à gauche); (d) feuille en vue abaxiale; (e) Aile; (f) Carène; (g) Pistil; (h1) Bractées; (h2) Bractéoles; (i) Androcée; (j1) anthères basifixes longs; (j2) anthère carinal intermédiaire; (j3) anthère dorsifixe court; (k1) gousses, vue latérale; (k2) gousses, vue dorsale(Boatwright, 2009).

**- Androcée (i) :**

Les anthères sont soudées. L'anthère carinal (j2) de *Calobota saharae* est intermédiaire entre l'anthère dorsifixe (j1) et basifixes (j2) résultant d'un arrangement 4 + 1+ 5 (soit quatre anthères basifixes longues, une anthère carinal intermédiaire et cinq anthères dorsifixes courts) (Figure 5- g3, au centre).

**- Pistil (g):**

Le pistil est subsessile à peu stipité, glabre. L'ovaire est linéaire, 9.0-11.5 mm de long, 1,0-1,3 mm de large et 7 à 8 ovules ; le style est plus court que l'ovaire, de forme oblongue-linéaire, comprimé latéralement, mesurant 4. 5 - 5. 5 mm de longueur,

**- Gousses (k1, k2) et graines.**

Les espèces du groupe *Calobota* ont généralement des gousses cylindriques ou semi-cylindriques à parois épaisses, cependant, les fruits de *Calobota saharae* sont à paroi mince et membraneuse.

La gousse est comprimée latéralement, indéhiscente, mesure 30.0-40.0 mm et 6.0 à 10.0 mm de large. Elle comporte 4 à 6 graines.

Les graines sont réniformes à oblongues-réniformes. Elles mesurent 2.5 à 3.0 mm de long, et 1,5 à 2,0 mm de large. Les graines matures sont brun clair, à surface lisse.

#### **4.1. Relations avec les autres espèces du genre *Calobota* (Boatwright, 2009)**

*Calobota saharae* est similaire à *Calobota cuspidosa* et *Calobota psiloloba* quant à l'anatomie des gousses, membraneuses et comprimées latéralement, mais diffère par l'absence d'épines, en effet, chez *C. cuspidosa* et *C. psiloloba* les branches sont fortement épineuses, les feuilles légèrement obovales à elliptiques ou spatulées et les pétales sont pubescents voir (Annexe : Clé des Espèces de *Calobota*).

*Calobota saharae* est aussi semblable à *Calobota namibiensis*, mais diffère par des feuilles linéaires, glabres, la carène est glabre et les gousses membraneuses par contre dans *C. namibiensis*. Les feuilles sont elliptiques à ovales, la carène est densément pubescente et les gousses à parois épaisses et tortueuses.

#### **4.2. Distribution et localisation (Boatwright, 2009)**

*Calobota saharae* est endémique à l'Afrique du Nord et se produit au Maroc, l'Algérie, la Libye et la Tunisie. Il se trouve sur les collines désertiques ou dunes à une altitude de 200 m.

**Algérie** : AïnSefra, Province Constantine, Oued Sou Djebel Milogh. Province Oran, AïnSefifsifa, Province Oran, Abiod-Sisi-Cheihk, Cosson ; Wadi Rummel, au-dessus Sidi Benour, Guichard ; El Ardja, Pitard ; Oued el Khezoua Pitard.

**Tunisie** : Nefta, Cossons.n.

**Libye** : Aïn Zara, près de Tripoli, Brown s.n. (K) ; JebelNefoussa, Azizia-Rhnm, Davis ; Jebel, au nord de Jefren, Keit

## B : ECOLOGIE DE L'ESPECE AU NIVEAU DE LA STATION DE BOU SAADA

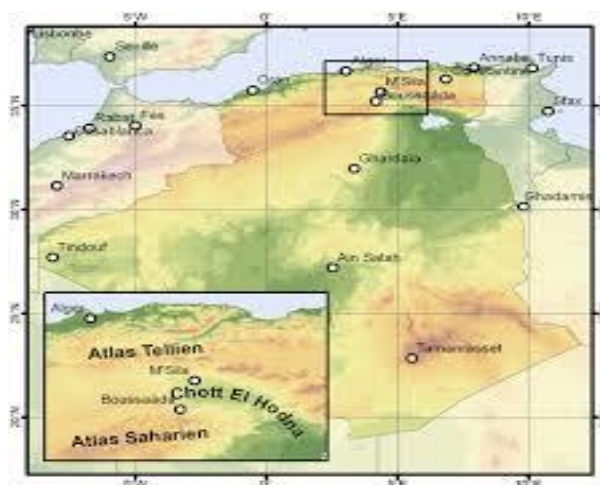
De par sa situation géographique, la région d'étude fait partie des Hautes plaines steppiques qui sont considérées comme des « terres de parcours ». Au sens de cette étude le terme de "terres de parcours" est pris dans son acception la plus large c'est à dire de vastes territoires colonisés par une végétation naturelle et où le cheptel ovin accessoirement caprin et camelin sont conduit librement. En plus de leur rôle socio-économique, les parcours remplissent un rôle important dans le maintien de l'équilibre écologique : ils représentent l'habitat de diverses espèces animales très rares à l'échelle du globe (comme par exemple la Gazelle de Cuvier), protègent le sol contre l'érosion hydrique et éolienne et constituent ainsi un réservoir de la biodiversité.

Les caractères généraux du territoire et particulièrement le contexte physique de la zone étudiée sont traités d'après les travaux écologiques déjà réalisés dans cette région (Kaabeche, 1990, 1995a et 1998).

Certaines Légumineuses ont un port arbustif et sont utilisés dans des programmes de recherche pour lutter contre l'érosion : parmi ces espèces, le genêt saharien, en tant qu'arbuste colonisant les substrats sableux joue un rôle important dans la fixation des dunes de sable en Algérie, dans les régions arides et sahariennes.

### 1. Localisation géographique et topographique de la zone d'étude

Premier oasis rencontrée lorsque l'on se dirige depuis Alger vers le sud Algerien, Bou Saada est située à 245km de celle-ci, au sud du Chott El Hodna à 35° 13' de latitude nord et 1° 05' de longitude est (Figure.6), entre la limite sud du Hodna et les confins des Ouled Nail, à l'intersection de la RN45 et la RN08 (Salmon et *al.*, 2009) voir annexe .



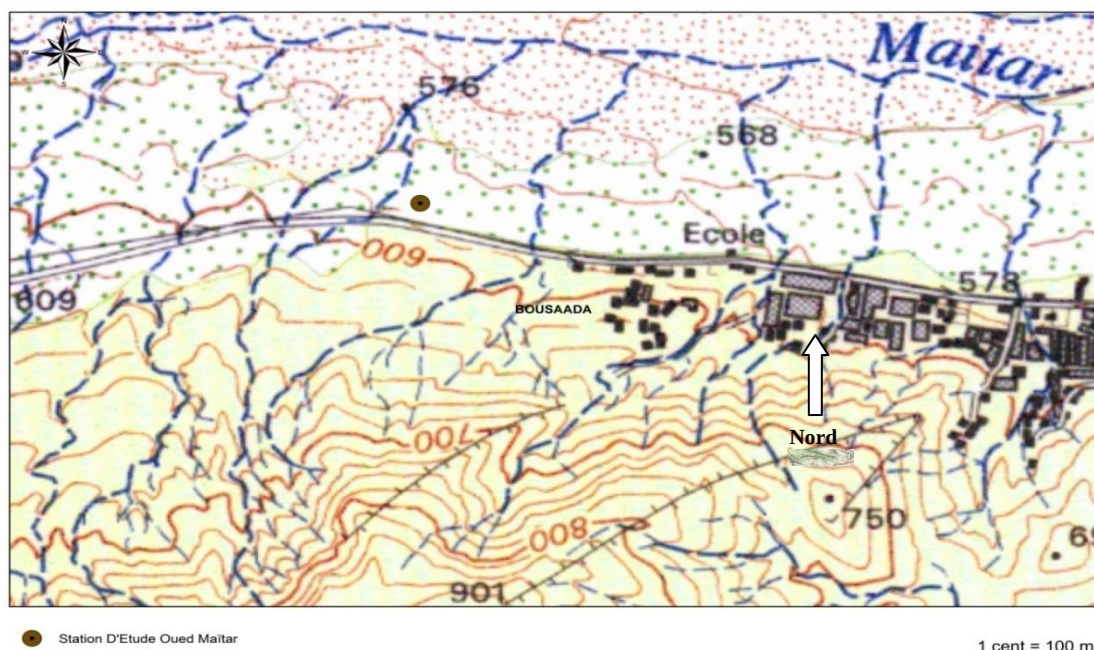
**Figure 6.** Carte : Localisation de la ville de Bou Saada, a la bordure Chott El Hodna, a la bordure Nord de l'Atlas saharien (Salmon et *al.*, 2009)

De par sa position géographique, la région ainsi délimitée se trouve au contact de trois ensembles structuraux : les Hautes Plaines steppiques algéro-oranaises au nord et à l'est, la Plate-forme saharienne au sud, enfin l'Atlas saharien à l'ouest.

Au sein de la région d'étude, plusieurs unités structurales se succédant du Nord au Sud et d'Est en Ouest :

- La dépression du Chott el Hodna (altitude 400 m), communiquant au Nord avec l'Atlas tellien (Monts du Hodna).
- Une série de massifs montagneux, sans liaison nette entre-eux et d'orientation Nord-est/Sud-ouest : Boudenzir (1416 m), Tsegna (1609 m), Fernane (1675 m). Entre ces massifs s'étendent des plaines d'altitude moyenne comprise entre 800 et 1000 m.
- Le cordon dunaire, s'étendant entre Bou-Saâda et Djelfa sur une longueur de 215 Km, atteint la région de Naâma à l'Ouest. Faisant partie des dunes continentales ce cordon allongé dans le sens Sud-ouest et Nord-est, est formé par des accumulations plus ou moins importantes de sables ayant tendance à devenir plus denses en formant des concentrations dunaires selon une largeur qui peut parfois dépasser 7 km.

Notre station d'étude se situe dans le cordon dunaire qui traverse la wilaya de M'Sila dans la commune de Bou Saada. Se localise à 10 m au nord de la piste Bou Saada – Ain Sbaâ. On trouve au Nord Oued Maïtar ; au sud Djebel Moubakhara ; à l'est Cité Maïtar et à l'Ouest Oued Maïtar (Figure.7) voir annexe.



**Figure 7.** Localisation de la région d'étude

Extrait carte topographique da NaaS de Bou stOue 7-XXIII-31-NI

## Coordonnée Géographique WGS 1984 UTM Zone 31 Nord

| Station d'Etude               | X       | Y         | Altitude |
|-------------------------------|---------|-----------|----------|
| Station Oued Maïtar Bou Saada | 603 516 | 3 898 369 | 600 m    |

## 2. Hydrographie et Sol

Les divers oueds (cours d'eau temporaires à écoulement principal sous forme de crue) se déversent dans la dépression du Chott el Hodna. On distingue 2 grands réseaux convergeant vers cette dépression : au Nord, l'oued Ksob draine les eaux des versants des Monts du Hodna, au Sud l'Oued Bou- Saada, et l'Oued Chaïr drainent ceux des versants de l'Atlas saharien.

Dans la zone considérée, deux grands ensembles de facteurs édaphiques ont une influence déterminante sur la végétation :

- \* Les facteurs relatifs au bilan hydrique liés au type de substrat (en particulier le taux de matière organique, le point de flétrissement et la capacité de rétention en eau du sol) ainsi que la valeur des apports complémentaires représentés par les eaux de ruissellement.
- \* Les facteurs d'ordre textural, principalement le rôle des horizons d'accumulation des sables : diverses zones de la zone d'étude sont recouvertes d'un manteau sableux de profondeur et de consistance variables. De ce fait, le sable peut constituer à lui seul un sol plus ou moins typique ou recouvrir plusieurs types de sol : ainsi l'importance du facteur « sable » se manifeste par la sélection de plantes indicatrices de la texture dites « plantes psammophiles ».

## 3. Climat de la zone d'étude

Le climat est de type méditerranéen atténué par une forte influence saharienne. Pour caractériser le climat de la zone d'étude, nous avons retenu les facteurs climatiques les plus importants comme les températures, et les précipitations.

L'étude du climat est importante dans notre étude, car il régit la distribution et le maintien de la végétation.

### 3.1. Pluviosité (précipitations) :

Les résultats effectués sur la zone d'étude Oued Maïtar à Bou-Saâda sont représentés dans le tableau 1.

### 3.1.1. Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles

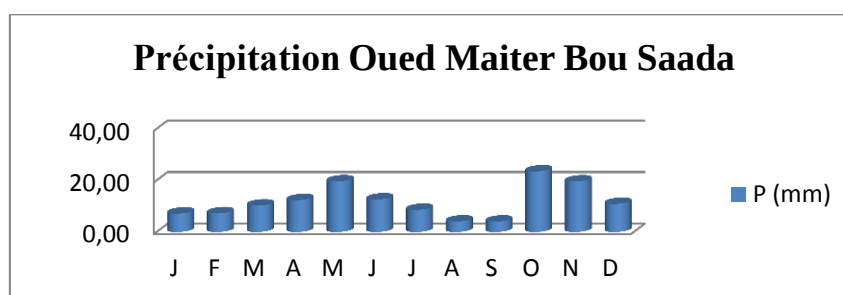
A partir du tableau.1, on remarque que la station Oued Maiter de Bou-Saâda enregistre un maximum de pluie au mois d'octobre avec 23.52 mm /an, et le mois le moins pluvieux est le mois septembre avec 4.05 mm /an suivie par le mois d'Aout.

**Tableau 1.** Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles de station d'étude (1996-2015)

| Mois   | Jan  | Fév  | Mar   | Avr   | Mai   | Jui   | Juil | Aou  | Sep         | Oct          | Nov   | Déc   | Total  |
|--------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------------|--------------|-------|-------|--------|
| P (mm) | 7,15 | 7,25 | 10,26 | 12,38 | 19,63 | 12,62 | 8,60 | 4,08 | <u>4,05</u> | <u>23,52</u> | 19,61 | 10,89 | 140,04 |

**Source :** Station météorologique de Bou-Saâda (Ain Diss) 2015

La figure. 8 représente la moyenne des précipitations mensuelles et annuelles dans la station d'étude. Elles sont déterminantes pour la distribution des sols et pour le développement de la végétation. Les précipitations de la station d'Oued Maiter (Bou Saada) sont irrégulières.



**Figure 8.** Précipitations mensuelles de la station d'Oued Maiter Bou-Saada (2015)

### 3.1.2. Régime saisonnier de la station d'étude

L'examen du tableau 2 présente la répartition saisonnière des pluies qui montre que le maximum des précipitations est atteint en automne suivi par le printemps pour la station d'étude, donc le régime saisonnier et de type « A P EH » pour notre station d'étude.

**Tableau 2.** Régime saisonnier de station d'étude. (1996 – 2015).

| Station<br>Saison       | Automne | Hiver | Printemps | Eté   | Régime Saisonnier |
|-------------------------|---------|-------|-----------|-------|-------------------|
| Bousaada<br>Oued Maiter | 15.726  | 8.430 | 14.090    | 8.433 | APEH              |

**Source :** Station météorologique de Bou Saada (Ain Diss) 2015

Il ressort de cette analyse que la période d'occurrence des pluies est assez favorable, puisque l'on distingue les pluies d'automne favorisant la germination et les pluies de printemps accélérant le développement de la végétation.

### 3.2. La température

La température représente un facteur climatique plus important. En effet, chaque espèce ne peut vivre que dans un certain intervalle de températures. D'après Ramade en 1984, la température représente un facteur limitant de première importance, car elle conditionne la répartition de la totalité des espèces et des communautés d'être vivants dans la biosphère (Ramade, 1984)

L'examen des données relatives (Tableau 3) à la température permet de faire les remarques suivantes : le mois le plus chaud pour la station d'étude est le mois de Juillet avec de température de 39,76°C. et le mois le plus froid est Janvier, avec de température de 4,29°C.

**Tableau 3.** Températures moyennes mensuelles, minimales et maximales enregistrées en degrés Celsius dans la station d'étude (1996-2015).

| Mois       | Jan         | Fév   | Mar   | Avr   | Mai   | Jui   | Juil         | Aou   | Sep   | Oct   | Nov   | Déc   | Moy   |
|------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t (°c)     | <u>4,29</u> | 5,12  | 8,21  | 11,42 | 16,36 | 20,99 | 24,76        | 24,05 | 19,53 | 14,56 | 8,81  | 5,14  | 13,60 |
| T (°c)     | 14,65       | 16,79 | 20,89 | 24,21 | 29,94 | 35,78 | <u>39,76</u> | 38,85 | 32,18 | 26,64 | 19,62 | 15,35 | 26,22 |
| T moy (°c) | 9,47        | 10,95 | 14,55 | 17,81 | 23,15 | 28,38 | 32,26        | 31,45 | 25,85 | 20,60 | 14,22 | 10,24 | 19,91 |

**Source :** Station météorologique de Bou Saada (Ain Diss) 2015.

**T (°C) :** température moyennes mensuelle avec  $T = (M+m) / 2$ .

**M (°C) :** température moyennes des maximas du mois le plus chaud.

**m (°C) :** température moyennes des minima du mois le plus froid.

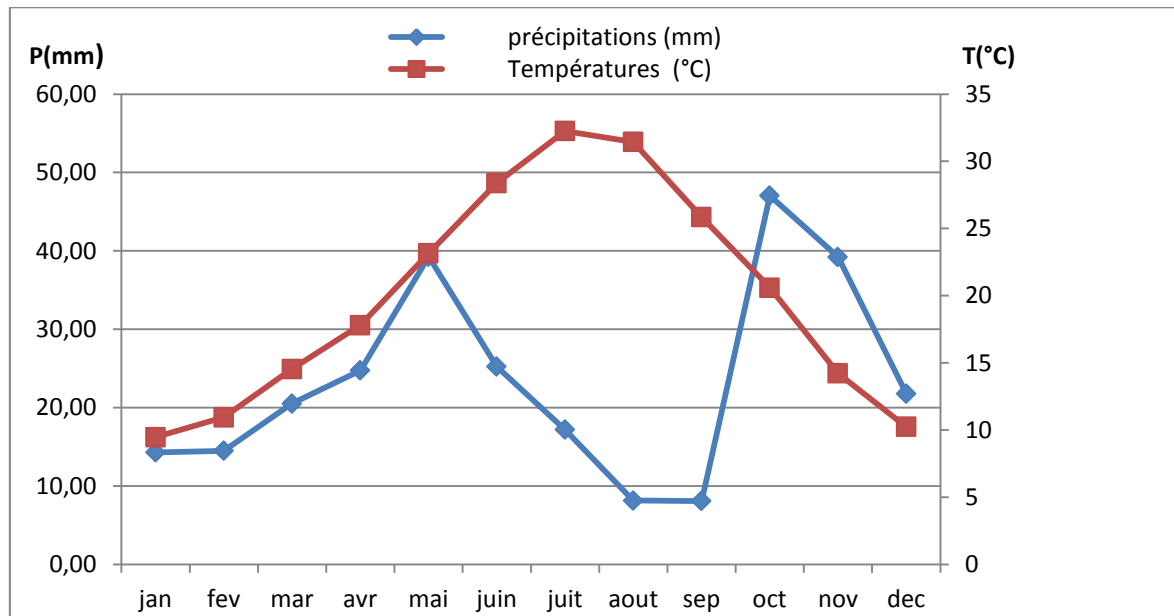
## 4. Synthèse climatique

### 4.1. Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussen 1953 :

Selon Bagnouls et Gaussen (1953), sera considéré comme sec un mois où le total des précipitations (P) exprimé en millimètre (mm), est égal ou inférieur au double de la température moyenne (T) du mois exprimé en degré centigrade (° C) ;  $P \leq 2T$ .

L'utilisation des données de précipitations et des températures, nous a permis de tracer le

diagramme Ombrothermique (Figure.9) de station d'étude, et de dégager la période sèche.



**Figure 9.** Diagramme Ombrothermique de la station d'étude (**Oued Maïter Bou Saada**)

**Source :** Station météorologique de Bou Saada (Ain Diss 2015)

**L'échelle :** P=2T ; T- 1cm= 05°C ; P- 1cm=10 mm

Le diagramme Ombrothermique montre qu'il y a une alternance de deux périodes l'une humide et l'autre sèche pour la station d'étude.

#### **Oued Maïter Bou-Saâda :**

- La période humide s'étend sur trois (03) mois allant du mois d'octobre jusqu'à décembre
- La période sèche s'étale au début du mois mai jusqu'au mois d'octobre.

Il y a lieu de remarquer que les plus fortes chaleurs coïncident avec les précipitations les plus faibles (mois de juin et août-septembre).

#### **4.2. Quotient pluviométrique et climatique d'Emberger (1955)**

Le quotient pluviométrique ; c'est le quotient qui synthétise le mieux les conditions bioclimatiques d'une zone, et qui intègre les paramètres thermiques (M, m en °C) et le paramètre hydriques P (mm) par l'application de la formule d'Emberger :

$$Q3 = \frac{3,43 \times P}{M - m}$$

P : Précipitation moyenne en mm ;



M : Maxima des températures moyennes mensuelles en °C ;

m : Minima des températures moyennes mensuelles en °C.

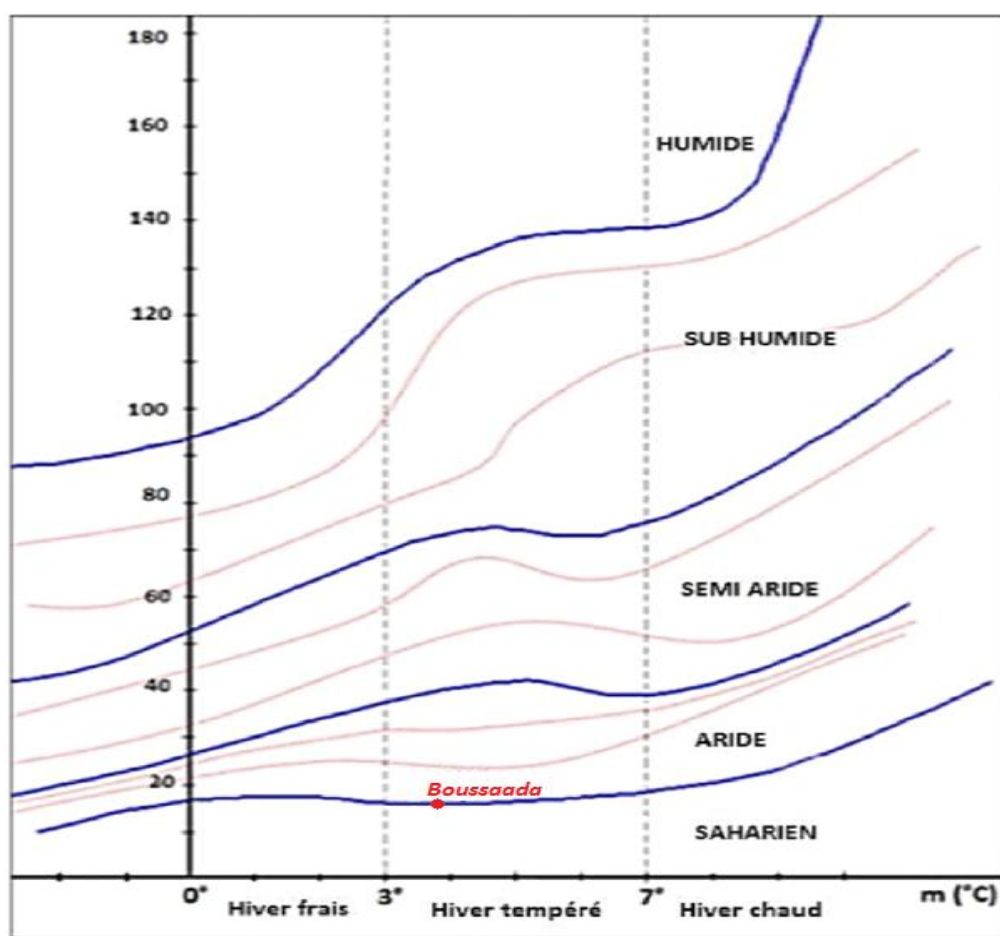
Par son application, on obtient le résultat suivant :

Le tableau suivant résume les résultats des calculs de Q3 de la station et les paramètres permettant de déterminer l'étage bioclimatique (Tableau 4).

**Tableau 4.** Valeurs du quotient pluviothermique d'Oued Maiter Bou Saada

| Station                 | P (mm) | T (°c) | t (°c) | Q 3  | Etage bioclimatique   |
|-------------------------|--------|--------|--------|------|-----------------------|
| Bou Saada (Oued Maiter) | 140,01 | 39,76  | 4,29   | 15,6 | Aride à hiver tempéré |

Le climagramme ci-dessous a permis de déterminer l'étage bioclimatique et les variantes thermiques de la station étudiée. Le climagramme d'Emberger précise que l'étage bioclimatique de la station de Bou Saada présente un bioclimat Aride à hiver tempéré (**Figure.10** : Données de la Station météorologique de Bou Saada (Ain Diss) 2015).



**Figure 10.** Climagramme d'Emberger

## 5. Autres facteurs climatiques : voir tableaux de la Station Meterologique Ain Diss

Les vents les plus fréquents soufflent dans la région d'étude du secteur Nord-ouest. La force du vent varie peu au cours de l'année. Les vents du Nord-ouest sont humidifiants car ils apportent pluies, nuages, humidité, tandis que ceux du Sud, essentiellement le Sirocco, sont chauds et desséchants.

Le Sirocco rassemble en réalité deux sortes de vents : le Chergui qui souffle du désert de Libye et du Sud Tunisien et le Guebli qui souffle du Sahara algérien. Le plus fréquent dans l'Est algérien est le premier, car il ne rencontre aucun obstacle. Dans la station prise en compte, le nombre moyen de jours de sirocco par an est de 21.

La région de Bou Saada appartient à l'étage Aride à hiver tempéré, ce qui leur confère une végétation avec des caractères biologiques et botaniques adaptés aux conditions du milieu (Djebaili, 1978).

**Tableaux 5.** Les données Meterologique de la Station Ain Diss (2015)

### Neige

|            | Situation au 1er janvier | Situation au 1er février | Ensemble de l'hiver |
|------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| Max        | 15 cm                    | 10 cm                    | 10 cm               |
| Min        | 0,1 cm                   | 0,1 cm                   | 0,1 cm              |
| Nbres de J | 1                        | 2                        | 3                   |

|                |                 |
|----------------|-----------------|
| <b>Grêle :</b> | 2-3 jours / ans |
|----------------|-----------------|

### Nébulosité

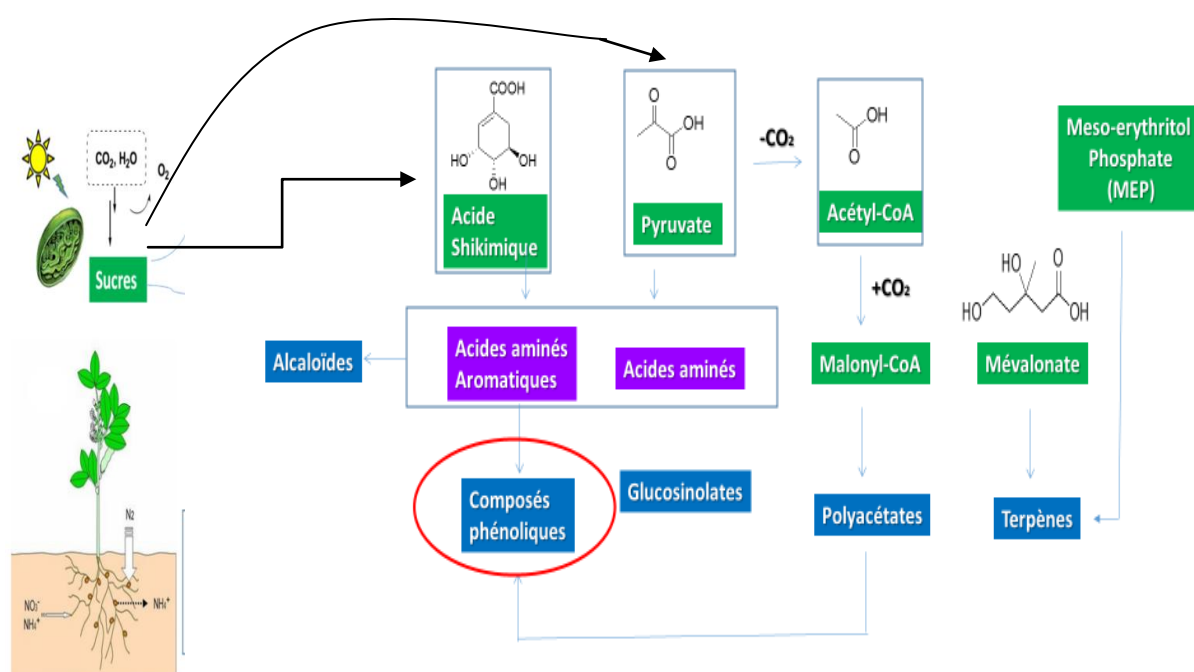
|            | J    | F   | M    | A    | M    | J    | J    | A    | S    | O    | N    | D   | Moy         |
|------------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------------|
| <b>Moy</b> | 3,62 | 3,7 | 3,88 | 3,38 | 3,14 | 2,16 | 2,34 | 2,12 | 3,56 | 2,94 | 3,82 | 3,2 | <b>3,15</b> |

**Source :** Station météorologique de Bou Saada Ain Diss (2015)

## CHAPITRE II : ASPECTS PHYTOCHIMIQUES

### 1. Généralités sur le métabolisme secondaire

Chez les végétaux, le métabolisme secondaire aboutit à la formation de plusieurs classes de composés phytochimiques. Le schéma suivant représente les principales classes de métabolites secondaires retrouvés chez les végétaux. La photosynthèse permet d'aboutir à des précurseurs des différentes voies : l'acide shikimique, précurseurs de certains acides aminés aromatiques (phénylalanine, puis tyrosine), le pyruvate, précurseurs d'autres acides aminés (



**Figure 11.** Schéma les principales classes de métabolites secondaires chez les végétaux (Boutefnouchet 2015-2016)

La biogénèse des acides-aminés est liée à l'incorporation d'azote par la plante.

Les légumineuses sont des organismes fixateurs d'azote, via des symbioses avec des microorganismes (*Rhizobium* sp.), aboutissant à la formation de nodosités. Les métabolites azotés sont donc nombreux au sein de cette famille et peuvent s'accumuler dans les graines où ils servent une double fonction (de défense et toxique) et ils sont utilisés comme stockage remobilisés lors de la germination et le développement de la plante. Les acides aminés sont notamment les précurseurs de nombreuses familles d'alcaloïdes.

## **2 –Les métabolismes secondaires chez les légumineuses**

L'acétyl-coA, précurseur de la voie des acétates, conduit notamment aux polyacétates et à des composés phénoliques. Ces derniers pouvant également être issus de la voie du shikimate, aboutissant aux précurseurs de type phényl-propane. Il existe également des classes de composés phénoliques mixtes, issus à la fois de la voie des acétates et de la voie du shikimate : les flavonoïdes et apparentés.

La chimiotaxonomie est l'étude de la répartition des métabolites en fonction de la classification botanique. La distribution des métabolites secondaires dans les plantes nous fournit des informations précieuses sur des relations phylogénétiques chez les Fabaceae et plus particulièrement les Papilionoideae. Certaines classes de composés se sont révélés être des marqueurs utiles par rapport à d'autres, telles que les alcaloïdes et flavonoïdes dans les légumineuses (Bowtwright, 2009).

La chimiotaxonomie des Fabaceae a été largement étudiée par Harborne dans les années 70 (Harborne, 1969). Plus récemment, Wink a poursuivi l'étude de l'évolution des métabolites secondaires et de la chimiotaxonomie des Fabaceae en prenant en compte les aspects moléculaires des apports récents de la phylogénétique (Wink, 2003), (Wink, 2013).

Des études plus spécifiques des tribus ont été également rapportées. Faugeras décrit une chimiotaxonomie des Papilionaceae – Genisteae en 1965 (Faugeras, G et Paris.R. 1965). Van Wyk s'est intéressé plus précisément au clade genistoïde, en étudiant notamment la sous-famille des Papilionoideae et plus spécifiquement la tribu des Crotalarieae (Van Wyk, 2003) ; (Van Wyk, 2005).

### **2 .1. Les alcaloïdes de Fabacées**

On estime qu'il y a plus de 10 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes d'où un grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. Ces composés peuvent d'être classés comme alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes ou pseudo-alcaloïdes selon la classification d'Hegnauer (Hegnauer, 1988).

#### **2.1.1. Classification et biosynthèse des alcaloïdes**

**\*Alcaloïdes vrais :** Leur biosynthétique s'effectue à partir d'acides aminés, ils sont sous forme de sels de divers acides dans les plantes. Ils représentent la classe d'alcaloïdes la plus nombreuse, ils sont caractérisés par leur toxicité et leur large spectre d'activité biologique. Les alcaloïdes de Fabacées sont des alcaloïdes vrais.

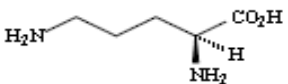
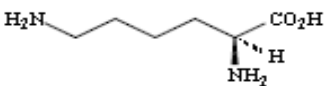
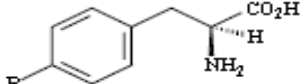
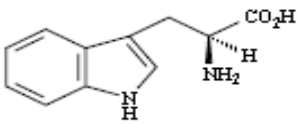
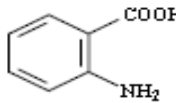
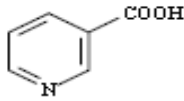
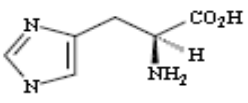
**\*Protoalcaloïdes** : Sont des amines simples, l'atome d'azote ne faisant pas partie d'un hétérocycle, ils dérivent d'acide aminé. *Exemple : Colchicine.*

**\*Pseudoalcaloïdes** : Ne dérivent pas d'acides aminés, ils sont pour la plupart basiques. Les alcaloïdes stéroïdaux et les purines, sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes. Exemple : caféine

Le précurseur est pour les alcaloïdes vrais « un acide aminé »: ornithine, lysine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, acide anthranilique (Figure 12).

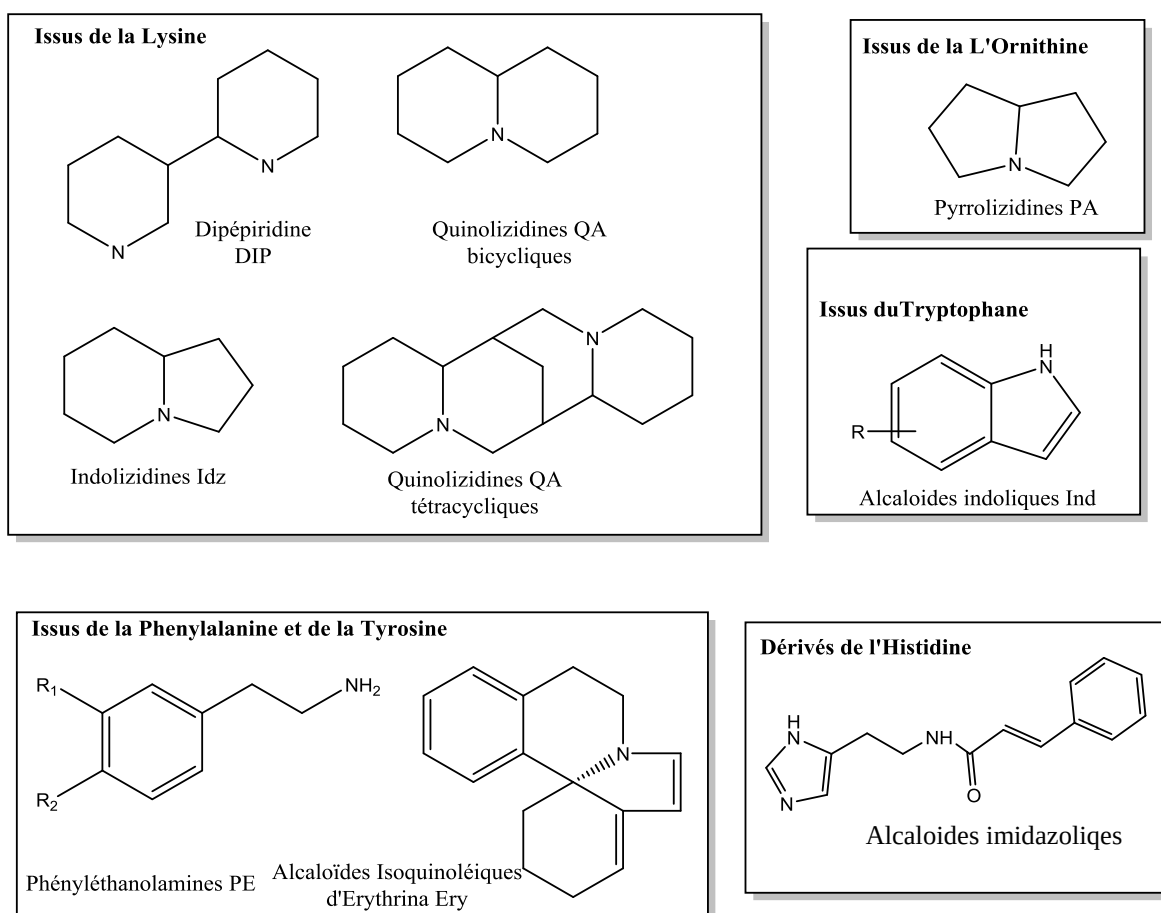
Le tableau (6) suivant représente les acides-amaniés précurseurs des différentes classes d'alcaloïdes. Les alcaloïdes des Fabacées sont issus du métabolisme de l'ornithine et de la lysine.

**Tableau 6.** Les principales classes d'alcaloïdes présents chez les Fabacées (Muniz.2006)

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

Les principales classes d'alcaloïdes présents chez les Fabacées sont :

- Ceux dérivés de la Lysine : alcaloïdes pipéridiniques (DIP), quinolizidiniques (QA) et indolizidiniques (Idz)
- Ceux dérivés de l'ornithine : alcaloïdes pyrrolizidiniques (PA)
- Des Alcaloïdes indoliques (Ind) dérivés du tryptophane
- Des Phényléthanolamines (PE) et alcaloïdes isoquinoléiques (alcaloïde d'Erythrina : Ery) issue tyrosine et de la phenylalanine
- Des alcaloïdes Imidazoliques dérivés de l'histidine (histamine)



**Figure 12.** Les principales classes d'alcaloïdes et leurs précurseurs chez les Fabacées.

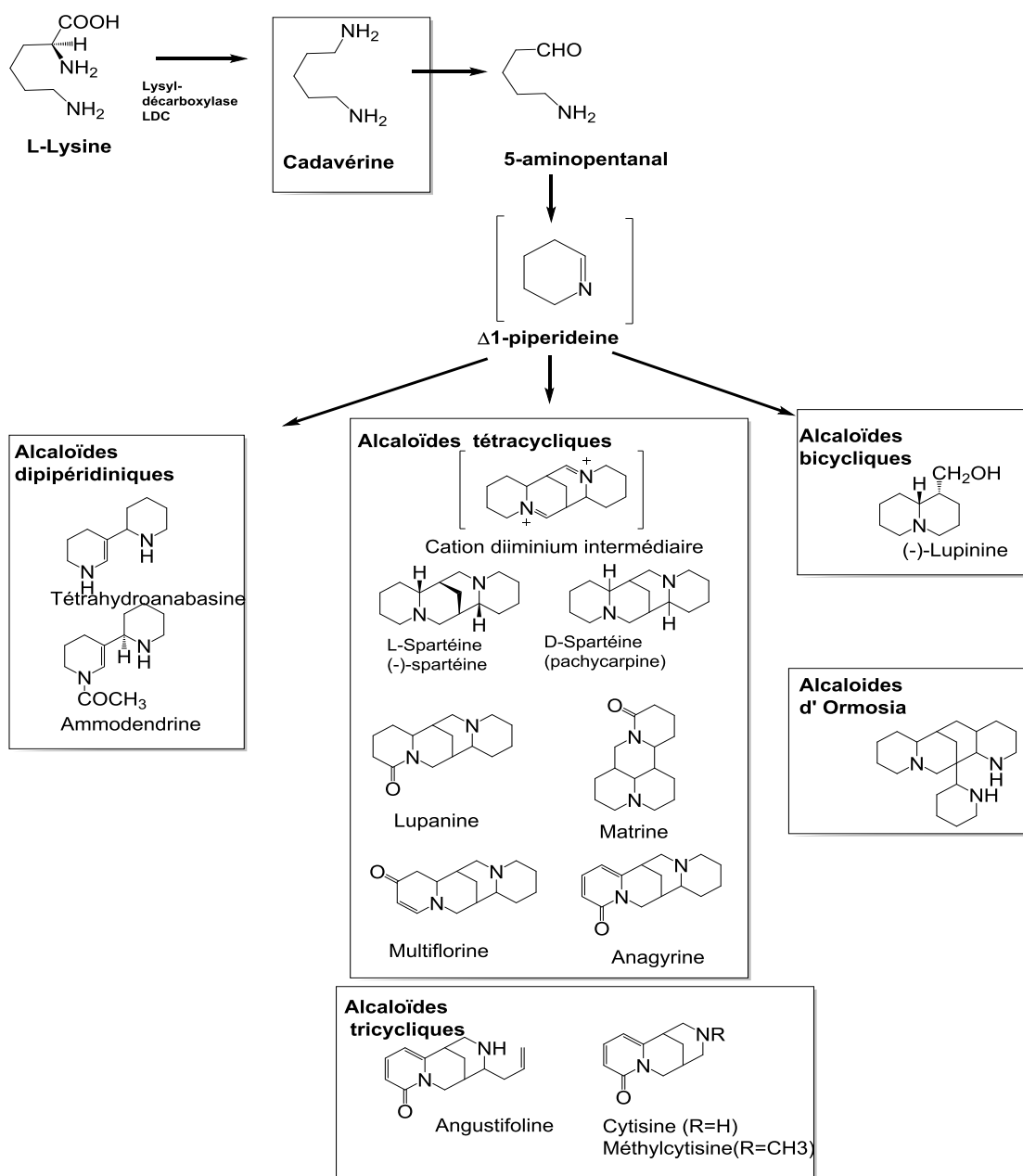
(Boutefnouchet 2015-2016)

#### 2.1.1.1. Alcaloïdes issus de la Lysine : alcaloïdes pipéridiniques, quinolizidiniques et indolizidiniques

Biogénétiquement, les alcaloïdes quinolizidiniques et pipéridiniques proviennent du précurseur cadavérine, issu de la décarboxylation de la L-lysine. L'intermédiaire clé  $\Delta^1$ -pipéridine dont les deux formes tautomères (énamine et iminium) se condenseraient entre

elles pour aboutir aux dérivés quinolizidiniques et pipéridiniques (Figure13).

Les **alcaloïdes quinolizidiniques (QA)** figurent comme le groupe le plus important d'alcaloïdes chez les légumineuses, au sein des différentes tribus de la sous-famille des Papilionoideae : Genisteae, Crotalariae, Podalyrieae, Liparieae, Thermopsidae, Euchrestae, Brongniartieae et Sophoreae.



**Figure 13.** Principaux groupes d'alcaloïdes issus de la Lysine (Wink.et Mohamed 2003)

**Les alcaloïdes dipipéridiniques** du type ammodendrine présentent un schéma de distribution comparable à celui des alcaloïdes quinolizidine. Cependant, à la différence des alcaloïdes quinolizidiniques, les dipéridines sont également représentées au sein de la tribu des *Crotalariae*, qui accumule plutôt les alcaloïdes de type pyrrolizidine et les acides aminés non protéiques.

Parmi **les alcaloïdes quinolizidiniques** (QA), on distingue les alcaloïdes bicycliques, tétracycliques et tricycliques, ainsi que les alcaloïdes particuliers retrouvés au sein du genre *Ormosia* contenant une unité pipéridinique supplémentaire.

**a) Alcaloïdes bicycliques** : il se retrouve essentiellement chez les Lupins (lupinine, lusitanine et lamprolobine) sauf chez les *Crotalariae* et peut-être *Thermopsidae* et *Euchrestieae*, au sein desquels cependant, certains genres sont susceptibles de produire des alcaloïdes bicycliques.

**b) Alcaloïdes tétracycliques** : Les alcaloïdes tétracycliques sont très répandus au sein de la famille. Ceux de type spartéine prédominent chez les Genistées. Les deux formes L- et D-spartéine sont susceptibles de se former, néanmoins, leur coexistence est exceptionnelle au sein d'une même plante. C'est ce noyau saturé qui se forme en premier au cours de la biogenèse. Les autres dérivés sont issus d'oxydations enzymatiques de ce noyau. Les dérivés de type anagyrine et cytisine porteurs du groupement oxydé $\alpha$ -pyridone sont présents au sein de la tribu des *Papilionoideae*, et notamment au sein des genres *Cytisus* et *Genista*.

D'après Van Wyk, la tribu des *Crotalariae* et des *Podalyrieae* diffèrent de toutes les autres tribus des *papilionoideae* par l'absence d'alcaloïdes de type  $\alpha$ -pyridone. Les dérivés de type Lupanine hydroxylées et leurs esters se retrouvent également au sein de ces deux tribus, en particulier dans les graines (Faugeras, G. et Paris, R. 1965), (Van Wyk, 2003) et (Van Wyk, 2005).

Les alcaloïdes tétracycliques de type matrine sont présents au sein de plusieurs espèces de *Sophora* en combinaison avec les alcaloïdes  $\alpha$ -pyridone.

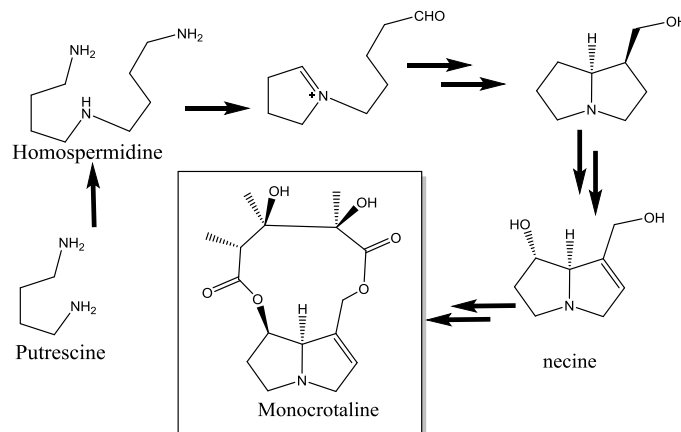
#### **2.1.1.2. Alcaloïdes issus de l'ornithine : alcaloïdes pyrrolizidiniques**

Une étude fine de la biosynthèse des nécines a montré que la formation de ces composés ne passe pas par la condensation (théorique) d'une molécule de putrescine avec son produit de désamination. En fait, la condensation de deux molécules de putrescine (ou d'une molécule de putrescine et d'une molécule de spermidine) conduit à un intermédiaire symétrique, l'homospermidine (=N-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutane). Cette dernière est ensuite



cyclisée selon une séquence classique : désamination oxydative, formation d'une base de Schiff. Nouvelle désamination oxydative et réaction de Mannich intramoléculaire.

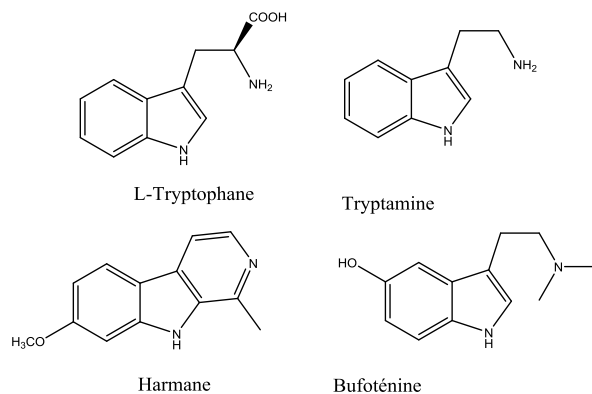
C'est essentiellement au sein du genre *Crotalaria* que ces alcaloïdes sont retrouvés, avec notamment des esters d'acides néciques tels que la monocrotaline (Figure.14).



**Figure 14.** Schéma de la biosynthèse des pyrrolizidine (Boutefnouchet 2015-2016)

### 2.1.1.3 Alcaloïdes issus de Tryptophane

Parmi les alcaloïdes issus du L-tryptophane, les  $\beta$ -carbolines ont été identifiées chez les Mimosoïdeae et les Caesalpinoïdeae, et quelques Desmodium (Figure.15).



**Figure 15.** Schéma des alcaloïdes issus du L-tryptophane (Boutefnouchet 2015-2016)

Les amines simples et les tryptamines psychoactives sont retrouvées chez quelques espèces de la famille des Mimosoïdeae, Cassieae, Desmodieae et Hedysareae, parfois associés à des alcaloïdes de type carbolines (Wink, 2013). La physostigmine est un alcaloïde indolique simple, sa répartition est restreinte aux genres *Physostigma* et *Dioclea*.

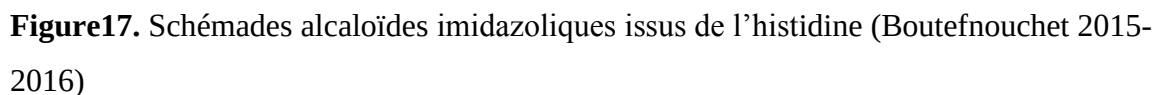
### 2.1.1.4. Alcaloïdes issus de phénylalanine et tyrosine

Parmi les alcaloïdes issus du métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine, il existe

[illegible]

#### 2.1.1.5. Alcaloïdes issus d’Histidine

Il existe également au sein de la famille des Fabaceae, des alcaloïdes issus du métabolisme de l'imidazole. Leur répartition est très restreinte, on en retrouve notamment chez des Acacias et chez *Spartidium saharae* au sein duquel ont été décrites des N-cinnamoylhistamines (Figure.17).



## 2.1.2 Distribution des alcaloïdes dans la Famille des Fabaceae

Les travaux de Wink rapportent une distribution des alcaloïdes au sein de la famille des Fabaceae (Wink ,2013).



**Figure 18.** Schéma (F) de distribution des alcaloïdes dans de la Famille Fabaceae (Wink 2013)

Rouge : alcaloïdes quinolizidiniques

Bleu : Erythrina

Noir : β-carbolines

Vert : Alcaloïdes Pyrrolizidiniques

Jaune : Physostigmine

Blanc : PNAA

Les acides aminés non protéiques (PNAA) sont abondants dans de nombreuses tribus de la famille des Fabaceae, celles-ci n'emmagent pas d'alcaloïdes (Figure.18).

Il s'agit de la plupart des membres du clade IRLC (Inverted-repeat-lacking clade) qui contiennent notamment de la Concavanine (Wink, 2013). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont spécifiques de la tribu des Crotalariae Les β-carbolines, alcaloïdes indoliques dérivés du tryptophane, se retrouvent dans quelques tribus. Les alcaloïdes quinolizidiniques sont

essentiellement représentés dans la sous-famille des Papillonoideae.

### 2.1.3 Distribution des alcaloïdes dans sous Famille des papillonoideae

L'étude de Wink et al en 1994 s'est intéressée à la répartition en alcaloïdes au sein de la sous-famille des Papillonoideae (Kass et Wink ,1994) voir (Figure 19) et (Annexe).

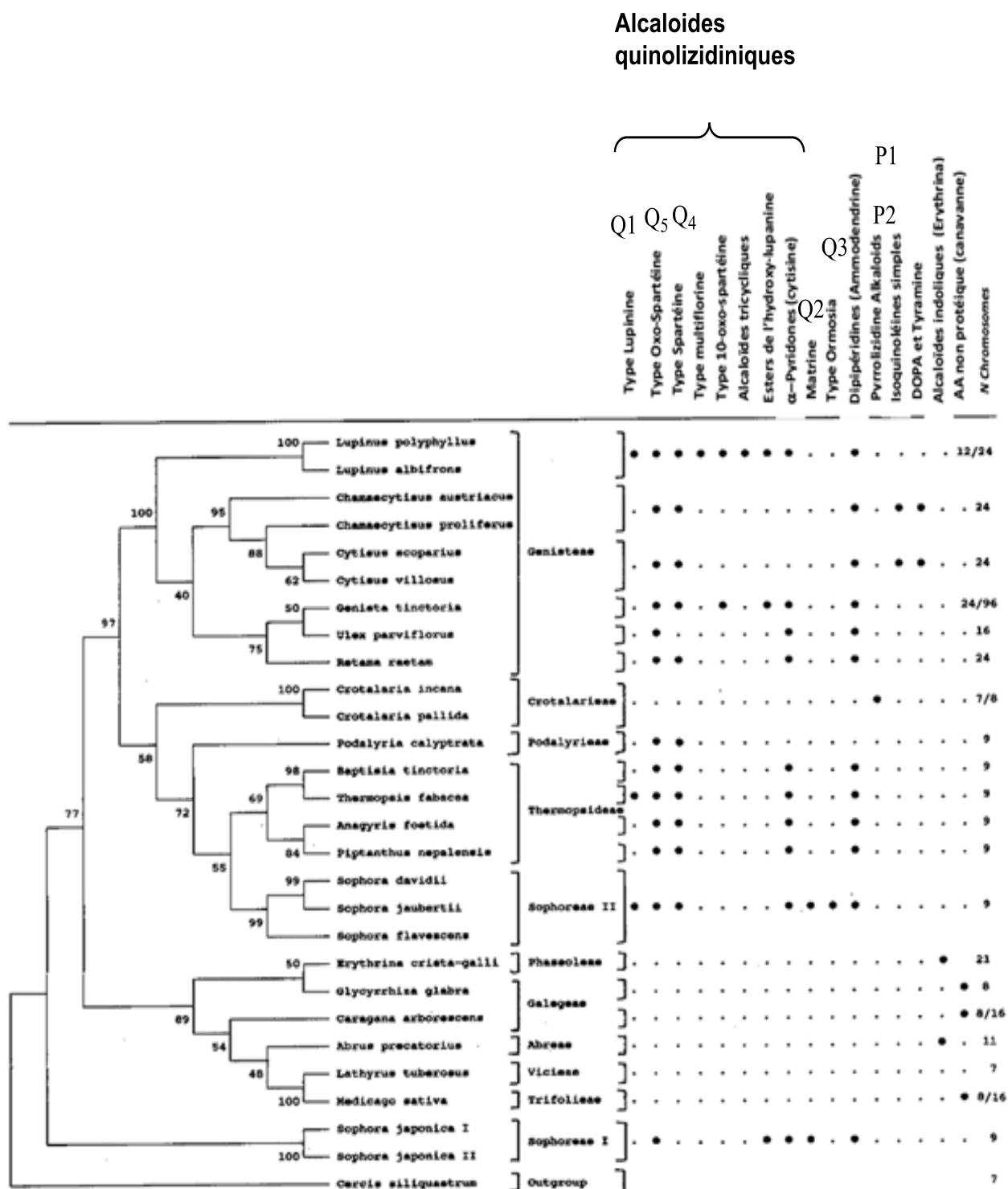
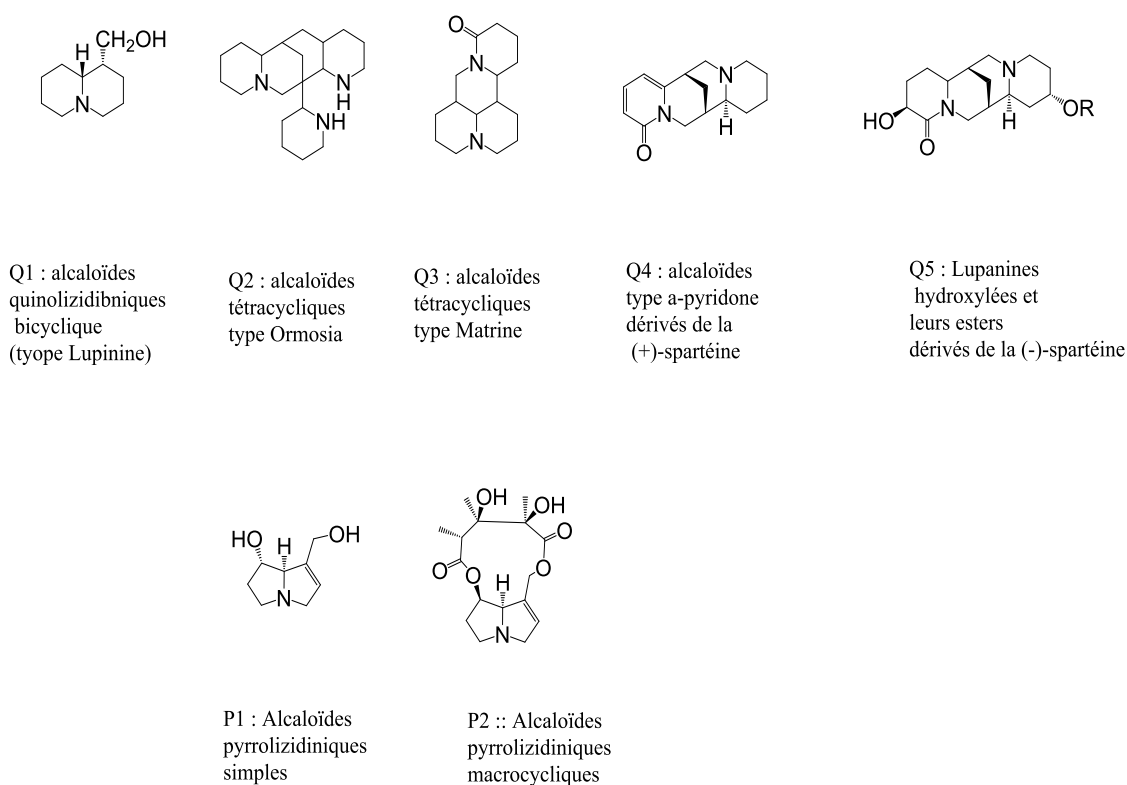


Figure 19. Schéma de la répartition des alcaloïdes au sein de la sous-famille des Papilionoideae (Kass .et Wink. 1994)

Dans cette étude, nous pouvons voir que :

- Les alcaloïdes quinolizidiniques (Q1-Q5) (Figure 20) sont présents au sein des tribus des Thermopsidae, Podalyrieae, Sophoreae II et Genisteae. Les autres tribus des Papilionoideae n'en produisent à part la tribu des Sophoreae I.
- Les Crotalarieae produisent essentiellement des alcaloïdes pyrrolizidiniques (P1-P2), mais proviennent d'un ancêtre commun avec les taxons produisant des alcaloïdes quinolizidiniques.
- Les alcaloïdes indoliques spécifiques du genre *Erythrina* ne se retrouvent dans aucun genre.
- L'accumulation de phényléthylamines simples et les isoquinoléines sont retrouvées au sein du complexe *Cytisus*
- Les acides aminés non protéiques (AANP) sont habituellement présents dans les tribus qui ne produisent pas d'alcaloïdes (Galegeae et Trifolieae)



**Figure 20.** Structure des alcaloïdes au sein du clade Genistoides (Papilionoideae)(Wink 2013)

#### 2.1.4. Distribution des alcaloïdes dans le groupe Genistoides

Une étude de Van Wyk portant sur les relations chimiotaxonomiques au sein du Clade Genistoïde de la sous-famille des Papilionoideae a confirmé l'absence d'alcaloïdes quinolizidiniques (Q1 à Q5) au sein de la tribu des Crotalarieae. Dans cette étude, les

lupanines hydroxylées et leurs esters (Q5) (Tableau7) retrouvés chez les Podalyrieae, semblent se retrouver au sein des Crotalarieae, leur répartition au sein des Genisteae semble dépendre de la zone géographique (Van Wyk, 2003).

**Tableau7.**Répartition de certains alcaloïdes dans le groupe Genistoides (VanWyk. 2003)

| Tribus                        | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 | P1 | P2 |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| <b>Sophoreae</b>              | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  |
| <b>Brongniartieae</b>         | +  | +  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <b>Podalyrieae</b>            | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  |
| <b>Crotalarieae</b>           | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  |
| <b>Thermopsidaeae</b>         | ?  | +  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <b>Genisteae</b>              |    |    |    |    |    |    |    |
| <i>Genres africains</i>       | +  | -  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Genres sud-américains</i>  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Genre Tempérés du Nord</i> | +  | -  | -  | +  | +  | +  | -  |

**Caractères chimiques :** Q1- alcaloïdes quinolozidine bicyclique (lupinine, lusitanine et lamprolobine) Q2- tetracyclique type Ormosia alcaloïdes quinolozidine -Q3 –tétracyclique type matrine alcaloïdes quinolozidine Q4- alcaloïdes alpha -pyridone [(+) - voie de spartéine] Q5- lupanines hydroxylés et leurs esters [(+) - Spartéine voie] P1- simple pyrrolizidine P2-macrocycliques alcaloïdes de pyrrolizidine.

### 2.1.5. Distribution des alcaloïdes dans quelques genres de la tribu des Crotalarieae

Les études de Van Wyk portant sur plusieurs genres de la tribu des Crotalarieae (Van Wyk *et al.*, 1988 a), (VanWyk etVerdoorn 1989) et (Van Wyk et Verdoorn 1989 a, b, c), montre une nette distinction dans la production d'alcaloïdes entre les Genres *Calobota* (*Spartidium*) et *Lebeckia* (Van Wyk *et al.*, 1989).

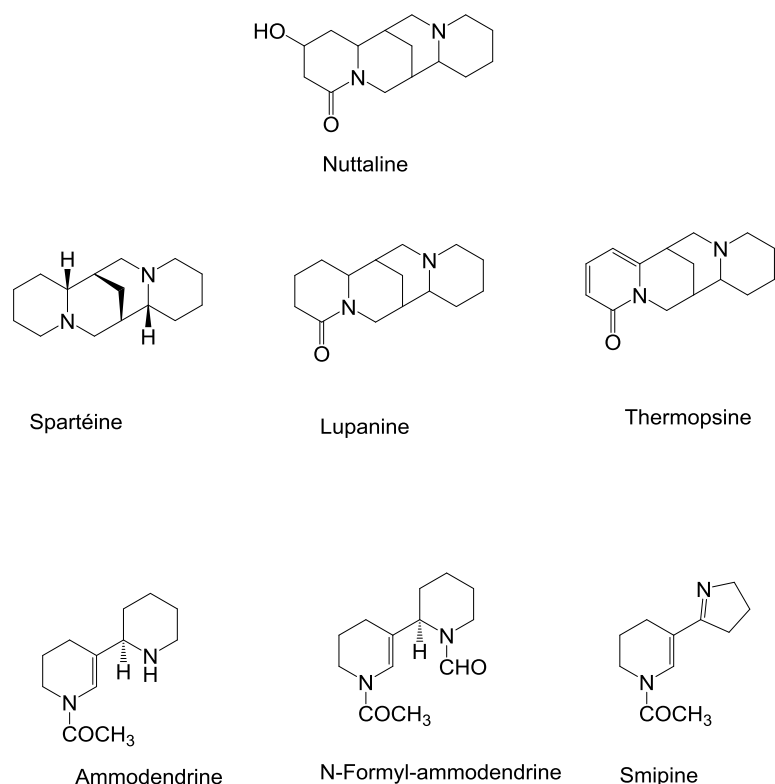
Dans ces études, le genre *Calobota* est uniquement représenté par *Spartidium saharae*. En effet, le genre *Lebeckia* produit essentiellement des alcaloïdes quinolizidiniques, alors que *Calobota* (*Spartidium*) produit majoritairement des alcaloïdes bipipéridiniques (Ammodendrine, traces deN-formyl ammodendrine). La spartéine n'est retrouvée que sous forme de trace dans *Calobota* (VanWyk *et al.*, 1989).

Le genre de la tribu des Genisteae, *Dichilus*, a été inclut dans un but comparatif (VanWyk *et al.*, 1988 b). Ce genre produit des traces d'alcaloïdes quinolizidiniques à l'exception de la thermopsine. Il produit par contre une grande quantité d'alcaloïdes dipipéridiniques

(Ammodendrine) voir (Tableau 8) et (Figure.21).

**Tableau 8.** Alcaloïdes signales dans les 9 genres de la tribu des Crotalarieae (Van Wyk et Verdoorn 1989 a, b, c),

|                                                    | <i>Calobota</i><br>( <i>Spartidium</i> ) | <i>Lebeckia</i> | <i>Woborgia</i> | <i>Aspalathus</i> | <i>Rafnia</i> | <i>Pearsonia</i> | <i>Rothia</i> | <i>Lotononis</i> | <i>Crotalaria</i> | <i>Dichilus</i> (tribu<br>des <i>Genisteae</i> ) |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Alcaloïdes quinolizidiniques</b>                |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   |                                                  |
| <i>Nuttaline</i>                                   | -                                        | +++             | tr              | tr                | tr            | tr               | +             | +                |                   | tr                                               |
| <i>Spartéine</i>                                   | tr                                       | +++             | tr              | +                 | tr            | +                |               | +                |                   |                                                  |
| <i>Lupanine/isolupanine</i>                        | -                                        | +++ /<br>+      | tr              | + / tr            | tr            | ++ / +           | ++ / tr       | tr               |                   | tr                                               |
| <i>Thermospine</i>                                 |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   | ++                                               |
| Esters<br>quinolizidiniques                        |                                          |                 |                 |                   |               | ++               | +++           |                  |                   |                                                  |
| <b>Alcaloïdes pipéridiniques</b>                   |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   |                                                  |
| <i>Ammodendrine</i>                                | +++                                      | tr              | tr              | tr                | tr            | +                | ++            | tr               |                   | +++                                              |
| <i>N-Formyl-Ammodendrine</i>                       | tr                                       |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   | tr                                               |
| <i>Smipine</i>                                     |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   | ++                                               |
| <i>Bipipéridyl-Piperidone</i>                      |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   | + / +                                            |
| <i>1-acétyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine</i>         |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   | +                                                |
| <i>N-cinnamoyl-Histamine</i>                       | +++                                      |                 |                 |                   |               |                  |               |                  |                   |                                                  |
| <b>Alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques</b> |                                          |                 |                 |                   |               |                  |               | ++               | ++                |                                                  |



**Figure 21.** Structure des alcaloïdes dans les 9 genres de la tribu des Crotalarieae (VanWyk *et al.*, 1989), (Van Wyk etVerdoorn .1989).

La quasi- absence d'alcaloïdes quinolizidiniques au sein du genre *Calobota* (*Spartidium*) constitue une différence significative avec le genre *Lebeckia*. Néanmoins, la spartéine a été identifiée sous forme de traces chez *Calobota* (*Spartidium*). L'absence d'alcaloïdes quinolizidiniques de type  $\alpha$ -pyridone, ainsi que l'absence des esters de quinolizidines, présents dans quelques genres de la tribu, confirme la position basale de ces deux genres au sein de la tribu, proposée par Polhill.

Concernant les alcaloïdes pipéridiniques, l'ammodendrine est présente dans la plupart des genres de la tribu, au moins sous forme de traces. Elle est retrouvée en quantité importante au sein de *Calobota saharae*, avec des traces pour *N*- formyl-Ammodendrine. Sa présence abondante au sein du genre *Dichilus*, de la tribu des *Genisteeae*, n'en fait pas un marqueur chimiotaxonomique de la tribu des *Crotalarieae*.

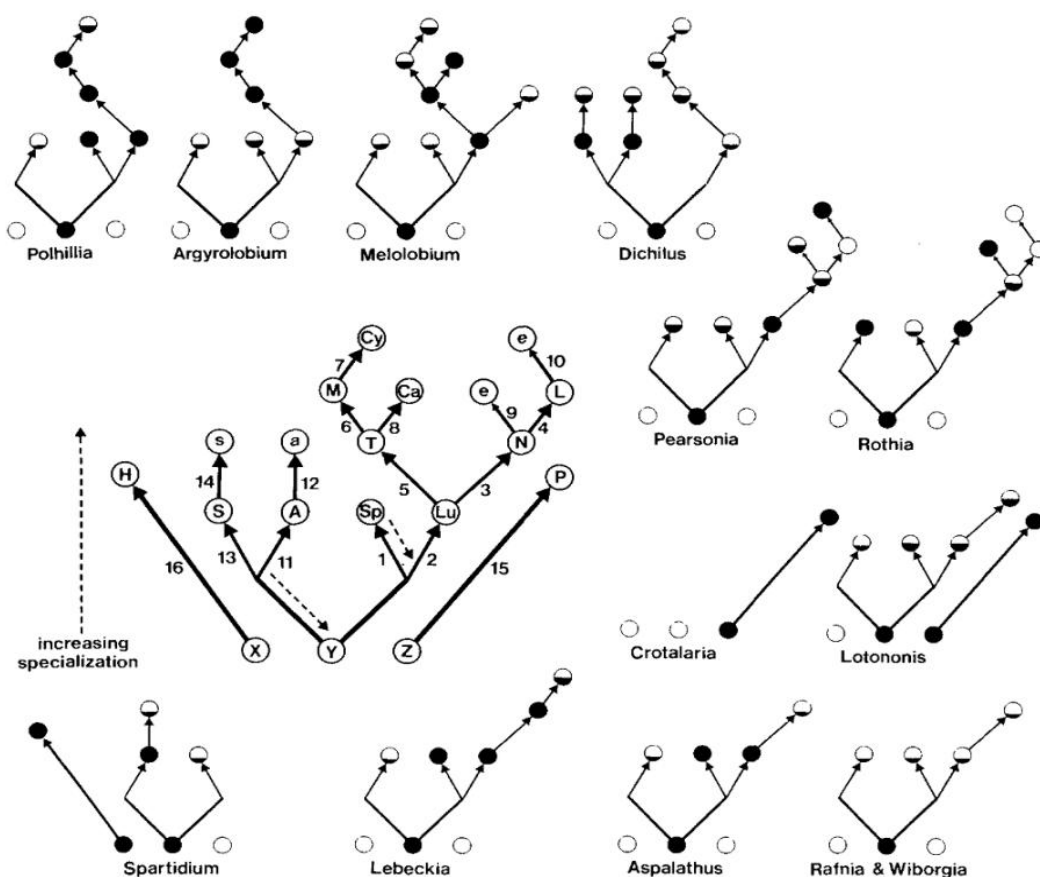
De plus des dérivés imidazoles (histamine) sont des composants majoritaires pour l'espèce *Calobota saharae*

Il est à noter la production d'alcaloïdes dérivés de l'histidine (*N*-cinnamoyl-histamine) uniquement par *Calobota* (*Spartidium*). Le genre *Crotalaria*, quant à lui, produit majoritairement des alcaloïdes pyrrolizidiniques. B-E Van Wyk et G.H Verdoorn proposent



un diagramme des voies biogénétiques (Figure 22), plus ou moins exprimées en fonction des genres de la tribu des Crotalariaeae (Van Wyk et Verdoorn ,1990).

Ces éléments sont schématisés sur le diagramme suivant sur lequel, les alcaloïdes issus de la voie de l'histidine sont représentés par le point basal **X**, ceux issus de la voie de la lysine sont représentés par le point basal **Y**, et ceux de la voie de l'ornithine (alcaloïdes pyrrolizidiniques), par le point basal **Z**.



**Figure 22.** Diagramme des voies biogénétiques des genres de la tribu des Crotalariaeae (Van Wyk et Verdoorn ,1990).

Les alcaloïdes issus de la lysine (**Y**) se scindent en deux groupes, ceux de types pipéridiniques (**S**=smipine, et **A**= ammodendrine), ceux de type quinolizidines. Ces derniers peuvent être représentés par ceux de type Spartéine (**Sp**) et ceux de type Lupanine (**Lu**), plus ou moins différenciés. Les lupanines dont le cycle s'est oxydé en  $\alpha$ -pyridone sont notés (**T**), ceux-ci pouvant se différencier en lupanine monohydroxylées (**N**) et les polyhydroxylées (**L**).

### 2.1.6. Distribution des alcaloïdes dans l'espèce *Calobota saharae* (Boatwright et Van wyk)

Il existe uniquement 3 publications rapportant la composition alcaloïdique de *Calobota* (*Spartidium*) *saharae*. Les travaux de Bourquin et al ont porté sur un specimen algérien, collecté à la période de floraison dans la région Nord-Saharienne, à Ghardeia (région du Mزاب) en 1985 (Bourquin *et al.*, 1987) voir (Tableau 9).

Ces derniers décrivent la présence de 4 alcaloïdes de type pipéridinique mais aussi de 3 alcaloïdes de type quinolizidinique, dans les parties aériennes de spécimen de la région de Ghardaïa (Algérie). Les travaux de Van Wyk et al, réalisés sur des échantillons marocains et libyens rapportent la présence de 2 alcaloïdes pipéridiniques uniquement, et de traces de spartéine, seul alcaloïde quinolizidinique identifié (Van Wyk *et al.*, 1989).

**Tableau 9.** Distribution des alcaloïdes dans l'espèce *Calobota saharae* (*Spartidium saharae*)

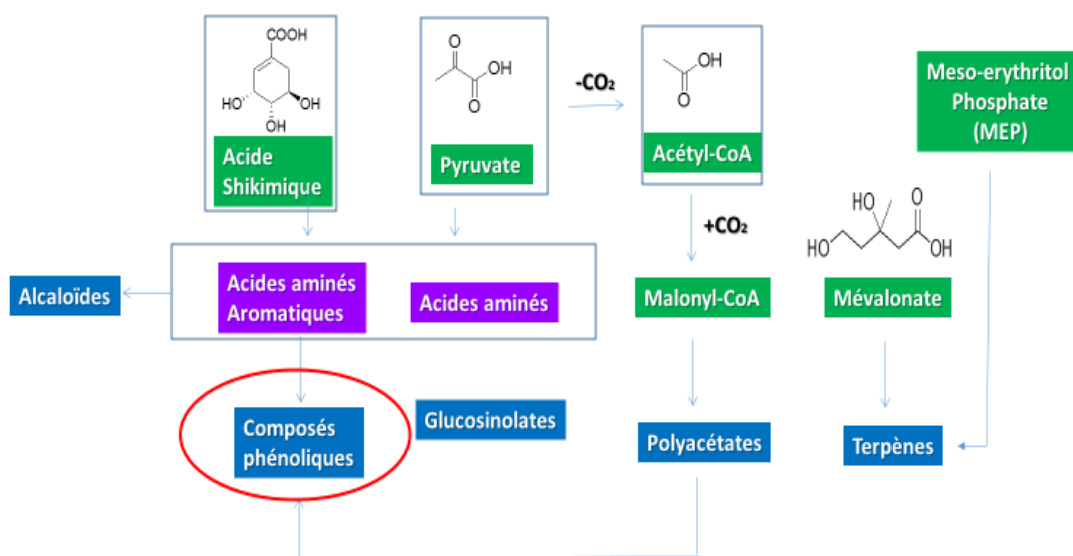
| Composés identifiés                 | Bourquin <i>et al.</i> , 1987 | Van Wyk <i>et al.</i> , 1989 – specimen1 | Van Wyk <i>et al.</i> , 1989 -Specimen 2 | Abdelhalim <i>et al.</i> , 2000 |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|
|                                     | Parties aériennes             | Feuilles et rameaux                      | Fleurs et jeunes gousses                 | Parties aériennes               |
|                                     | Algérie - Ghardaïa            | Maroc – Duel el Kherona                  | Libye – GebelNefoussa                    | Libye-Tripoli                   |
| <i>Alcaloides pipéridiniques</i>    | +                             | +                                        | +                                        | +                               |
| <b>Ammodendrine</b>                 | +                             | +                                        | +                                        | +                               |
| <b>N-méthyl ammodendrine</b>        | +                             | -                                        | -                                        | -                               |
| <b>N-formyl ammodendrine</b>        | -                             | +(trace)                                 | +(trace)                                 | +(trace)                        |
| <b>N-Acethylhystrine</b>            | +                             | -                                        | -                                        | +                               |
| <b>Anabasine</b>                    | +                             | -                                        | -                                        | -                               |
| <i>Alcaloides quinolizidiniques</i> | +                             |                                          |                                          |                                 |
| <b>Spartéine</b>                    | +                             | +(trace)                                 | +(trace)                                 | -                               |
| <b>Lupanine</b>                     | +                             | -                                        | -                                        | -                               |
| <b>Cytisine</b>                     | +                             | -                                        | -                                        | -                               |
| <i>Autres</i>                       |                               | <i>Cinnamoyl histamines</i>              | <i>Cinnamoyl histamines</i>              |                                 |

La présence de N-formylammodendrine a été identifiée à l'état de traces par Abdel-Halim et al dans une étude portant sur les parties aériennes d'un échantillon lybien. Il décrit uniquement la présence de 3 alcaloïdes pipéridiniques : ammodendrine, N-formylammodendrine et N-acétylhystrine (Abdel-Halim *et al.*, 2000).

L'ensemble des travaux portant sur *Calobota (Spartidium) saharae* rapportent essentiellement la présence d'alcaloïdes pipéridiniques, et plus particulièrement la présence d'ammodendrine. La présence d'alcaloïdes quinolizidiniques n'est rapportée que dans les travaux de Bourquin, alors qu'elle semble être présente uniquement à l'état de traces ou absente chez les autres spécimens étudiés (Tableau 9). D'autre part, seuls les travaux de Van Wyk décrivent la présence de dérivés de l'histamine.

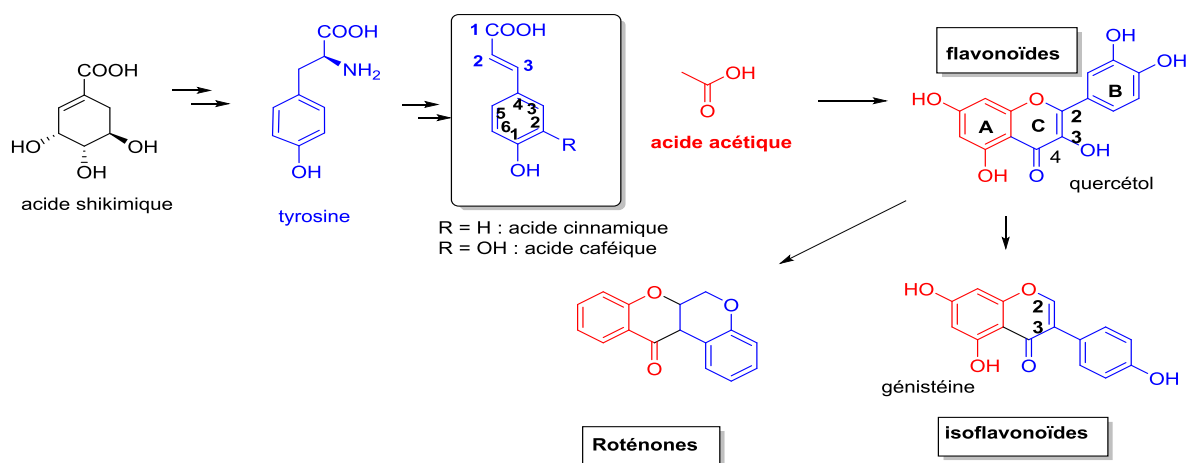
## 2.2. Les composés phénoliques des Fabaceae

Les composés phénoliques peuvent être issus de deux vois biogénétiques (Figure.23) :



**Figure 23.** Schéma des vois biogénétiques des composés phénoliques  
(Boutefnouchet 2015- 2016)

Celle de l'acide shikimique, en passant par une aromatisation aboutissant à la phénylalanine et la tyrosine, ou bien celle de l'acétate. Certains composés sont d'origine mixte, shikimate-acétate, c'est le cas des flavonoïdes au sens large. Ces derniers comprennent les flavonoïdes, les isoflavones et les roténones. Ces trois classes de composés sont retrouvées chez les Fabacées (Figure.24).

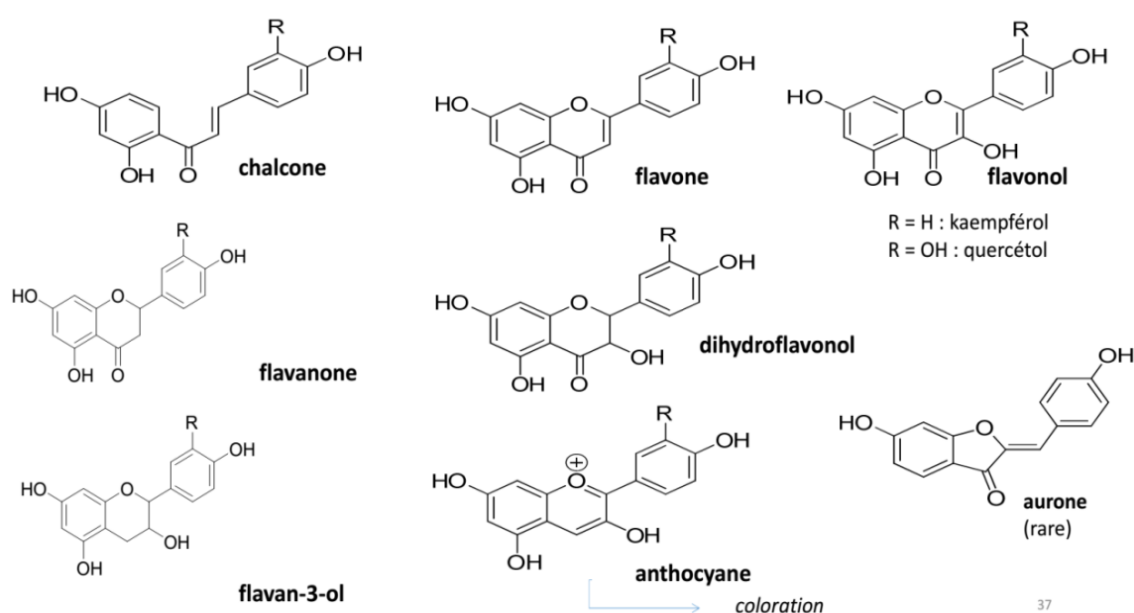


**Figure 24.** Structure des trois classes de composés phénoliques retrouvées chez les Fabacées

## 2.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles aromatiques en C6, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Ce dernier est situé entre les cycles A et B et est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6'.

Il existe une grande variété structurale des flavonoïdes, liée à la cyclisation et à l'oxydation du cycle C : présence ou non d'une double liaison en position 2-3 (*flavone* vs *flavanones*), groupement oxo- en position 4, présence d'un groupement -OH en position 3 (*flavan-3-ols*, *flavonols*) (Figure.25).



**Figure 25.** Différentes variétés structurales des flavonoides chez les Fabacées

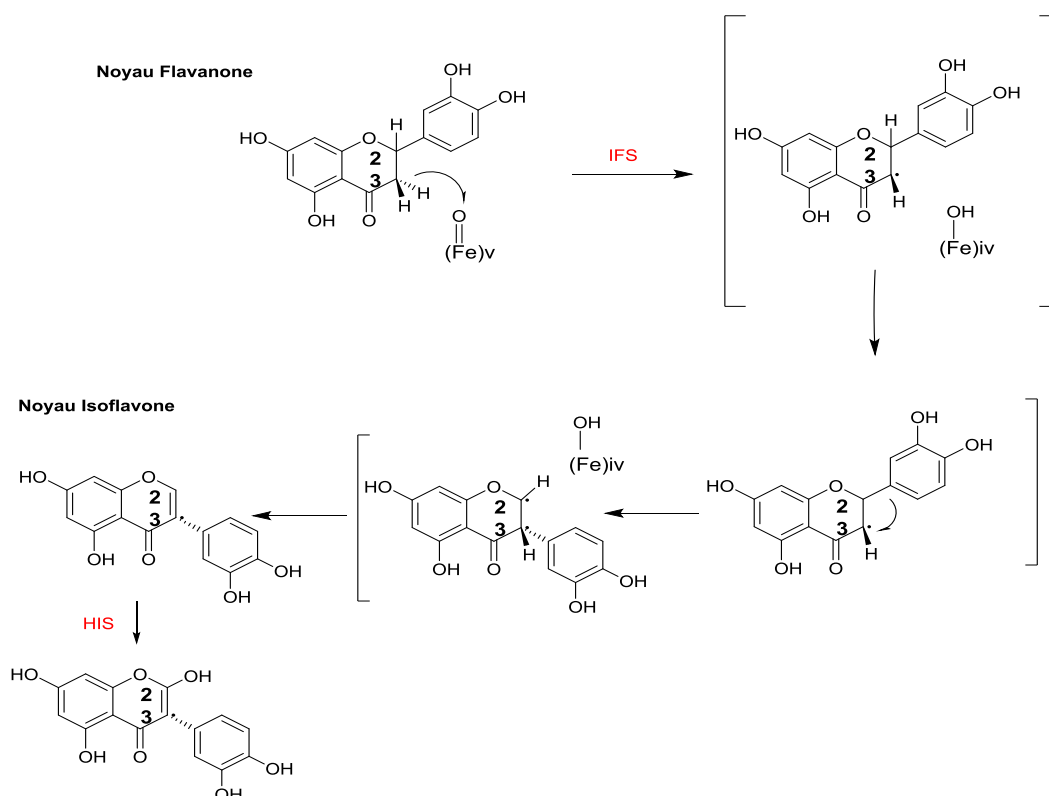
Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme hétérosidiques dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes simples ou polyméthylés sont plutôt présents au sein d'exsudats dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux (Iwashina, 2000).

Les flavonoides sont très largement distribués au sein de la famille des Fabaceae et ne constituent pas de spécificité chimiotaxonomique.

### 2.2.2. Les isoflavones

L'une des particularités importantes de cette famille est la production des métabolites secondaires spécifiques appelés **isoflavonoïdes** impliqués dans la signalisation symbiotique, dans les réactions de défense et présentant un grand intérêt pharmaceutique. Les isoflavones sont issus de l'oxydation d'une flavanone subissant un réarrangement impliquant l'enzyme isoflavone synthase (IFS). Il semblerait que l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoïdes, soit uniquement retrouvée chez les Fabaceae (Figure 26).

La 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) catalyse la réaction d'hydroxylation en position 2 du noyau isoflavone (Tian *et al.*, 2008).



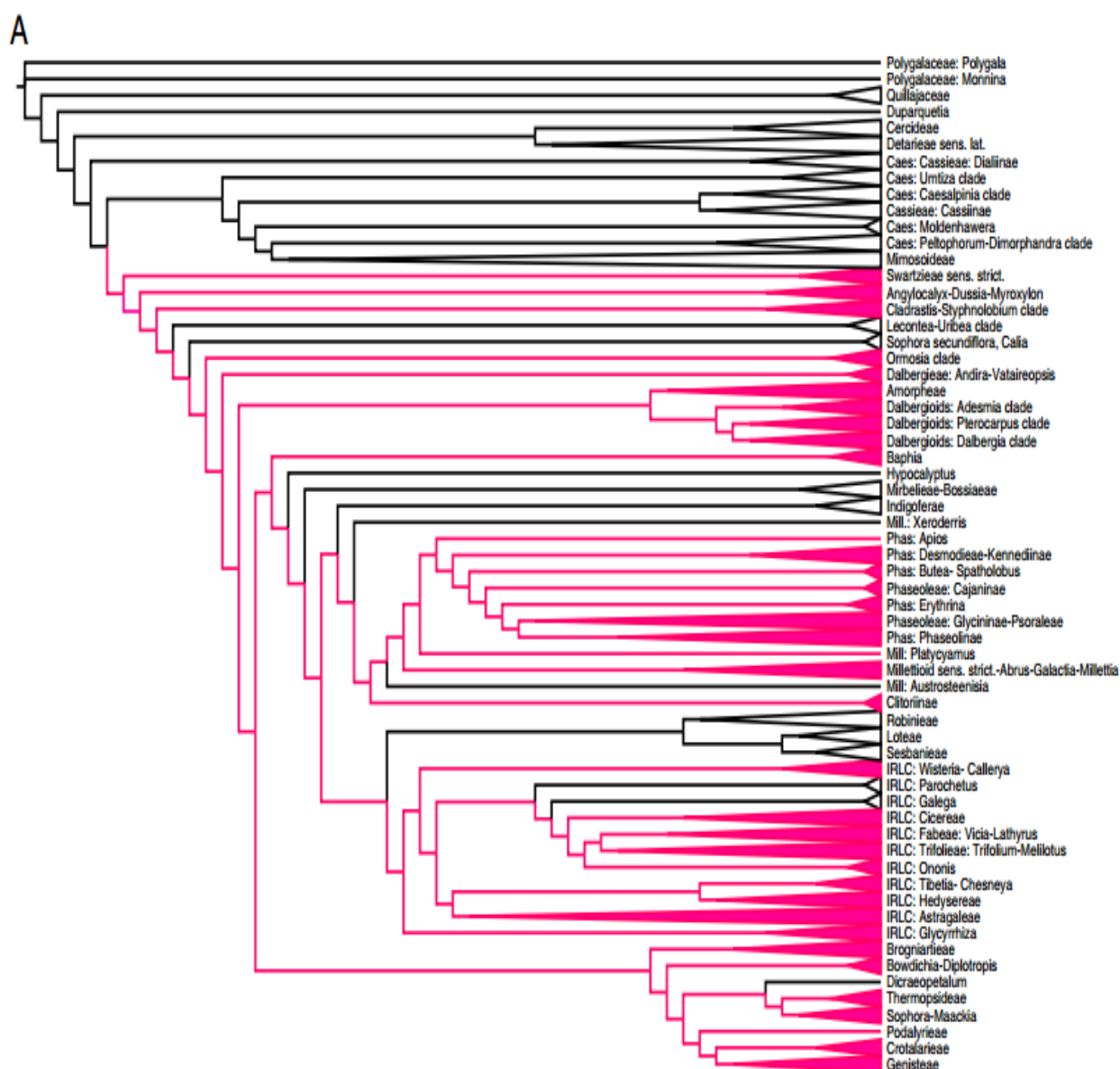
**Figure 26.** Voie de synthèse des isoflavonoïdes par l'enzyme isoflavone synthase (IFS) chez les Fabacées (Tian *et al.*, 2008)

### 2.2.2.1 Distribution des isoflavones chez les Fabaceae

Les isoflavones sont essentiellement représentés chez les Fabaceae (85%), le reste étant retrouvé de manière plus anecdotique chez les autres familles (Famille des Iridaceae) (Iwashina, 2000).

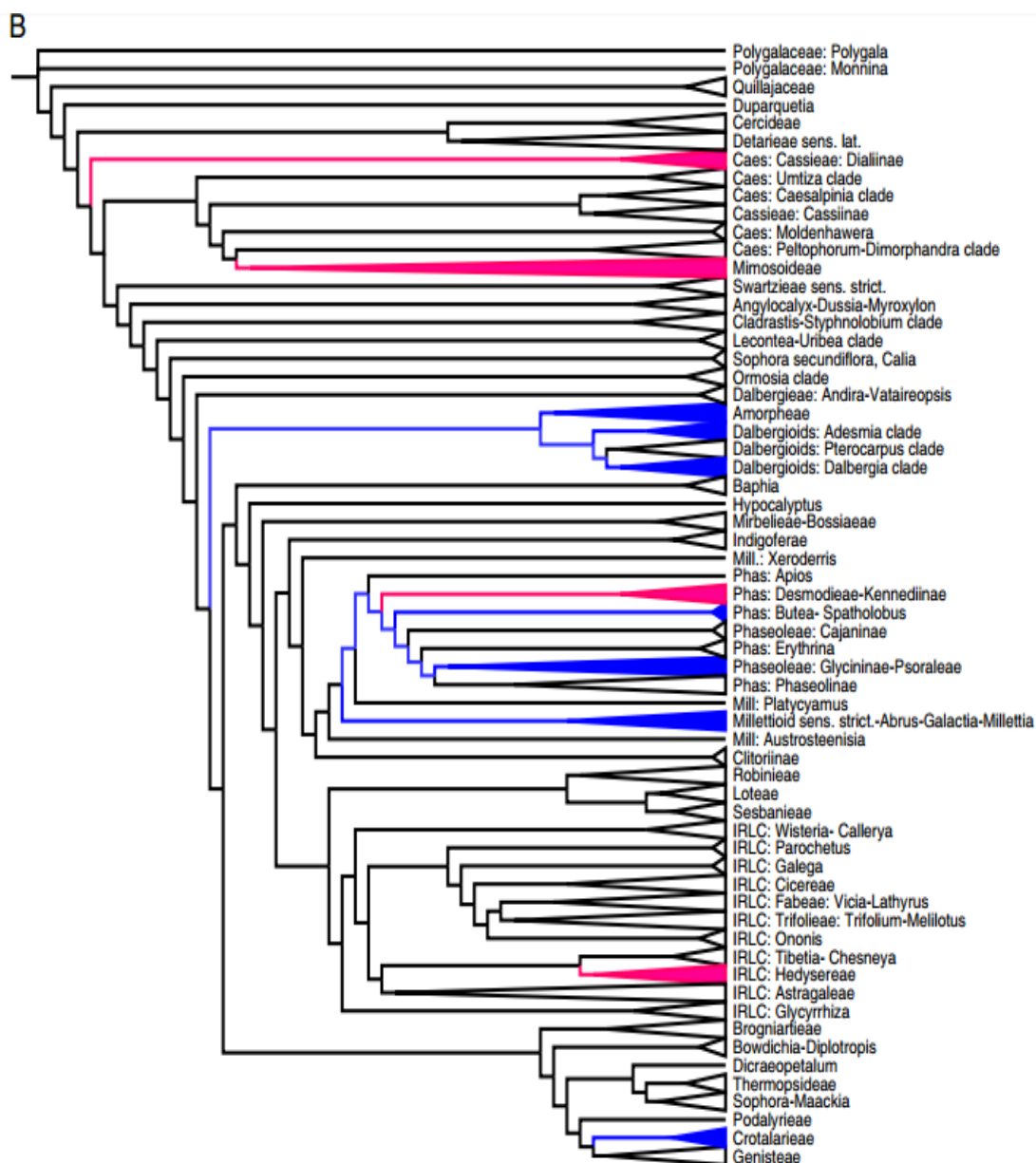
Au sein de la famille, elles sont limitées à la sous famille des Papilionoideae, où ils font cependant défaut dans quelques clades comme celui des Robineae, Loteae, Sesbanieae, Indigofereae et le groupe Mirbelieae-Bossiaee (Wink, 2013) voir (Figure.27A).

Une distribution des isoflavones au sein des Fabaceae est illustrée dans les travaux de Wink M 2013 rapportés ci-dessous.



**Figure 27 (A).** Distribution des isoflavones (rouge) dans de la Famille des Fabaceae (Wink.2013)

Ce dernier rapporte également la distribution des roténones, prédominant au sein des tribus des Amorpheae, Dalbergioideae (sauf le groupe Pterocarpus), certaines Phaseoleae, Millettioideae. Elle est également mentionnée au sein de la tribu des Crotalarieae (Figure 28B).

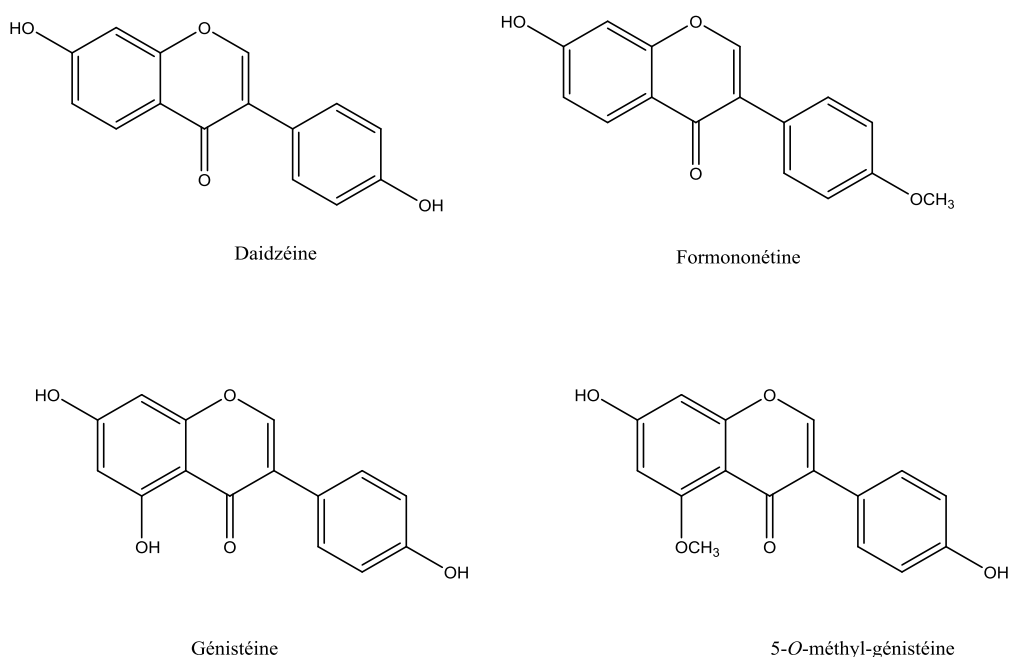


**Figure. 28 (B)** Distribution du rotenone (bleu) et de labufoténine (rouge) dans de la Famille des Fabaceae (Wink, 2013).

Van Wyk rapporte l'absence fréquente du groupement hydroxyle en position 5 des isoflavones de la sous-famille des Papilionoideae (Van Wyk, 2003). Cependant, les substitutions semblent être erratiques et complexes. Harborne a étudié la répartition des

isoflavones et flavonoides au sein de la tribu des *Genisteae* au sens large, incluant les *Genisteae stricto sensu*, les *Crotalarieae*, les *Lupi*.

Il a noté la fréquence de l'association daidzéine, formononétine, génistéine et 5-*O*-méthylgénistéine (Figure 29) dans les feuilles de plusieurs espèces de la tribu des *Genisteae stricto sensu* (Harborne, 1969) voir (Annexe : Tableau.Distribution des flavones, flavonols et isoflavones dans le genre *Genista*).



**Figure 29.** Structure des composés isoflavonoïques au sein de la tribu des *Genisteae* (Harborne, 1969)

Néanmoins, il ne retrouve pas d'isoflavones chez les quelques espèces de la tribu des *Crotalarieae* incluses dans l'étude (*Hypocalyptus obcordatus*, *Lodige sioxalidifolia*, *Crotalaria pumila* et *anseralis*). La 5-*O*-méthylgénistéine est présentée comme marqueur chimiotaxonomique des *Genisteae stricto sensu*, n'ayant pas été isolée ailleurs au sein de la famille des *Fabaceae*.

Il résume les caractéristiques phytochimiques des *Genisteae stricto sensu* à :

- Une forte concentration d'isoflavones,
- Absence de leucoanthocyanidine
- Présence régulière de la quercétine et du kampférol
- Présence de lutéoline



## 2.2.2.2. Distribution des flavonoides et isoflavones dans le Clade des Genistoides

L'étude de De Nysschen et al., ayant porté sur la répartition de 4 flavonoides au sens large dans les graines de plusieurs espèces des tribus du clade Genistoide, comprenant les tribus des Podalyrieae, Liparieae, Sophoreae, Crotalarieae et Genisteae (De Nysschen *et al.*, 1998) voir (Tableau 10').

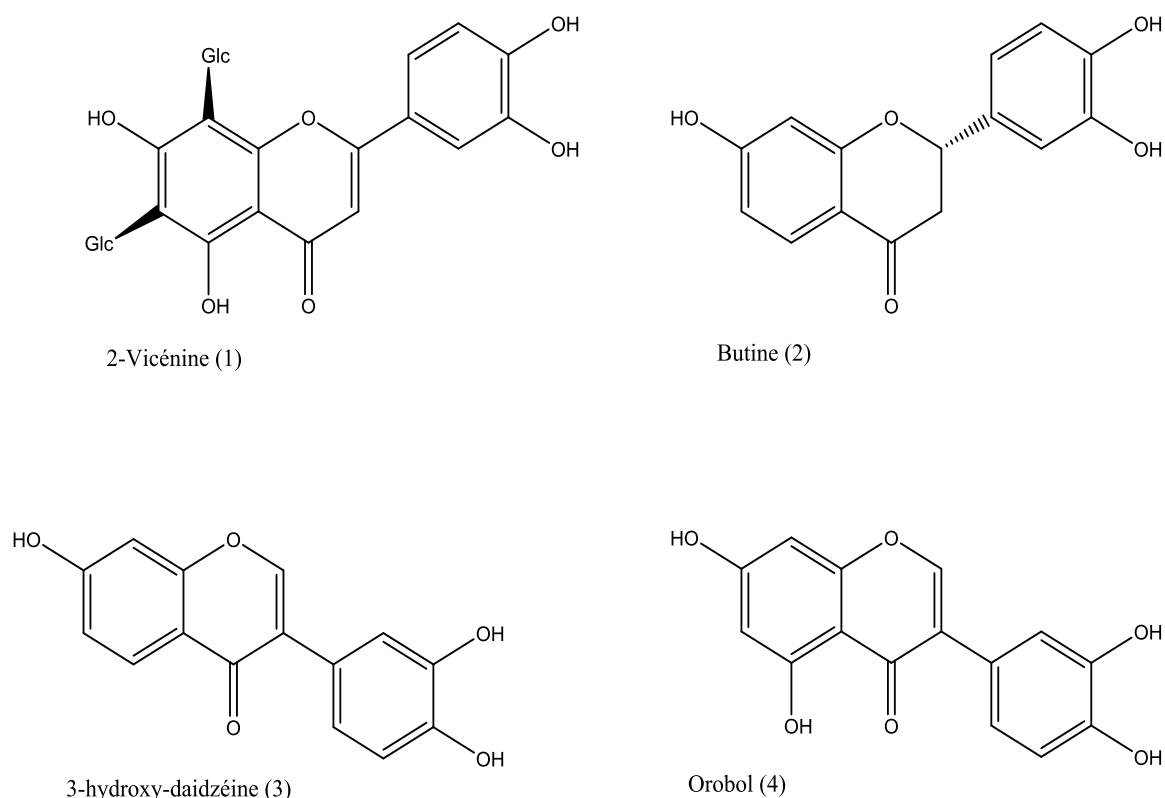
**Tableau 10'.** Répartition de 4 flavonoïdes au sens large dans les graines de plusieurs espèces des tribus du clade Genistoide (De Nysschen, 1998).

| Genus                        | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------------------|---|---|---|---|
| <i>Liparieae</i>             |   |   |   |   |
| <i>Amphithalea</i> (3)       | S | M | M |   |
| <i>Coelidium</i> (2)         |   | S | M |   |
| <i>Hypocalyptus</i> (3)      |   |   |   |   |
| <i>Liparia</i> (5)           |   | S | M |   |
| <i>Xiphotheca</i> (3)        | S | S | M |   |
| <i>Podalyrieae</i>           |   |   |   |   |
| <i>Calpurnia</i> (3)         | M | S | M |   |
| <i>Cyclopia</i> (11)         | S | M | S |   |
| <i>Podalyria</i> (4)         | S | S | M |   |
| <i>Stirtonanthus</i> (3)     | S | S | M | S |
| <i>Virgilia</i> (2)          | M |   | S | M |
| <i>Sophoreae</i>             |   |   |   |   |
| <i>Bolusanthus speciosus</i> | M |   |   | M |
| <i>Cadia purpurea</i>        | M |   | M |   |
| <i>Sophora inhambanensis</i> | M |   | M |   |
| <i>Crotalarieae</i>          |   |   |   |   |
| <i>Aspalathus</i> (2)        | M |   |   |   |
| <i>Crotalaria</i> (8)        |   | M |   |   |
| <i>Lebeckia</i> (6)          | M |   |   |   |
| <i>Lotononis</i> (16)        | M |   |   | M |
| <i>Pearsonia</i> (2)         | M |   |   | M |
| <i>Rafnia</i> (2)            | M |   |   |   |
| <i>Wiborgia</i> (2)          | M |   |   |   |
| <i>Genisteae</i>             |   |   |   |   |
| ( <i>Argyrolobium</i> group) |   |   |   |   |
| <i>Argyrolobium</i> (3)      |   |   |   |   |
| <i>Dichilus</i> (3)          |   |   |   |   |
| <i>Melolobium</i> (3)        |   |   |   |   |
| <i>Polhillia</i> (1)         |   |   |   |   |

Chiffres = nombre d'espèces étudiées entre parenthèses. M = composé présent au sein de la majorité des taxa, S= composé présent uniquement au sein de quelques flavonoides et isoflavones identifiées au sein de *Calobota saharae*.

L'abondance (M) ou la rareté (S) des 4 composés recherchés, 2 flavonoides au sens strict (2-vicénine et butine) et 2 isoflavones (3-hydroxy-daidzéine et orobol), est présentée dans la figure (30).

Il apparait que parmi ces composés, la 2-vicénine est retrouvée dans la majorité des genres de la tribu, dont le genre *Lebeckia*, auquel est rattaché le genre *Calobota*.

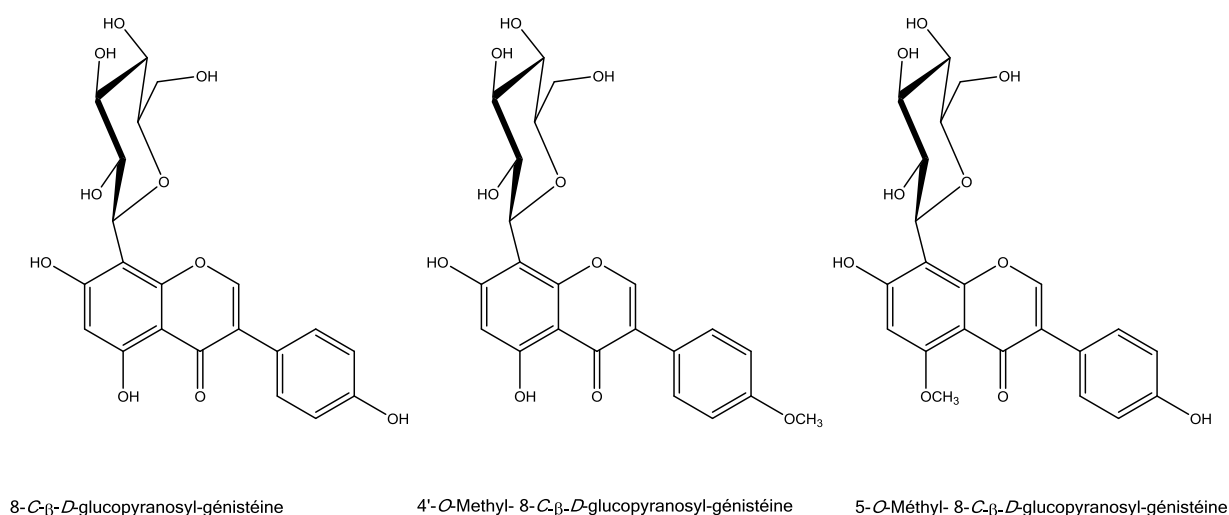


**Figure 30.** Structure des composés flavonoïques au sein du clade des Genistoids (Nysschen *et al.*, 1998)

Ces 4 composés ne sont pas du tout retrouvés au sein de la tribu des Genisteae (De Nysschen, 1998). Il est à noter que la 3-hydroxy-daidzéine n'est pas retrouvée au sein des 2 tribus Crotalariae et Genisteae, alors qu'elle est fréquente dans les autres tribus du clade (Figure.30).

### 2.2.2.3. Distribution des flavonoides et isoflavones chez *Calobota saharae* (*Genista saharae*)

Les travaux ayant porté sur la phytochimie de *Calobota saharae* rapportent la présence de plusieurs isoflavones, de type glucosyl-génistéine, différemment substituées (Figure. 31).



**Figure 31.** Structure des flavonoides et isoflavones chez *Calobota saharae* (Abdelhalim *et al.*, 2000), (Mekkiou *et al.*,2005)

Les travaux d'Abdelhalim *et al.*, ayant porté sur des échantillons lybiens rapportent la présence de 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine et de 4'-O-méthyl-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine au sein de parties aériennes de *Calobota saharae* (*Genista saharae*) (Abdelhalim *et al.* 2000) voir Tableau 10.

**Tableau 10 :** Distribution des flavonoïdes et isoflavones chez *Calobota saharae*

| Flavonoides et isoflavonoides                         | Abdelhalim <i>et al.</i> , 2000          | Mekkiou <i>et al.</i> ,2005 |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                       | Parties aériennes                        | Rameaux                     |
|                                                       | Libye (Tripoli)<br>-Période de floraison | Algérie (BouSaada)<br>Mars  |
| 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine             | +                                        | +                           |
| 4'-O-méthyl-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine | +                                        | -                           |
| 5-O-méthyl-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine  | -                                        | +                           |

Les travaux de Benayache et al quant à eux rapportent la présence toujours de la 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine, *mais décrivent la* 5-O-méthyl- 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine comme seconde isoflavone isolée de rameaux d'échantillons récoltés en Algérie (région de Boussaada) (Mekkiou *et al.*, 2005).

### **Conclusion : flavonoïdes et isoflavones chez *Calobota saharae* (*Genista saharae*)**

Ces données présentent un intérêt d'un point de vue chimiotaxonomiques, puisque la 5-O-méthyl- 8- C-  $\beta$ - D-glucopyranosyl-génistéine est présentée comme marqueur chimio-taxonomique de la tribu des Genisteae au sens strict (Van Wyk, 2003), et n'est pas retrouvée au sein des quelques espèces de la tribu des Crotalarieae étudiées. Les travaux de De Nysschen ne permettent malheureusement pas d'éclaircir ce point car la 5-O-méthyl- 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine n'a pas été recherchée lors de ces travaux. Il mentionne cependant la présence de 2-vicénine, au sein de la majorité des genres de la tribu des Crotalarieae étudiée (De Nysschen *et al.*, 1998). Cette dernière n'a pas été identifiée dans les échantillons de *Calobota saharae* étudiées.

## CHAPITRE III : PROPRIETES BIOLOGIQUES

Nous distinguerons les deux grands groupes de métabolites identifiés chez *Calobota saharae*, à savoir alcaloïdes d'une part et flavonoïdes *largo sensu* incluant les isoflavones d'autre part

### 1. Propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils provoquent cependant chez l'Homme diverses réponses physiologiques comme : des curarisants, d'anesthésiques locaux, et d'anti-tumoraux, ainsi utilisés comme des médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants

A fortes doses, la plupart des alcaloïdes sont très toxiques par contre à faibles doses, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique (Hopkins, 2003). Ces différentes propriétés confèrent aux plantes alcaloïdiques une place de choix dans la pharmacopée tant traditionnelle que moderne compte tenue d'un panel d'activités thérapeutiques.

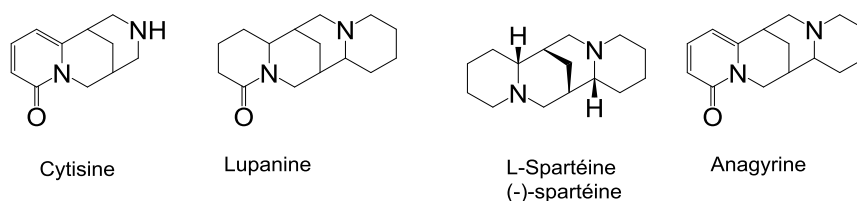
Les alcaloïdes sont des composés qui possèdent une activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons phytopathogènes, elles peuvent inhiber la croissance et le métabolisme des microorganismes (Erdemoglu *et al.*, 2007). Deux groupes d'alcaloïdes ont été identifiés chez *Calobota saharae* :

- Alcaloïdes quinolizidiniques : spartéine, cytisine, lupanine.
- Alcaloïdes pipéridiniques : ammodendrine et dérivés

#### 1.1. Alcaloïdes quinolizidiniques

##### 1.1.1. Activité agoniste nicotinique

Du point de vue pharmacologique, les alcaloïdes quinolizidiniques et surtout la cytisine sont des agonistes des récepteurs nicotiniques. La cytisine a été utilisée pendant une quarantaine d'année comme traitement pour le sevrage tabagique, mais également comme analeptique respiratoire dans l'ancienne union soviétique. Des mentions d'un usage comme diurétique sont également retrouvées. La spartéine quant à elle a été utilisée comme ocytocique et anti-arythmique (Figure 32).



**Figure 32.** Structure des alcaloïdes quinolizidiniques au sein de *Calobota saharae*

Des études récentes ont montré que la cytisine se fixait sur les récepteurs nicotiniques centraux à l'acétylcholine (nAChRs). Des études de liaison de cytisine marquée ( $[^3\text{H}]$ ), ont montré que les zones cérébrales où se fixait la cytisine sont similaires à celles de l'acétylcholine, la nicotine et la méthyl-carbamylcholine. Ce qui la distingue de ces quatre ligands est son affinité plus forte ainsi que le faible taux de liaison sur des sites non spécifiques (Pabreza *et al.*, 1991).

Des études plus précises sur les sous-types de récepteurs nicotiniques  $\alpha 4\text{-}\beta 2$ ,  $\alpha 3\text{-}$  et  $\alpha 7\text{-}$  ont montré que la cytisine présentait une affinité ( $K_i$ ) de 2.4 nM sur un homogénéisat de cerveau de rat, et de 1.5 nM pour le sous-type  $\alpha 4\text{-}\beta 2$ , et 81 nM pour le sous-type  $\alpha 3$ .

Dans cette étude, les affinités de la cytisine, la lupanine, la sparteïne et l'anagyrene a également été évaluée sur homogénéisat de cerveau de porc et donne des affinités respectives de 0.14, 5, 330 et 2096  $\mu\text{M}$  (Biodo *et al.*, 2003).

### 1.1.2. Toxicité des alcaloïdes quinolizidiniques

L'activité marquée des alcaloïdes quinolizidiniques sur les récepteurs nicotiniques est associée à une toxicité élevée de ces composés, qui est du même ordre que celle de la nicotine. Les signes de l'intoxication par ces alcaloïdes sont des sensations de brûlures de la bouche, hypersialorrhée, nausées et vomissements, suivis de signes d'atteinte du système nerveux central : délire, confusions, voire convulsions et paralysie respiratoire.

Les intoxications chez l'Homme sont liées à l'ingestion de fruits de Cytise (*Laburnum anagyroides*) par de jeunes enfants, voire par confusion avec des fleurs de Robinier traditionnellement consommées en beignets (Bruneton, 2005)

Des études toxicologiques comparatives réalisées avec la lupanine, la lupinine, la sparteïne, la spathulatine et l'hydroxylupanine chez le Cobaye ont montré que les signes d'intoxications de la sparteïne différaient des autres alcaloïdes (dépression du SNC et paralysie), et se manifestaient surtout par des effets de type tremblements musculaires. Par ailleurs, des études toxicologiques chez les rats menés avec la sparteïne ont démontré des signes cardiovasculaires marqués, notamment bradycardie et hypotension marquée (Couch, 1926).

## **1.2. Alcaloïdes pipéridiniques : ammodendrine et N-acétylhystrine.**

L'ammmodendrine n'a pas d'usages en thérapeutiques. Néanmoins sa forte affinité pour les récepteurs nicotiniques est responsable d'une forte toxicité, et notamment de tératogénicité chez le bétail. La tératogénicité de l'ammmodendrine a été mise en évidence des intoxications d'animaux suite à l'ingestion de Lupins (Panter *et al.*, 1998). Ce type de toxicité est d'ailleurs existant également pour d'autres agonistes nicotiniques (anabaséine, anabasine, ou encore coniine).

L'ammmodendrine est un agoniste partiel des récepteurs centraux à l'acétylcholine (nAChRs) avec une EC<sub>50</sub> de 500µM sur cellules de type TE-671. La dose létale à 50% a été déterminée sur un modèle de souris a été fixée à 94-134 mg/Kg (Green *et al.*, 2012).

La N-acétylhystrine présente le même type de toxicité. Sa DL50 n'a cependant pas pu être déterminée compte-tenu de son instabilité.

## **1.3. Alcaloïdes quinolizidiniques : nouvelles perspectives thérapeutiques**

### **1.3.1. Développement de ligands nicotiniques**

Les récepteurs nicotiniques sont des cibles thérapeutiques intéressantes dans le domaine des pathologies du système nerveux central, notamment dépression, maladies neurodégénératives, voire sevrage tabagique

On peut citer le développement de dérivés de la cytosine par l'équipe de Sparatore et al. évalués pour leur affinité sur les récepteurs  $\alpha 4\text{-}\beta 2$  et  $\alpha 3$  (Boido *et al.*, 2003).

### **1.3.2. Action sur le virus Influenza A**

Des études de criblage ont montré que l'alpérine, un alcaloïde quinolizidiniques isolé de Sophora présente une activité antivirale intéressante sur le virus Influenza A (EC<sub>50</sub> 14.5 µM versus 0.71 µM pour la nucleozine, composé antiviral de référence utilisé). De ce fait, d'autres alcaloïdes quinolizidiniques ont été évalués pour cette activité : cytosine, (+) et (-) spartéine, matrine et oxomatrine, ainsi que des analogues synthétiques.

Les résultats ont montré que les (+) et (-) spartéine présentaient une activité antivirale intéressante (19.7 et 21.3 µM respectivement (Dang *et al.*, 2014).

## **2. Propriétés des flavonoïdes**

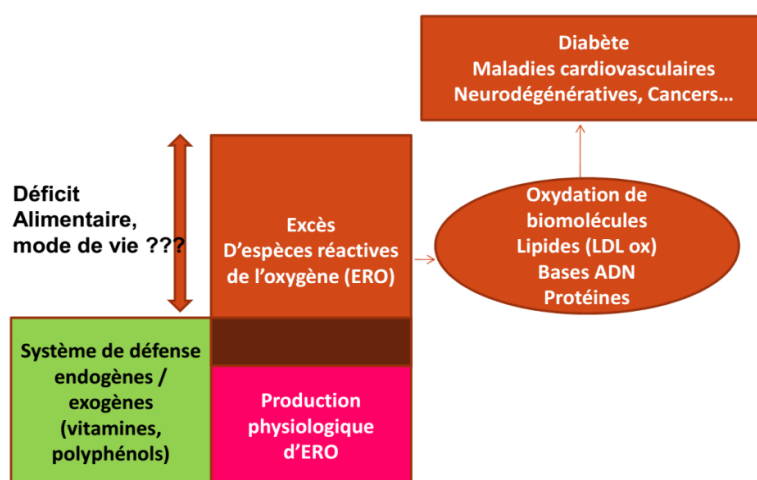
Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal. Ce sont entre autres des molécules de défense contre les organismes pathogènes, certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Ils sont très largement consommés à travers

les fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé. Dans les pays occidentaux on estime les apports en flavonoïdes au sens large à 0,8 g par jour en aglycone (forme non glycosylée) (Stoclet, et Schini-Kerth. 2011).

Leurs propriétés biologiques sont très variées. D'un point de vue historique, ce sont leurs propriétés veinotoniques qui ont été découvertes en premier. C'est le biochimiste Szent Gyorgyi qui a découvert leur effet sur la perméabilité membranaire qu'il a dénommé propriété vitaminique P. Par la suite, de nombreuses recherches ont mis en évidence leurs propriétés antioxydantes, antiinflammatoires etc.... (Ghedira ,2005).

## 2.1. Propriétés antioxydantes

Les flavonoïdes présentent des activités anti oxydantes. Ces propriétés impliquent une diminution de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène in vivo. De nombreux travaux datant de ces dernières décennies ont montré en effet l'effet délétère d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), également appelé « stress oxydant ». Cet excès pouvant être lié à une surproduction endogène ou bien à un déficit de système de défense visant à éliminer ces ERO, il peut être responsable du développement de pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives etc ... (Boutefnouchet.2016-2017) voir (Figure.33).

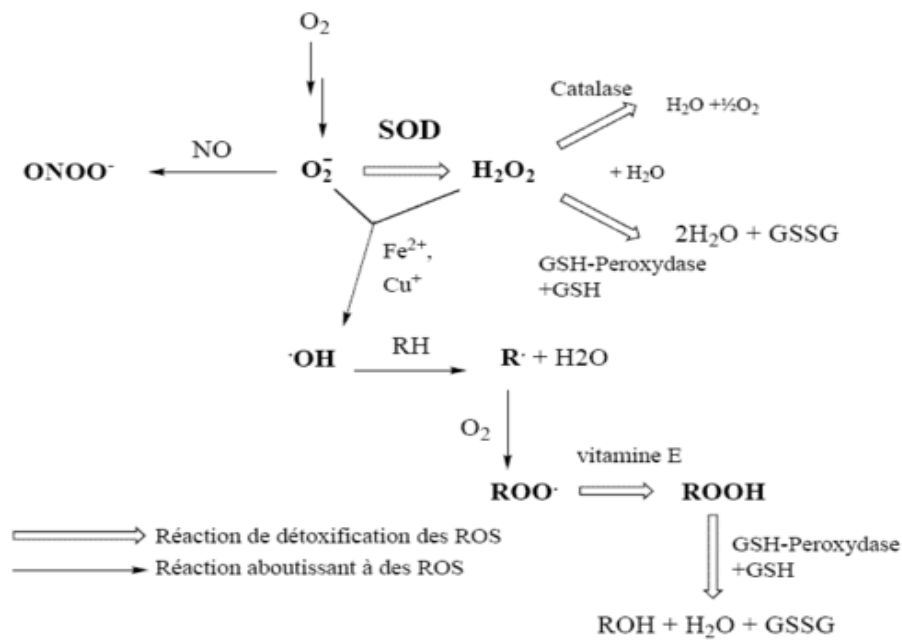


**Figure 33.** Physiopathologie du stress oxydant (Boutefnouchet 2016-2017)

Parmi ces ERO, le radical hydroxyle (HO.) est l'espèce réactive la plus nuisible (Favier, 2006), (Beaudeau *et al.*,2006). Les systèmes de défense de l'organisme sont soit des systèmes enzymatiques (SOD : superoxyde-dismutase, GSH-peroxydase : Glutathion peroxydase, catalase), soit des antioxydants exogènes : vitamines (C, E), polyphénols (flavonoïdes, acides-



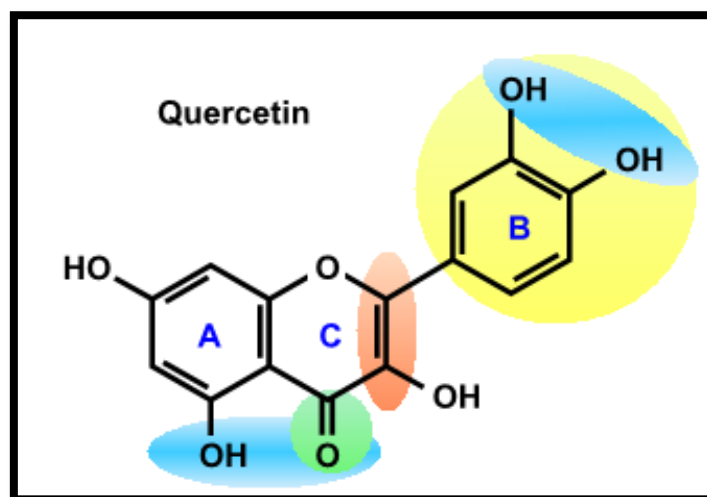
phénols etc...), caroténoïdes (carotène, lycopène, lutéine etc...) (Figure.34).



**Figure 34. Schéma** des principales espèces réactives de l'oxygène

De nombreuses études de relation structure-activité ont montré que les propriétés antioxydantes des flavonoïdes étaient liées à la présence :

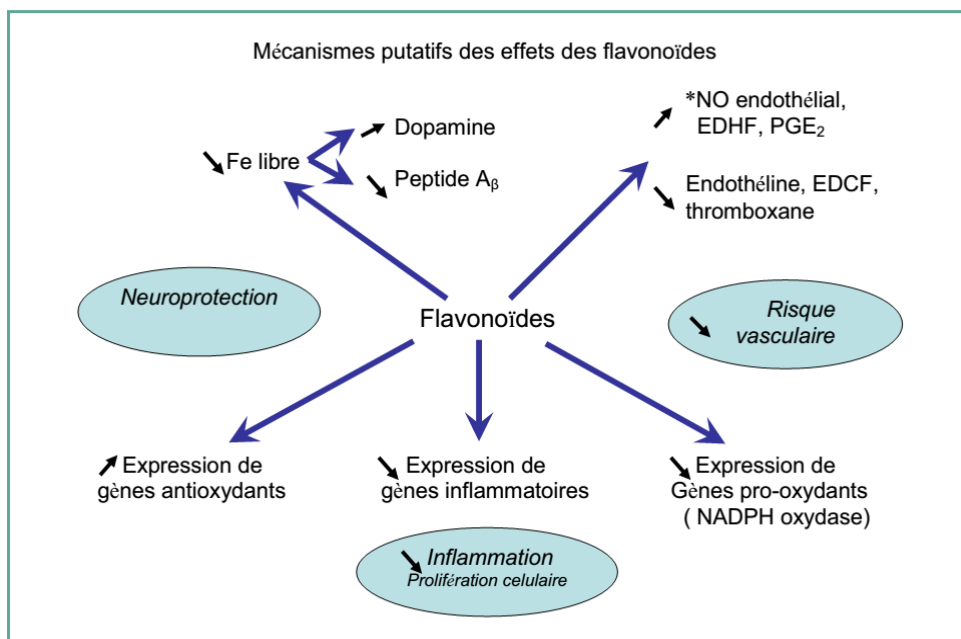
- De groupement phénols en position 3' et 4' sur le cycle B
- D'un groupement phénolique sur la position 5 (cycle A) adjacente à la fonction cétone en position 4 du cycle C (Figure.35).



**Figure 35. Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes (quercetine)**

Ces éléments permettent la chélation d'ions métalliques impliqués dans la formation des

espèces réactives de l'oxygène, notamment le fer (Figure 36). Par ailleurs, les flavonoides agissent sur le système vasculaire en augmentant la production de NO endothélial, ce qui entraîne une relaxation vasculaire bénéfique en cas de maladies cardiovasculaires, notamment hypertension artérielle. Tous ces éléments ont poussé à encourager la consommation de flavonoides en prévention de certaines pathologies attribuées à un « stress oxydant » (Stoclet et Schini-Kerth. 2011).



**Figure 36.** Mécanismes d'action des flavonoïdes (Stoclet et Schini-Kerth ,2011)

## 2.2. Activité anti-inflammatoire

Les flavonoides peuvent inhiber à la fois les cyclooxygénases et les lipooxygénases, ce qui peut contribuer à leurs propriétés antiinflammatoires. Par ailleurs, les propriétés anti radicalaires, antioxydantes peuvent également contribuer à ces propriétés. L'effet anti-inflammatoire des flavonoides a été confirmé sur plusieurs modèles animaux d'inflammation, tel que l'œdème induit par les carraghénanes, le granulome induit par une boulette de coton, oedèmes induits par le xylène etc...Rotelli et al. ont montré que selon le type de modèle d'inflammation, la structure du flavonoides donnait des résultats différents, certains agissant plutôt sur les modèles d'oedèmes induits aux carraghénanes, rapprochés des inflammations de type arthrites, d'autres aux oedèmes induits par le xylène, rapprochés des états inflammatoires neuronaux (Rotelli *et al.*, 2003).

### 2.3. Activité anti-allergique

L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant ces mastocytes. Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et les cytokines pro-inflammatoires.

Des études épidémiologiques ont montré que l'incidence des allergies était diminuée chez les personnes ayant des apports en flavonoïdes alimentaires élevés.

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Kawai *et al.*, 2007). Les flavonoïdes, en particulier la lutéoline, l'apigénine et la fisétine inhibent la libération d'histamine, et l'expression d'IL-4, IL-13 et l'expression du ligand au récepteur CD-40 par les mastocytes et les basophiles.

Le mécanisme proposé est celui de l'inhibition de l'activation de certains facteurs de transcription tels que AP-1 et NFAT-3.

L'évaluation de cet effet antiallergique *in vivo* se fait sur des modèles de dermatites chez la souris NC/NGa, chez l'homme elle se fait chez des patients atteints de dermatite atopique (Kawai *et al.*, 2007).

### 2.4. Effet sur le système cardiovasculaire

Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation (Salvamani *et al.*, 2014).

Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ERO (Liu *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes inhiberaient l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et possèderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (Mladenka *et al.*, 2010).

## **2.5. Activité chimiopréventive**

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes (Galleano *et al.*, 2012).

## **2.6. Activité anti-ulcéreuse**

Dans des expériences réalisées sur des rats, la quercétine et la naringénine ont montré un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production de mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotriènes (Di Carlo *et al.*, 1999).

## **2.7. Les flavonoïdes : inhibiteurs d'enzymes ?**

De par leur structure proche de celles d'un grand nombre de substrats biologiques, les flavonoïdes sont inhibiteurs de nombreuses enzymes, telles que des hydrolases, des oxydoréductases, des ADN synthétases, ARN polymérases, phosphatases, protéines phosphokinases, oxygénase et mono-amines oxydases.

Il ne ressort pas de relation structure-activité particulière sur telle ou telle famille d'enzymes, les flavonoïdes pouvant se comporter en inhibiteur compétitif ou parfois allostériques. Parfois, les flavonoïdes vont interférer avec l'état de transition de l'enzyme, c'est le cas notamment des interactions observées avec les oxydo-réductases. Les flavonoïdes peuvent en effet intercepter un radical intermédiaire. Concernant les cyclooxygénases, les flavonoïdes ne forment pas de liaison covalente avec le site actif de l'enzyme comme le fait l'aspirine par exemple, mais exercerait simplement un encombrement stérique empêchant l'acide arachidonique de venir se fixer à l'enzyme.

Le fait qu'ils soient peu solubles et donc probablement jamais à des concentrations équivalentes à celle des substrats fait que ces effets enzymatiques n'ont pas de retentissements biologiques majeurs *in vivo*. Les travaux rapportant ces activités étant essentiellement des études *in vitro* (Havsteen, 2002).

### 3. Propriétés spécifiques aux isoflavonoïdes

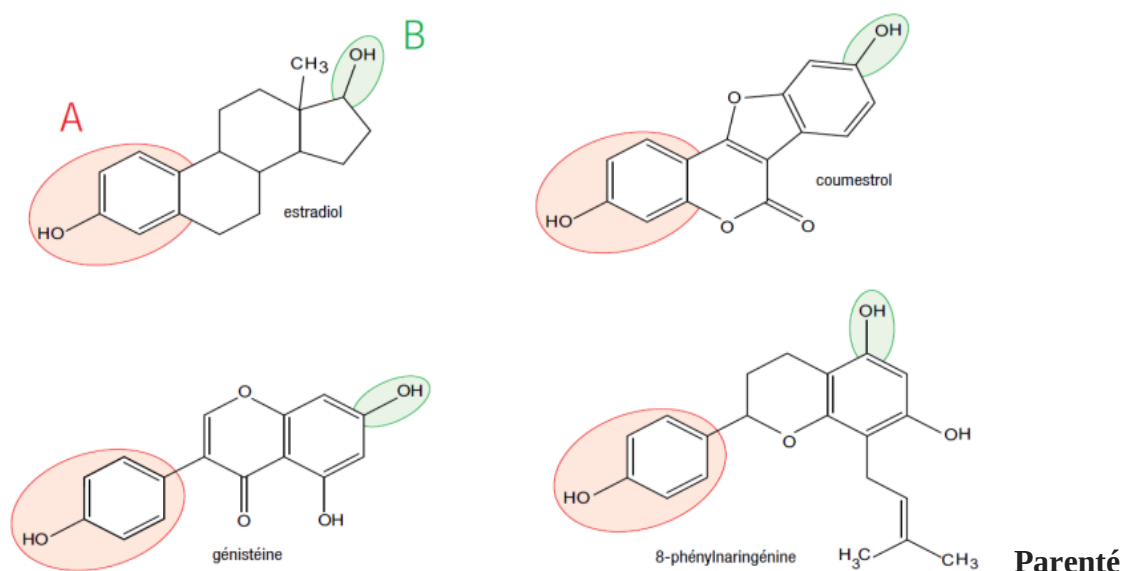
Dans les travaux portant sur l'activité antioxydante des flavonoïdes, ces derniers sont considérés au sens large et ces propriétés incluent également les isoflavones.

#### 3.1. Propriétés phytoestrogéniques

Des travaux plus spécifiques sur l'activité phytoestrogéniques des isoflavones sont très nombreux. Leur structure est proche de celle de l'oestradiol et exercent donc des effets oestrogéniques (Figure.37).

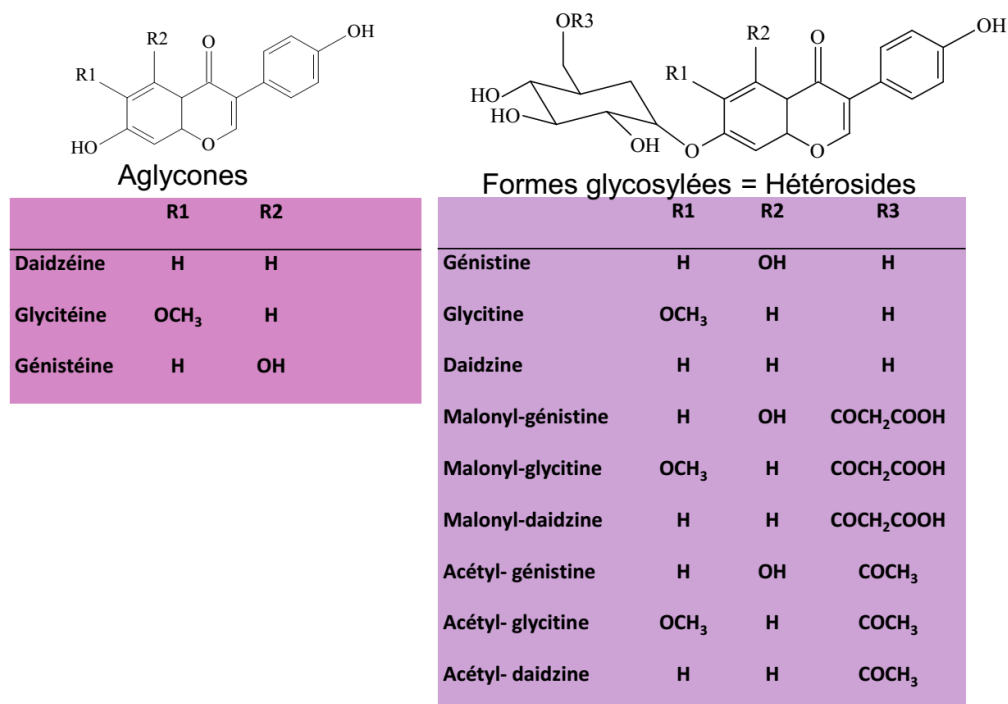
Les principaux isoflavonoïdes présentant des propriétés phytoestrogéniques sont la biochanine A, la daidzéine, formononétine, glycitéine, génistéine, qui sont présentes dans le soja, les trèfles, les pois chiches, l'orge, le seigle, les arachides (Zhang *et al.*, 2010).

Ce sont les phytoestrogènes les plus étudiés.



**Figure 37.** Schéma structurale entre plusieurs types de phytoestrogènes et l'oestradiol

Ils peuvent exister sous forme de glucosides ou aglycones (Figure.38), les glucosides étant facilement hydrolysé dans l'intestin en aglycones (Kiuper *et al.*, 1998).



**Figure 38.** Structure des isoflavones de soja

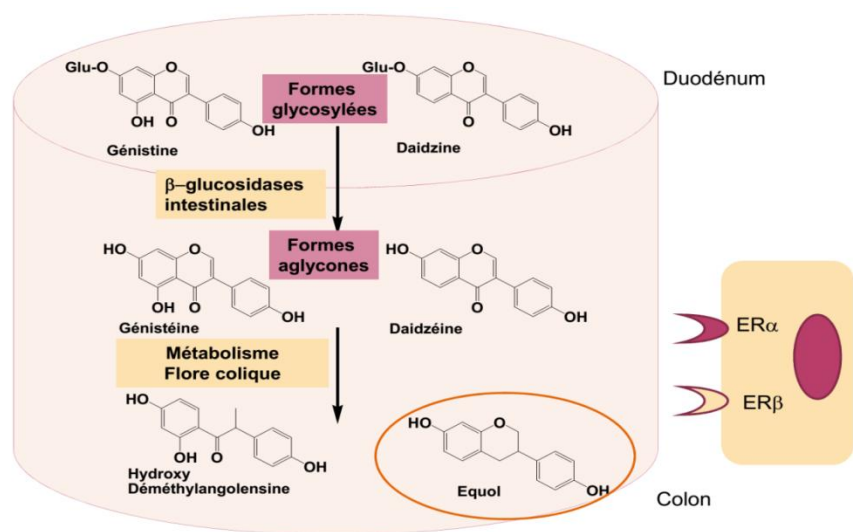
L'affinité aux récepteurs oestrogéniques de plusieurs isoflavones a été évaluée sur les récepteurs ERα et ERβ de rat (Tableau11).

**Tableau 11.** Affinités des récepteurs ostrogéniques (Kuiper *et al.*, 1998)

| Composé                   | ER-α<br>(K nM) | ER-β (K<br>nM) |
|---------------------------|----------------|----------------|
| <b>Oestradiol</b>         | 0.04           | 0.11           |
| <b>Raloxifène (SERM)</b>  | 0.52           | 20.2           |
| <b>Diéthylstilbestrol</b> | 0.04           | 0.05           |
| <b>Génistéine</b>         | 126            | 12.8           |
| <b>Naringénine</b>        | 400            | 100            |
| <b>Quercétine</b>         | 400            | 100            |
| <b>S-Equol</b>            | -              | 0.73           |

Les aglycones sont facilement transportés à travers les cellules épithéliales intestinales (Cornwell *et al.*, 2004). La daidzéine et la génistéine peuvent en plus être réduite en équol, par les bactéries de la flore intestinale (Setchell. et Cassidy, 1999) (Figure.39).

L'équol présente une affinité très supérieure pour les récepteurs oestrogéniques, essentiellement les récepteurs ERERβ (Kuiper *et al.*, 1998).



**Figure 39.** Hydrolyse des hétérosides d'isoflavones de soja dans l'intestin et formation d'équol (Setchell. et Cassidy, 1999)

Les propriétés phytoestrogéniques des isoflavones ont été évaluées chez des femmes ménopausées souffrant de symptômes de type bouffées de chaleur et ostéoporose, qui ont pu observer une amélioration de leurs symptômes.

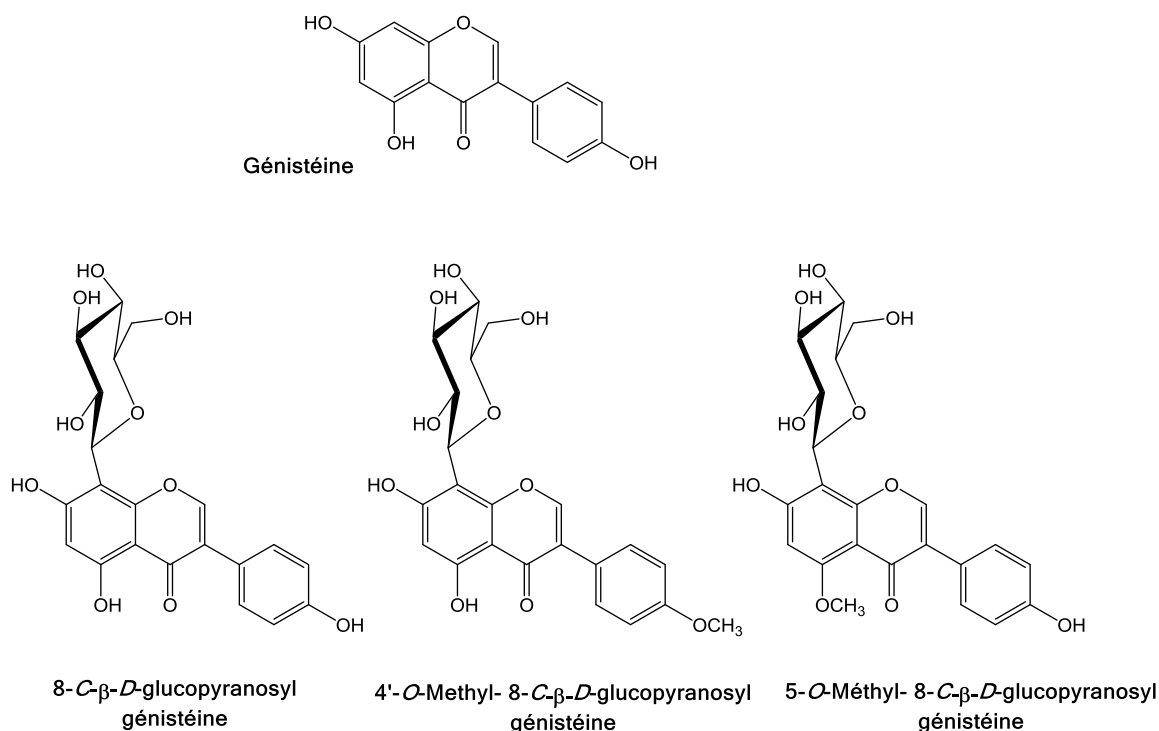
Dans le même sens, les cellules impliquées dans le remodelage osseux étant étroitement régulées par de nombreux facteurs hormonaux, les phytoestrogènes pourraient donc avoir un effet contre l'ostéoporose (Cornwell *et al.*, 2004).

Au niveau de la remodelation osseuse, la 8-prénylgénistéine et la 6,8 diprénylgénistéine peuvent stimuler la croissance des cellules ostéoblastiques, la différenciation des ostéoblastes et la déposition minérale de la matrice extracellulaire. A l'inverse une prénylation en 6 ne peut que supprimer la prolifération et la maturation des ostéoblastes, mais ne possède aucun effet sur les fonctions des cellules ostéoblastiques (différenciation cellulaire et minéralisation de la matrice extracellulaire) (Zhou *et al.*, 2008).

### 3.2. Autres propriétés de la génistéine et ses dérivés glycosylés

En plus des nombreux travaux portant sur les propriétés oestrogéniques des isoflavones, portant majoritairement sur la génistéine et des dérivés, d'autres propriétés ont été mises en évidence telles que les propriétés antioxydantes, antitumorales, cardioprotectrices et antivirales.

Les isoflavones identifiées au sein de *Calobatoa saharae* incluent des dérivés de la génistéine et notamment des dérivés C-glycosylés : la 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine, 4'-O-méthyl-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine et 5-O-méthyl- 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine. Nous présenterons donc de manière plus détaillée ces autres propriétés de la génistéine et de ses dérivés glycosylés (Figure 40).



**Figure 40.** Structure moléculaire de la génistéine (à gauche) et du 17 $\beta$ -oestradiol (à droite)

### 3.3. Propriétés antioxydantes de la génistéine et ses dérivés

#### - Génistéine

L'activité antioxydante de la génistéine a été évaluée sur différents modèles *in vitro*. Il a été montré qu'elle pouvait inhiber la peroxydation lipidique induite par les UV-A, UV-B et le radical peroxyde ainsi que d'autres systèmes de peroxydation tels que le peroxyde d'hydrogène, la metmyoglobine peroxydase ou bien la peroxydation des liposomes induite par l'association Fer/ascorbate, mais de manière moins importante. Elle ne semble pas montrer une activité de chélation du fer (Record *et al.*, 1995).

Par ailleurs la génistéine est capable d'inhiber l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, induite par le stress oxydant, au niveau de macrophages et de l'intima (Choi *et al.*, 2003). Il a également été montré que la génistéine est capable d'induire l'expression de la glutathion peroxydase au niveau de cellules des lignées de cancer du côlon LNCaP et PC3 (Suzuki *et al.*, 2002).



D'un point de vue mécanistique, il est intéressant de noter que la génistéine et la daidzéine ont été modifiées par des neutrophiles soumis à un stress oxydant induit par des esters de phorbol, et transformés en dérivés nitrés et chlorés en présence de myéloperoxydase, présentant également une forte activité antioxydante (Brenda *et al.*, 2003).

Enfin, il a été montré que la supplémentation de sujets sains par des mélanges d'isoflavones de soja apportant génistéine et daidzéine pouvait protéger l'ADN des dommages induits par le stress oxydant (oxydation des bases de l'ADN, cassure des brins d'ADN). De plus, la supplémentation en lait de soja (1 litre par jour) a permis d'observer moins de dommages liés au stress oxydant sur les bases pyrimidiques de l'ADN des volontaires que ceux ayant pris du lait de vache.

Il faut également noter que des cassures de brins d'ADN ont été potentialisés par la génistéine sur des cellules de cancer du côlon HT29 clone 19A à faible concentration (12.2-100 mM), ce qui n'a pas été observés chez des cellules saines de côlon soumises à des concentrations de génistéine de 100 mM (Zobel *et al.*, 2000).

#### - ***8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (C8CG)***

Les dérivés C-glycosylés de la génistéine ont été peu étudiés. Cependant, Rucinska *et al.* Rapporte l'effet protecteur de la C8CG vis-à-vis des dommages de l'ADN induits par un stress oxydant. En effet, des fibroblastes d'embryons de souris NIH-3T3 ont été pré-incubés avec de la C8CG exposés au peroxyde d'hydrogène. Le pré-traitement a permis de réduire de manière significative les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène (Rucinska and Gabryelak .2009).

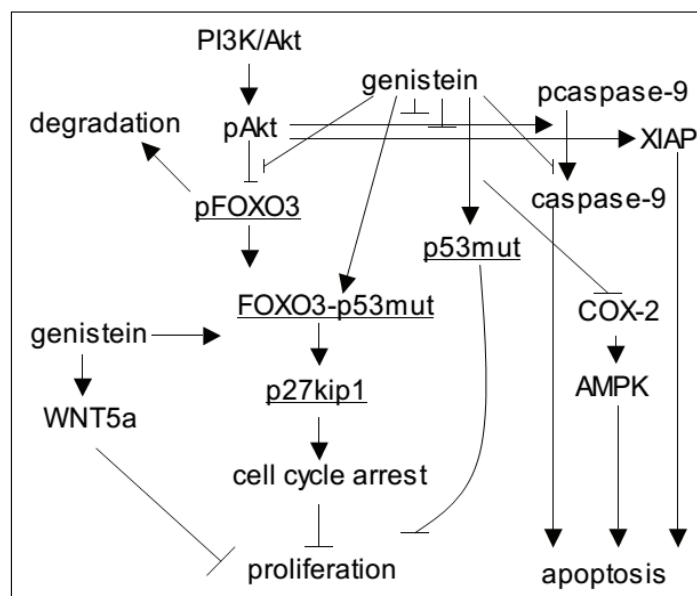
### **3.4. Propriétés antitumorales de la génistéine et ses dérivés**

Les phytoestrogènes posséderaient une action bénéfique sur plusieurs autres types de cancers de la prostate du testicule (Zhou *et al.*, 2008), du colon, de la thyroïde, de la vessie et de l'endomètre (Cornwell *et al.*, 2004). De nombreuses études *in vitro* suggèrent que les isoflavones, en particulier la génistéine, ont un potentiel chimiopréventif et chimiothérapeutique dans de multiples types de tumeurs (Rusinka *et al.*, 2007).

#### - ***Génistéine***

Il est postulé que les propriétés antitumorales de la génistéine découlent de ses propriétés antioxydantes. En effet, il a été mentionné que la génistéine pouvait limiter les effets du stress

oxydant sur l'activation du NF- $\kappa$ B, impliqué dans l'activation de nombreuses voies. La génistéine inhibe la prolifération de cellules de cancer de côlon HT29 en atténuant l'effet de l'EGF sur l'activité du suppresseur de tumeur FOXO3. En effet, l'EGF stimule la prolifération des cellules cancéreuses (Qi. *et al.*, 2011) (Figure 41).



**Figure 41.** Mécanismes impliqués dans l'activité antitumorale de la génistéine(Qi.*et al.*,2011)

#### - 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (C8CG)

Kataryzyna et al. ont évalué l'effet de la génistéine, de la 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (C8CG) Et de l'association (génistéine + 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (C8CG)) sur la lignée de cancer ovarien SK-OV-3. A faibles concentrations ( $<10\mu\text{M}$ ), il n'a pas été observé de prolifération cellulaire. A plus fortes doses, la génistéine a entraîné une diminution de la prolifération cellulaire. La génistéine et la C8CG ont induit l'apoptose de manière dose-dépendante (50-90 $\mu\text{M}$ ). Les auteurs ont observé que l'association génistéine + C8CG est plus efficace que la génistéine seule. Il a également été observé que la génistéine et la C8CG augmentait la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules cancéreuses ce qui pouvait induire le mécanisme d'apoptose. Une dépolarisation de la membrane mitochondriale a également été observé (Antosiak *et al.*, 2016).

Cependant la génistéine possède des effets suppressifs à la fois sur le milieu cellulaire et sur les composants humoraux du système immunitaire adaptatif (Ganai and Farooqi ,2015).

La génistéine réduit le nombre de thymocytes CD4 + et CD8 + disponibles suggérant un mécanisme possible pour effets de la génistéine sur l'immunité à médiation cellulaire (Ganai and Farooqi ,2015).

### **3.5. Propriétés antivirales de la génistéine et ses dérivés**

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...) à des concentrations variant de 3.7 à 370  $\mu$ M (Andres *et al.*, 2009).

## **4. Toxicité des flavonoïdes**

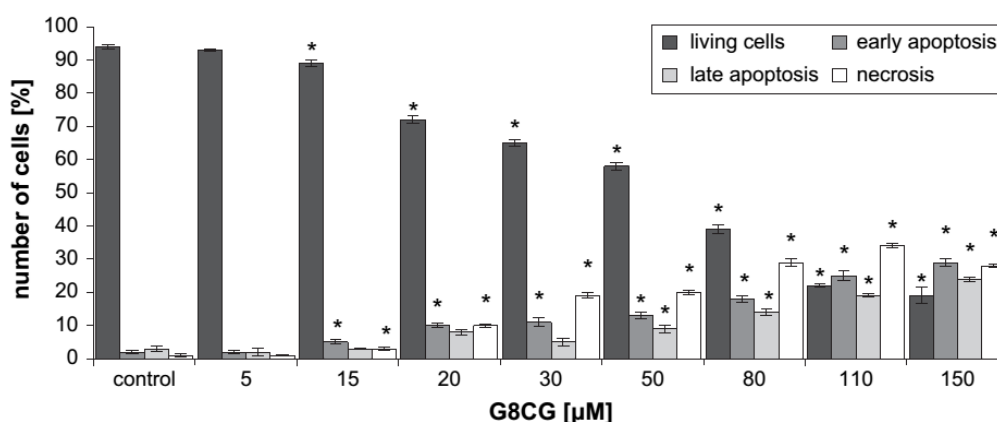
Les premières études de ces composés ont étudié leur activité mutagène et génotoxique dans un certain nombre de tests *in vitro*. Récemment, un intérêt renouvelé pour les flavonoïdes a été alimenté par les effets antioxydants et œstrogènes qui leur sont attribués (agents anticancéreux et cardioprotecteurs) entraînant une augmentation spectaculaire de leur consommation en tant que suppléments diététiques.

Malheureusement, les effets potentiellement toxiques de l'apport excessif de flavonoïdes sont largement ignorés. À des doses plus élevées, ils peuvent agir comme des mutagènes, des pro-oxydants qui génèrent des radicaux libres et comme inhibiteurs des enzymes clés impliquées dans le métabolisme hormonal. Ainsi, à fortes doses, les effets indésirables des flavonoïdes peuvent l'emporter sur leurs effets bénéfiques (régime végétarien typique). Les flavonoïdes traversent facilement le placenta. D'autres recherches sur les propriétés toxicologiques des flavonoïdes sont justifiées compte tenu de leur niveau de consommation croissant (Skibola and Smith ,2000).

Les effets cytotoxiques et génotoxiques de la C8CG ont été évalués sur la lignée de cellules ovariennes CHO en utilisant la méthode au MTT et le test des comètes pour évaluer les dommages de l'ADN. De plus, le niveau d'espèces réactives de l'oxygène a également été évalué.

L'étude a montré qu'à des concentrations supérieures à 10 $\mu$ M, la C8CG diminuait la viabilité cellulaire, induisait l'apoptose et une atteinte de l'ADN alors qu'à faibles

concentration (5 et 7.5  $\mu\text{M}$ ), la C8CG ne montrait aucune activité génotoxique ni cytotoxique, mais présentait un effet antioxydant (Rucinska *et al.*, 2007) (Figure. 42).



**Figure 42.** Effet de la C8CG sur la viabilité cellulaire et sur l'apoptose (Rucinska., *et al* 2007)

**4.1. Interactions hormonales :** L'interaction des phyto-estrogènes avec la synthèse des hormones thyroïdiennes impose l'exclusion de leur consommation sous quelle que forme que ce soit par les sujets hypothyroïdiens traités ou non traités. Il existe aussi des risques d'interaction avec d'autres traitements hormonaux (par ex : tamoxifène) pouvant exacerber ou neutraliser ces traitements. La consommation de phyto-estrogènes devrait être également évitée dans ces situations (Berta *et al.*, 2005).

**4.2. Maturation des organes sexuels :** Les études animales montrent que les phases précoces du développement des organes sexuels (pendant la gestation et la lactation) sont particulièrement sensibles à l'exposition aux phyto-estrogènes.

Des anomalies morphologiques pouvant entraîner une diminution de la fertilité mais aussi une plus grande sensibilité aux carcinogènes sont observées. Une précaution importante apparaît donc d'éviter chez la femme enceinte et allaitante une consommation élevée d'isoflavones, notamment sous la forme de compléments alimentaires. De même, la consommation de produits à base de soja chez le nourrisson (préparations à base de protéines de soja, puis préparations de suite) et l'enfant en bas âge (tonus, yaourts au soja) est à éviter (Berta *et al.*, 2005).

## **Partie II**

### **Matériel et Méthodes**

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

### **1. Méthodes d'étude botanique**

#### **1.1. Reconnaissance et récolte du matériel végétal**

La reconnaissance du matériel végétal utilisé a été faite sur la base des caractères morphologiques cités dans la flore de Maire (1952-1987).

Le matériel biologique est récolté au niveau d'une principale station dans laquelle existe une population importante du genêt saharien (*Genista saharae* Coss. et Dur.). Cette station est située au niveau du cordon dunaire de Boussaâda au sein même du lit majeur de l'Oued Maïter.

Les organes suivants ont été récoltés selon l'état phénologique de la plante : organes végétatifs (racines et rameaux) et organes reproducteurs (fleurs et fruits). Tous ces organes de la plante sont séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière pour le dosage d'azote et l'extraction des alcaloïdes et les polyphénols ; les échantillons frais (sont utilisées pour les mesures biométriques pourtant sur les feuilles et les fruits mures (gousses).

#### **1.2. Méthodes d'études biométrique et analyse biologique**

Définie comme l'étude des caractères dimensionnels des êtres vivants, la biométrie désigne la science des diverses formes de variations observables chez les êtres vivants. Dans le cadre du travail envisagé, il a été jugé utile d'évaluer les diverses formes de variations relatives à la taille (longueur et largeur) des feuilles, à la taille (longueur et largeur) des fruits du genêt saharien.

Cet objectif a été retenu du fait de l'importance biologique de la plante (espèce endémique) et de la difficulté à déterminer ce genêt sur le plan morphologique. L'objectif consiste à évaluer, pour les caractères cités, les intra-variations en vue de préciser si ces caractères oscillent autour d'une moyenne, selon une marge qui est particulière. Cette approche a été retenue dans le but de préciser la reconnaissance de cette espèce, en utilisant les caractères morphologiques les plus accessibles : feuilles, fleurs et fruits.

La démarche est la suivante : la longueur et la largeur de 50 feuilles d'un même individu ont été mesurées. La taille (longueur et largeur) et le nombre de graines par fruit (gousse) ont été évalués en prenant en compte 50 échantillons.

## **2. Analyse physico-chimique**

### **2.1. Analyse pédologique**

En vue de caractériser l'autoécologie de *Calobota saharae*, un profil de sol a été réalisé. Des échantillons de 500 g du sol sont prélevés à différentes profondeurs (en surface, à 20 cm et à 156 cm) et en différentes périodes (mars, avril). Ces échantillons, récoltés selon la démarche la plus proche possible des racines d'un individu de genêt saharien, (planche 3) sont mis en sachets plastiques stériles hermétiques, fermés puis étiquetés et conservés au réfrigérateur. L'analyse physico-chimique des échantillons a été réalisée au laboratoire de pédologie (Université Mentouri de Constantine, Laboratoire du Professeur RACHED Oualida).

En vue de caractériser sur le plan édaphique les principaux facteurs de développement du genêt saharien, il a été jugé utile de réaliser une analyse pédologique portant sur les variables suivantes :

- pH
- Granulométrie
- Matière organique et Azote total
- Conductibilité Electrique (CE)
- Calcaire total et calcaire actif
- Phosphore assimilable et Potassium

Pour réaliser ces analyses, les techniques de dosage des variables prises en compte sont extraites des traités habituels de pédologie.

### **2.2. Dosage de l'azote total de la partie aérienne de la plante**

L'objectif de cette étude concerne la biodiversité et ses relations avec les ressources phytogénétiques notamment la richesse en substances bio-actives et particulièrement les alcaloïdes, substances biologiques très importantes dans le domaine de la thérapeutique.

Le dosage de l'azote total de la partie aérienne de la plante (Racines, rameaux, fleurs, péricarpe de la gousse, graines) a été fait au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de la wilaya de Sétif. Ce dosage est réalisé par la méthode KJELDAHL déjà utilisée dans le cadre des analyses pédologiques.

La détermination de l'azote d'un milieu protidique permet de connaître la proportion de protéines de ce milieu. La méthode utilisée est celle décrite par Kjeldahl en 1883. On utilise le coefficient 6.25 pour passer de l'azote total aux protéines.

Le dosage s'effectue en deux temps :

- La matière organique est attaquée par l'acide sulfurique concentré, et en présence de catalyseur (catalyseur : 91%  $\text{K}_2\text{SO}_4$  + 9%  $\text{CuSO}_4$ ) l'azote passe à l'état d'ion ammonium (c'est la minéralisation);
- L'ammoniaque est déplacée par la soude, base plus forte. Par chauffage, elle distille avec l'eau. L'ammoniaque est recueillie dans la solution d'acide borique et dosée par une solution d'acide sulfurique diluée et de titre bien connu

On procède aux calculs des résultats comme suit :

$$\%N = \frac{0.014}{PE} \frac{0.1 (V_2 - V_1)}{10}$$

Avec PE : masse de prise d'essai en gramme

$V_2$  : volume d'HCl à partir du quel l'indicateur vire du vert au rose

$V_1$  : volume d'HCl utilisé pour le dosage blanc

0.1 = Titre de la solution d'acide chlorhydrique

0.014 = poids molaire de l'azote  $10^{-3}$

$$\%P = \%N \times 6.25$$

Avec : 6.25 = Facteur de Conversion

%N = Pourcentage d'azote

%P = pourcentage de Protéine totale

### 3.Méthodes Phytochimiques

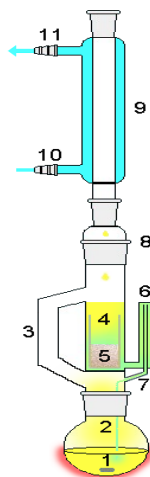
#### 3.1. Méthodes d'extraction

##### 3.1.1. Extraction au Soxhlet

Cet appareil permet une extraction en continu. Le solvant chauffé (1-2) traverse la tubulure latérale à l'état de vapeur (3) pour être refroidi par le réfrigérant (9). Le solvant refroidi traverse alors le corps de l'appareil de Soxhlet (4) qui contient une cartouche avec la poudre de plante extraite (5). L'extrait obtenu s'accumule dans le corps du soxhlet, puis après avoir atteint le niveau du siphon (6), retombe dans le ballon (1). Le solvant continue alors à être chauffé et le cycle recommence. Cela permet d'extraire par du solvant 'neuf' la cartouche de plante, l'extrait se concentrant dans le ballon au fur et à mesure (Figure.43).

Cette méthode d'extraction a été réalisée pour le dosage des alcaloïdes totaux et pour le dosage des polyphénols totaux.





**Figure 43.** Schéma d'un extracteur Soxhlet

1: Agitateur ,2: ballon ,3: Circuit de distillation, 4: cartouche, 5: Solide , 6: Siphon, 7: sorti du Siphon 8: Adaptateur d'expansion, 9: Condenseur ,10: entrée de l'eau de refroidissement , 11 : sorti de l'eau de refroidissement.

### 3.1.2. Extraction des alcaloïdes :

#### 3.1.2.1. Extraction pour le dosage des alcaloïdes totaux

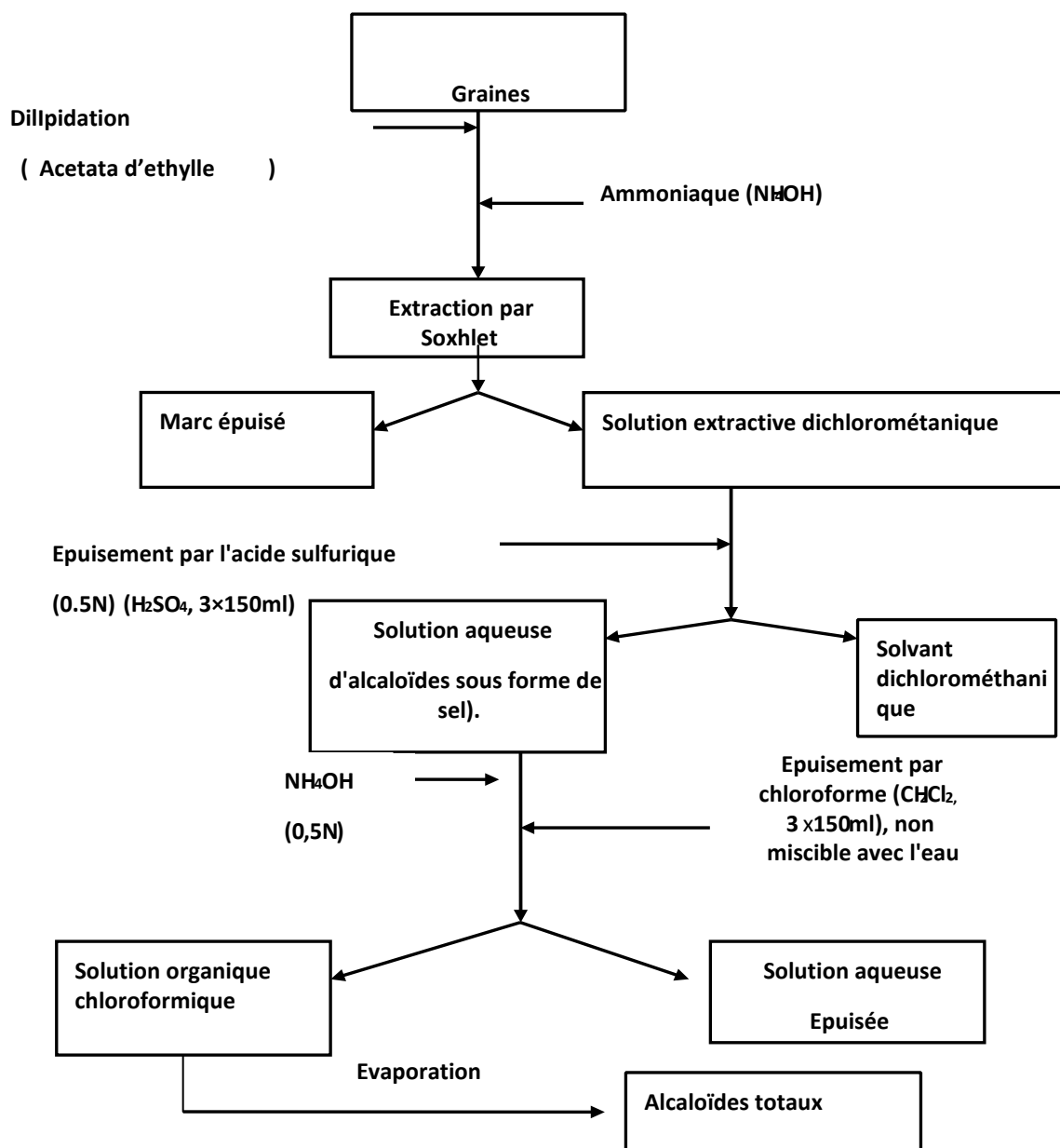
Les propriétés basiques des alcaloïdes et les solubilités différentielles qu'ils présentent avec leurs sels sont mises à profit lors de leur extraction. Deux cas principaux se présentent :

Alcaloïdes volatils entraînés par la vapeur d'eau : ils sont déplacés de leurs combinaisons naturelles par une base fixe (chaux, soude, magnésie), directement à partir de la plante, puis entraînés par la vapeur d'eau. Après condensation, ils se séparent de la partie aqueuse du distillat à laquelle ils ne sont pas miscibles. Sont obtenues de la sorte la nicotine du tabac ou la spartéine du genêt. Alcaloïdes fixes : la plante est traitée par de l'eau ou un alcool (éthanol à 70 p. 100, méthanol) en présence d'acide qui entraîne les alcaloïdes sous forme de sels solubles. La solution extractive est séparée, éventuellement concentrée, et alcalinisée par de la soude ou de l'ammoniaque qui libère les alcaloïdes. Ceux-ci sont alors repris par un solvant organique non miscible à l'eau.

Un second procédé pour déplacer les alcaloïdes consiste à ajouter un agent alcalin directement à la plante, et les alcaloïdes libérés sont récupérés en traitant le tout par un solvant organique.

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des différentes parties aériennes de la plante (rameaux, fleurs, graines et péricarpe de la gousse) a été réalisée par l'appareil de soxhlet

après la mouture de la matière végétale sous forme de poudre et traitement par de l'ammoniaque, le solvant utilisé étant l'acétate d'éthyle (Figure.44).



**Figure 44.** Protocole d'Extraction des alcaloïdes totaux (Bruneton,1999)

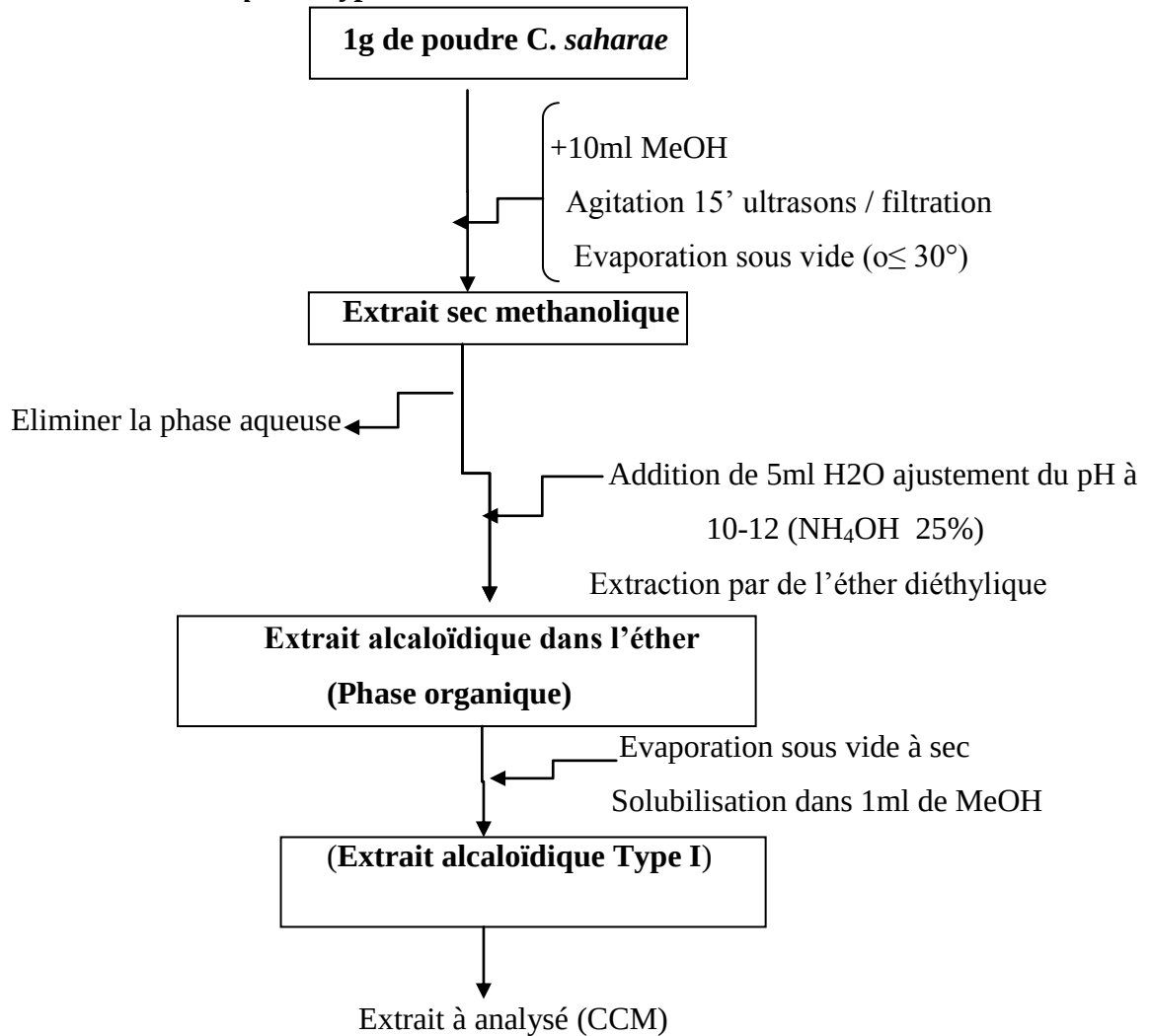
### 3.1.2.2. Extraction des alcaloïdes pour analyse CCM

#### -Extraction des alcaloïdes par le méthanol méthode de Bourquin (Type I)

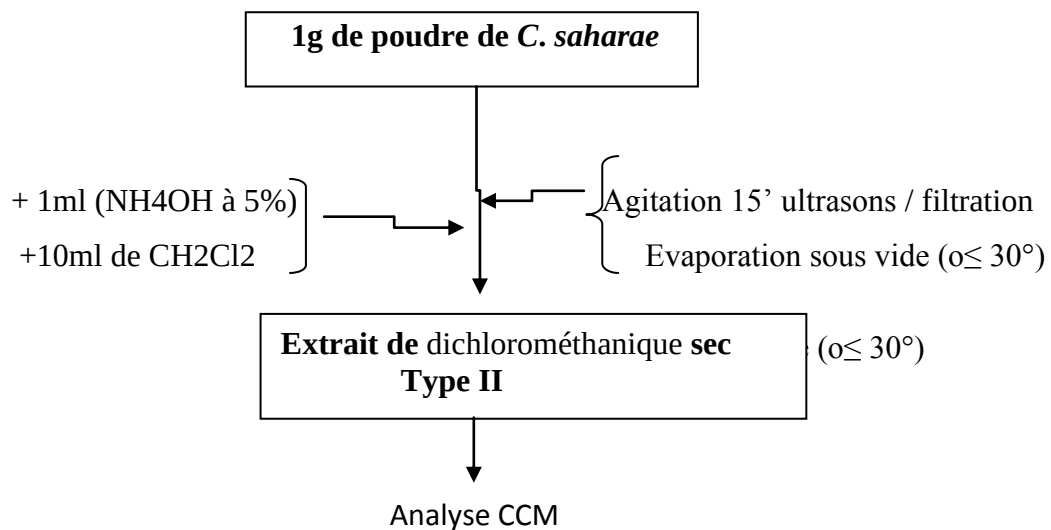
L'extraction a été réalisée selon la méthode Bourquin par un solvant le méthanol pour 1g de poudre de chaque échantillon de *C. saharae* est humectée de 10 ml de méthanol agitée pendant 15mn dans l'ultra-son puis filtrés par plusieurs rinçages puis évaporer sous vide à une température < 30°C. L'extrait sec méthanolique obtenu que l'on ajoute 5ml H<sub>2</sub>O (ajustement de pH de 10-12 pour NH<sub>4</sub>OH 25%) plus 10 ml d'éther diéthylique.

→ 1° lavage dans une ampoule à décompter on tourne soigneusement pour dégager les gaz

**Méthode de Bourquin : Type I**



**Méthode classique : Type II (extraction en milieu basique par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**



**Figure 45 .** Protocole d'extraction Type I et Type II

Récupérer la phase organique dans un erlen

➔ 2° lavage par l'éther diéthylique et on récupère la phase organique l'ensemble de l'extrait alcaloïdiques est évaporé à une température <30°C reprise dans 1 ml MeOH on obtient un extrait pour analyse CCM et HPLC

➔ Extrait Type I (Mettre 1 ml de l'extrait méthanolique de chaque échantillon pour analyse CCM) ( voir Figure 45).

#### **- Extraction des alcaloïdes par la dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) méthode classique (Type II)**

L'extraction a été réalisée selon la méthode classique ; pour 1 g de poudre végétale de chaque échantillon (7 échantillons) plus quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH à 25% (pate) que l'on rajoute 10ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, agitation sur l'ultrason (10mn) puis filtré, rincé et ensuite évaporé à température < 30°C.

On obtient l'extrait dichlorométhane Type II pour analyse CCM ( voir Figure 45).

**NB :** L'évaporation sous vide de l'extrait méthanolique de l'éther diéthylique ou du dichlorométhane devrait se faire dans les ballons déjà pesés vides après l'évaporation ces derniers contenant l'extrait sec sont de nouveau pesés.

La différence de poids indique le poids du produit sec.

### **3.1.3. Extraction des flavonoides des fleurs (E5) et des racines de mars (E2) de *C saharae* pour analyse par HPLC**

#### **3.1.3.1. Préparation de l'extrait methanoliques**

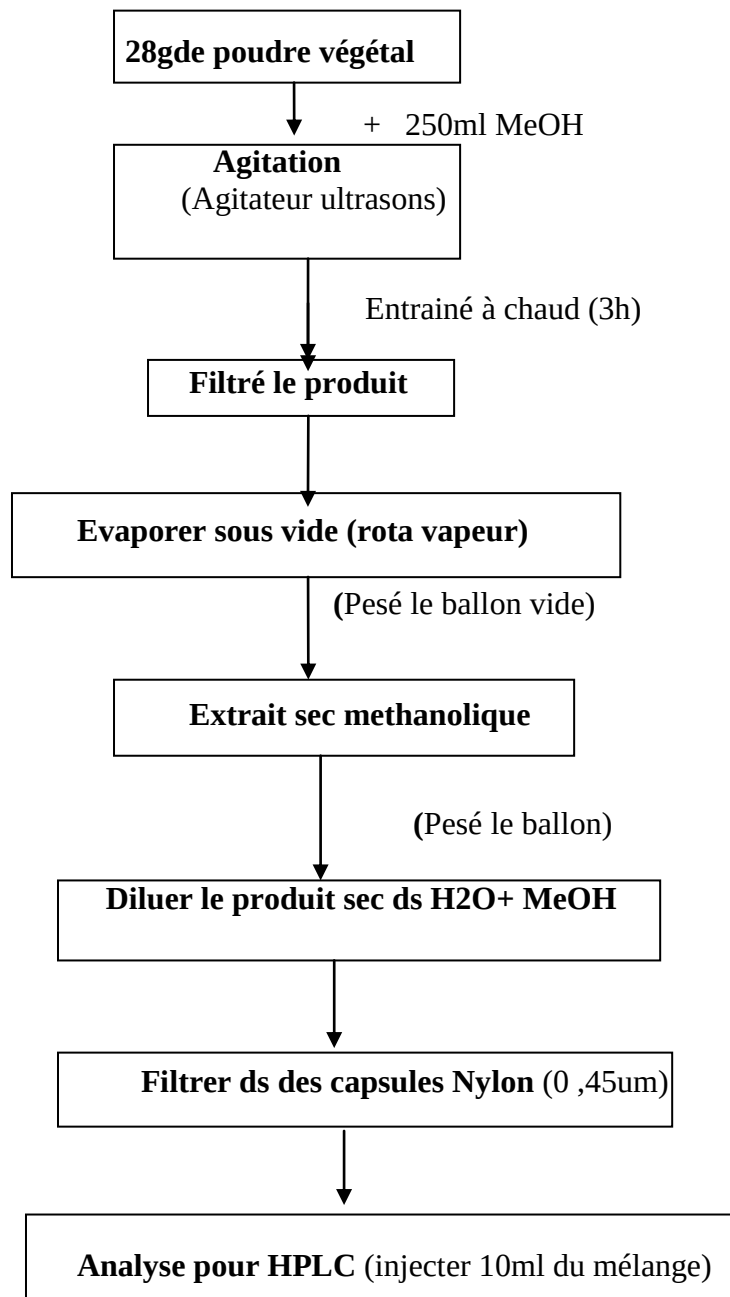
28 g de chaque echantillon (racines et des fleurs) récoltées en mars broyées (poudre) sont placés dans un appareil de Soxhlet avec 250 ml de méthanol. L'extraction a été menée pendant 3 heures.

Après refroidissement, la solution extractive (filtration sous hôte) a été récupérée puis évaporée à sec pour fournir 2 grammes d'extrait méthanolique (pour les racines) et 1 gramme d'extrait méthanolique (pour les fleurs) ont été utilisée pour le fractionnement (voir protocole d'extraction Figure 46).

#### **3.1.3.2. Fractionnement par CLHP préparative.**

Les extraits méthanolique de chaque ont été résolubilisés dans de méthanol. La solution a été filtrée puis injectée dans l'appareil de Chromatographie Liquide à Haute Performance. La colonne utilisée est de type C-18 (phase inverse). La phase mobile utilisée a consisté en un gradient d'eau et de méthanol. Nous avons démarré avec de l'eau (100%) pour augmenter progressivement la fraction de méthanol dans cette phase mobile, par palier de 5 à 10%.

**Extraction méthanolique des flavonoïdes des racines de mars et des fleurs de *C. saharae***



**Figure 46.** Protocole d'extraction à chaud des racines (mars) et des fleurs de *C. saharae*

### 3.2. Méthodes chromatographiques

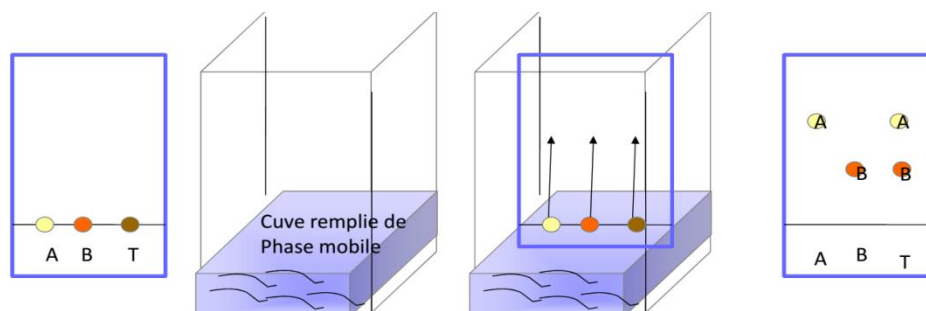
Les extraits issus de la plante étudiée, ayant révélé des activités biologiques font l'objet d'une étude chimique en utilisant des techniques de purification, d'isolement, et d'identification structurale de principes actifs. Les techniques chromatographiques sont à la base de la séparation et la purification des principes actifs des extraits ayant une activité biologique initialement détectée. Parmi ces techniques, on peut citer la chromatographie sur couches minces préparative, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

#### 3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC)

##### Principe :

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Dans ce cas, la phase stationnaire est un absorbant (gel de silice souvent) et la phase mobile est un solvant.

Elle consiste à déposer sur la plaque de gel de silice un extrait à analyser (T) et des substances de références connues de la plante (A, B). La plaque est ensuite placée dans une cuve contenant un solvant (=phase mobile qui entraîne les différents constituants (Figure. 47)). Les différents composants vont migrer plus ou moins en fonction de leur polarité et donc de leur affinité pour le gel de silice. Les "taches" relatives aux constituants séparés peuvent être observées à la lumière, ou bien sous UV. Un réactif de révélation peut permettre de mieux révéler certains constituants, de manière parfois sélective.



**Figure 47.** Chromatographie sur couche mince

**La visualisation des CCM** est effectuée sous lumière UV à 365nm et 254 nm.

Dans certains cas les plaques sont d'abord visualisées en UV254, avant d'être pulvérisées par les réactifs spécifiques aux différents groupes chimiques recherchés.

## Réactifs de révélation utilisés

### Réactif de Dragendorff :

Solution aqueuse d'iodobismuthate de potassium utilisé pour mettre en évidence les alcaloïdes.

Sous nitrate basique de bismuth..... 0,85 g  
Iodure de potassium.....8 g  
Acide acétique glacial..... 10 ml  
Eau distillée.....70 ml

### Réactif à la vanilline sulfurique :

Ce révélateur universel est préparé en dissolvant 1 g de vanilline dans 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95° en quantité suffisante pour 100 ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés comme les terpénoïdes ou les phénylpropanoïdes.

### Réactif de Neu :

Également désigné par NP/PEG, ce révélateur très sensible aux flavonoïdes est reconstitué en mélangeant respectivement 10 ml de solution A et 8 ml de solution B. La solution A est préparée en dissolvant 1 g d'acide amino-2-éthyl-diphénylborique dans 100 ml de méthanol, alors que la solution B est obtenue en dissolvant 5 g de polyéthylène glycol (PEG) 4000 dans 100 ml d'éthanol. Le chromatogramme de couche mince est observé en lumière UV à 365 nm après pulvérisation du réactif de Neu et chauffage de la plaque à 110°C pendant 2 minutes. Des spots fluorescents vert, jaune ou orange peuvent être observés selon le type de flavonoïde.

### Réactif à l'iode

Une solution d'iode est préparée en solubilisant 1g d'iode (I<sub>2</sub>) dans du méthanol. Quelques gouttes de la solution sont déposées dans une coupelle où est placée la CCM. Les vapeurs d'iode libérées réagissent alors avec les constituants, de manière non spécifique.

### Réactif à la ninhydrine

La ninhydrine ou nihydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) est un composé aromatique utilisé comme révélateur des acides aminés. Tous les acides aminés sont colorés en pourpre de Ruhemann ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ). Cette solution est préparée en solubilisant m 0,5g de ninhydrine dans de l'alcool à 65 %. La ninhydrine (en excès) réagit avec les acides

aminés selon une suite de réactions classiques : formation d'une imine, décarboxylation, hydrolyse de la nouvelle imine formée, condensation (sous forme d'imine à nouveau) avec une seconde molécule de ninhydrine.

**Réactif de Dragendorff** : Solution A. : 2 g de subnitrate de bismuth, 25 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'eau. Solution B : 40 g d'iodure de potassium et 100 ml d'eau Le réactif est préparé en mélangeant 10 ml des solutions A. et B. à 20 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'eau.

**Réactif iodoplatinate** : 5 ml de solution (5% m / V) de chlorure de platine (V), 5 g d'iodure de potassium, 5 ml d'acide hydrochlorique concentré et 100 ml d'eau.

**Eluants** : Les systèmes de solvants préparés pour les analyses des alcaloïdes sont :

S1: Cyclohexane, diethyl amine (70/30)

S2 : Chloroforme, méthanol, acide acétique glacial (47,5 : 47,5 : 5)

S3 : Dichloromethane, méthanol acide acétique glaciale (47,5 : 47,5 : 5)

S4 : Dichloromethane, méthanol, NH<sub>4</sub>OH (75 : 25 : 1).

**Témoins** : on prépare 1g /ml dans le méthanol les témoins suivants : Spartéines sulfates ; Picrate de cytisine ; Cytisine basique.

### 3.2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

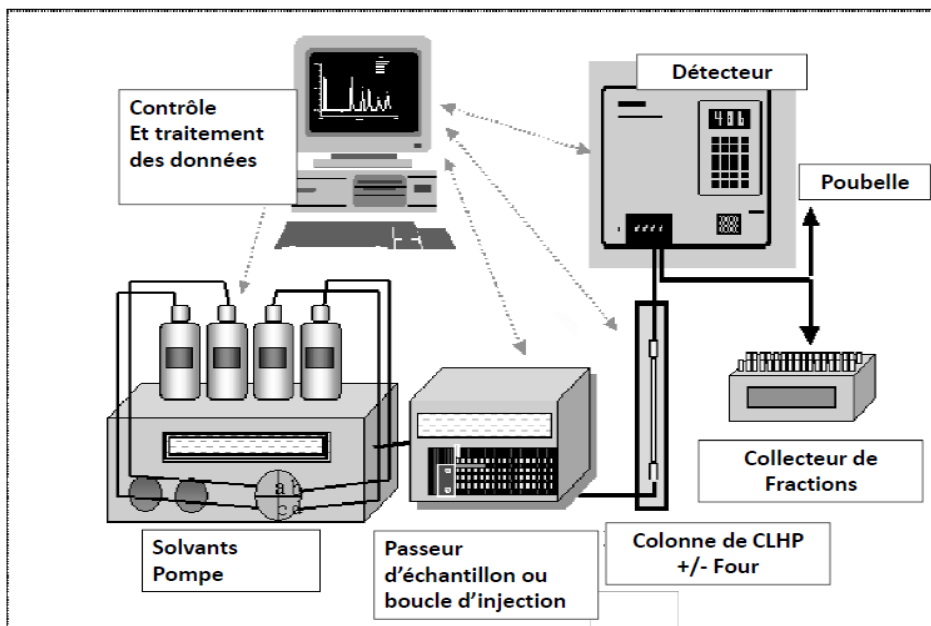
#### 3.2.2.1. Chromatographie liquide haute performance analytique et préparative (CLHP).

Cette méthode chromatographique consiste à séparer de manière quantitative les constituants présents au sein d'un extrait après injection sur une colonne chromatographique constituée d'une phase stationnaire de type phase inverse (silice greffée C-18). Une pompe haute pression permet d'injecter la phase mobile permettant la séparation des constituants au sein de la colonne. La CLHP peut fonctionner en mode analytique ou préparatif (Figure.48).

-Le mode analytique sert à analyser des extraits et nécessite des faibles quantités d'extrait en solution, injecté en très faible volume (20 µL en général).

- Le mode préparatif sert à injecter une quantité importante d'extrait (centaine de mg au gramme) afin d'isoler les constituants présents dans l'extrait. Dans ce cas là, les fractions issues de la séparation des constituants de l'extrait par la colonne sont collectées à la sortie de la colonne. Le suivi de ce fractionnement peut se faire par chromatographie couche mince. Nous avons choisi de réaliser ce fractionnement sur l'extrait méthanolique des racines.

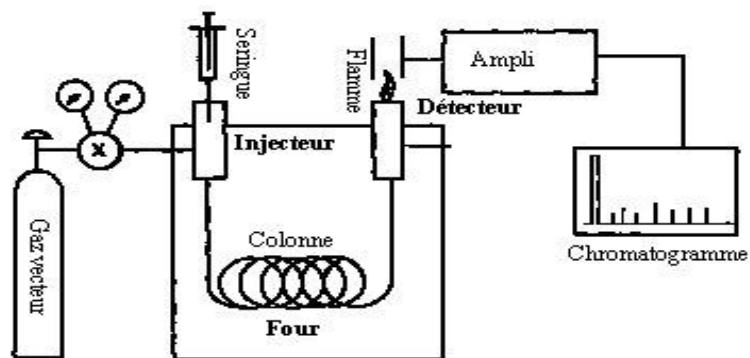




**Figure 48.** Schéma d'une chaîne de CLHP en mode analytique ou préparatif  
(Boutefnouchet 2016-2017)

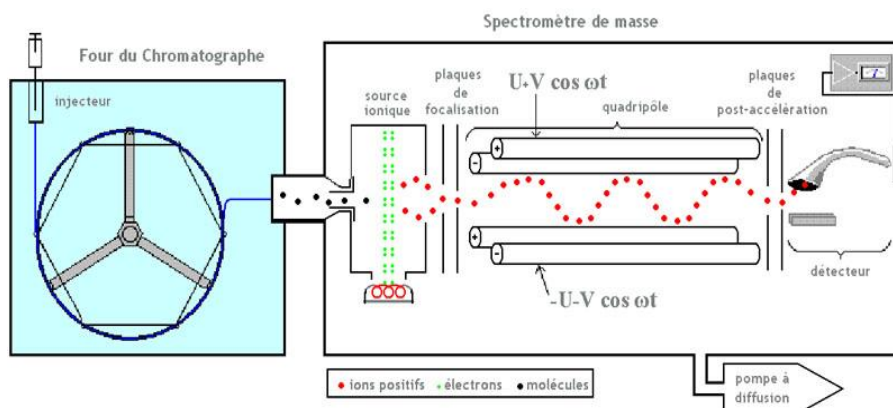
### 3.2.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG), Chromatographie en phase gazeuse avec spectre de masse CPG/MS

Dans ce cas la phase stationnaire est une colonne et la phase mobile est un gaz porteur (Figure 49).



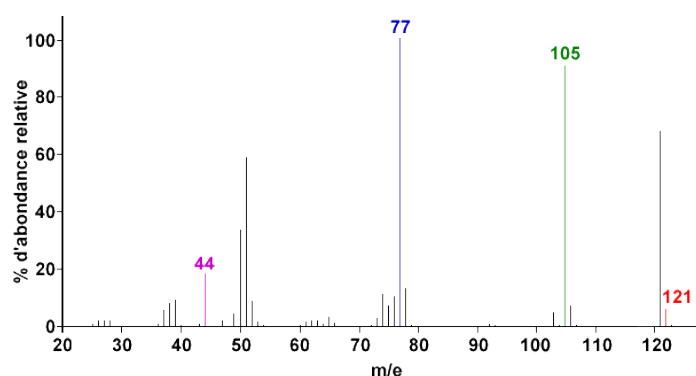
**Figure 49.** Chromatographie en phase gazeuse

Les constituants sont rendus volatiles par chauffage, ils sont ensuite séparés sur une colonne remplie de phase stationnaire (polaire ou apolaire). Le gaz vecteur (azote, hélium), entraîne les composés qui sont détectés à la sortie. La CPG-FID est équipée d'un détecteur à ionisation de flamme Dans notre cas, c'est la GC-MS qui a été utilisée : les composés sont analysés dans un spectromètre de masse (Figure 50).



**Figure 50. Chromatographie en phase gazeuse avec spectre de masse**

Lorsqu'une molécule est introduite dans le spectre de masse, son ionisation produit plusieurs types d'ions. On obtient alors un spectre de masse qui est constitué des abondances de ces ions (en ordonnée), en fonction de leur rapport masse/charge (en abscisse) (Figure 51).



**Figure 51. Pics chromatographiques de CPG/MS**

Le couplage CPG/MS permet l'analyse de composés thermiquement stable, de masse moléculaire inférieure à 1000u.

### 3.3. Méthodes de dosage

#### 3.3.1. Dosage de l'azote total et des alcaloïdes totaux

Le dosage de l'azote total de la partie aérienne de la plante (Racines, rameaux, fleurs, péricarpe de la gousse et graines) et souterraine (racines, rhizosphères et sable) a été fait au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de la wilaya de Sétif. Ce dosage est réalisé par la méthode KJELDAHL déjà utilisée dans le cadre des analyses pédologiques.

#### 3.3.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par méthode de **Folin-Ciocalteu**. Cette dernière est utilisée, notamment pour le dosage des polyphénols de plusieurs drogues

végétales inscrites à la Pharmacopée Française. Nous nous sommes basés sur la monographie du Kinkéliba (feuille).

Cette méthode décrit le dosage à partir d'une solution aqueuse de poudre de matériel végétal. Elle met ensuite en jeu le réactif phosphotungstique, qui entraîne la formation d'une coloration en milieu légèrement basique (carbonate de calcium), dont on mesure l'absorbance à 715 nm. La substance de référence utilisée est le pyrogallol. Le % en polyphénols totaux dans les extraits est ensuite calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Selon la formule suivante : \% poly phénol total} = \frac{13,12 \times A1}{A2 \times m} \times 100$$

m : Prise d'essai en gramme

A1 : Absorbance à 715nm 2 min après la dernière addition de réactif

A2 : Absorbance à 715nm 2min après la dernière addition de réactif et dans les 15min qui suivent la dissolution du pyrogallol.

### 3.3.3. Dosage des flavonoïdes

Concernant le dosage des flavonoïdes, la méthode de référence est également décrite à la Pharmacopée. Nous nous sommes basé sur la monographie des fleurs de Carthame de la Pharmacopée Européenne. Elle met en jeu le chlorure d'aluminium. Ce dernier réagit avec un extrait méthanolique des différentes parties de *C. saharae*, et entraîne la formation d'une coloration jaune. L'absorbance est mesurée à 420 nm, la solution de compensation ne contenant pas de chlorure d'aluminium. La teneur est calculée selon la formule ci-dessous :

$$\% : \frac{A}{m}$$

A : absorbance de la solution à examiner

m : la prise d'essai en gramme

Remarque : en prenant 400 nm comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hyper oside à 420 nm

Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR 0,2 N) est un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus du tungstène et de molybdène, la coloration produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques totaux. L'obtention d'une coloration jaune stable permet d'évaluer par spectrophotométrie UV la teneur en flavonoïdes de l'échantillon par rapport à une solution de référence de quercétine. La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait a été estimée globalement par formation d'un complexe flavonosides-(Al<sup>3+</sup> ; 3Cl<sup>-</sup>) en milieu tampon.

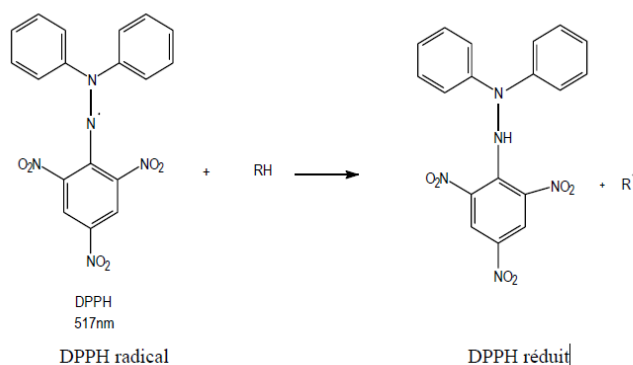
### 3.4. Evaluation de l'activité antioxydante

#### 3.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante par mesure de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Suite aux résultats obtenus à l'issue du dosage des flavonoïdes et des polyphénols des sept échantillons, révélant la présence de flavonoïdes et polyphénol en quantité intéressante, notamment dans les fleurs et les racines collectées en Aout, l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Calobota saharae* a été entreprise. Afin de déterminer une activité antioxydante, nous avons évalué la capacité des différents extraits de *C. saharae* à inhiber le radical DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).

##### Principe :

L'utilisation de ce radical comme réactif est basée sur le fait que dès que le radical DPPH réagit avec un composé antiradicalaire, celui-ci libère un hydrogène après réduction conduisant ainsi à un changement de couleur (passant du violet foncé au jaune clair. On peut donc visualiser très rapidement une activité antiradicalaire, simplement suite à un changement de coloration du radical (DPPH●) voir (Figure.52).



**Figure 52.** Structure moléculaire du radical 1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl (DPPH●).

Cette activité peut d'ailleurs même être mesurée en quantifiant par spectrophotométrie la réduction de l'absorbance à 517 nm quand le radical libre stable réagit avec un antioxydant.

#### 3.4.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance (CCMHP ou HPTLC).

L'accès à un appareil CCMHP couplé à un spectromètre de masse nous a engagé à évaluer cette activité antiradicalaire par bioautographie. Cette technique permet la mise en évidence d'une activité biologique directement sur une plaque de chromatographie sur gel de silice, notamment sur plaque CCMHP.

**Principe :**

La Chromatographie Couche Mince Haute Performance (CCMHP) ou High Thin Layer Chromatography (CCMHP) en anglais est une technique de chromatographie sur couche mince améliorée, permettant une meilleure séparation des composés. Cette amélioration est permise par l'utilisation d'une silice de granulométrie plus fine ( $<10\mu\text{m}$ ), répartie sur une couche plus fine ( $<150\mu\text{m}$ ), permettant une élution sur des plaques plus petites : 10 cm au lieu de 20 cm pour une plaque CCM classique. La résolution des pics chromatographiques est meilleure compte-tenu du nombre de plateau augmenté (Tableau12).

**Tableau 12.** Comparaison entre Chromatographie Couche Mince et La Chromatographie Couche Mince Haute Performance (CCM / CCMHP)

| Paramètres                         | CCM                         | CCMHP                 |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Epaisseur silice                   | 250 $\mu\text{m}$           | 100-200 $\mu\text{m}$ |
| Taille des particules              | 5-20 $\mu\text{m}$          | 4-8 $\mu\text{m}$     |
| Dépôts                             | Manuels / semi-automatiques | Automatiques          |
| Taille des dépôts                  | 2-4 mm                      | 0.5-1 mm              |
| Volume des dépôts                  | 1-10 $\mu\text{l}$          | 0.2-5 $\mu\text{l}$   |
| Distance de développement optimale | 10-15 cm                    | 5-7 cm                |
| Temps de développement             | Phase mobile dépendant      | 40% de temps en moins |
| Reproductibilité                   | Difficile                   | Reproductible         |

L'intérêt de cette technique réside également dans le fait qu'elle a été automatisée, ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons en un temps réduits de façon standardisée, réduisant ainsi les écarts de résultats.

### 3.4.3. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire par mesure de l'activité biologique (bioautographie)

**Principe de la bioautographie :**

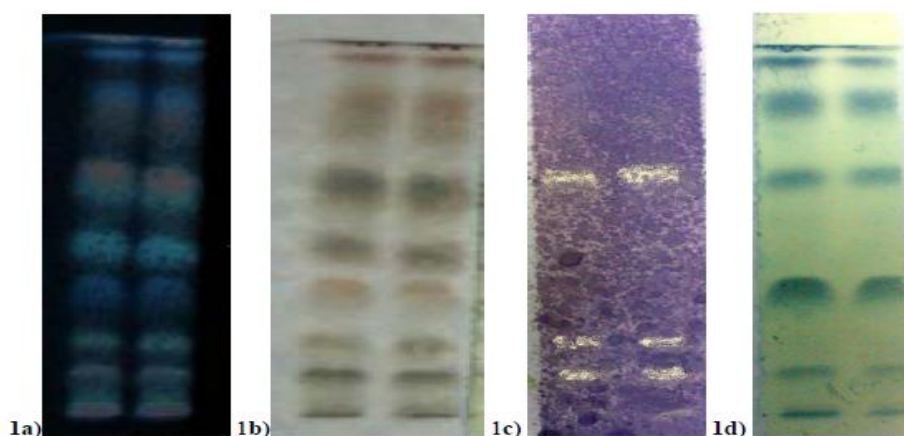
La bioautographie permet de mettre en évidence une activité biologique directement à l'issue d'une analyse chromatographique sur couche mince. Elle consiste à mettre en contact la plaque de chromatographie, après développement, avec le/les réactif(s) (composé pur, enzyme, bactéries...). Il est alors possible de voir quel composé de l'extrait chromatographié peut engendrer une réaction avec le(s) réactif(s). Il existe de nombreuses applications de la bioautographie.

On peut notamment citer l'évaluation d'une activité inhibitrice enzymatique, notamment inhibitrice d'acétylcholinestérase pouvant déboucher sur une activité anti-alzheimer. Il existe également des applications à l'évaluation d'activités antimicrobiennes consistant à observer les diamètres d'inhibition de croissance bactérienne etc...

On peut également mentionner l'évaluation de l'activité inhibitrice de xanthine oxydase, enzyme impliquée dans l'hyperuricémie et le stress oxydant, mise au point par l'équipe de Furlan (Ramallo *et al.*, 2006). L'évaluation de l'activité antioxydante peut également être observée.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire d'extraits végétaux sur le radical DPPH a été mise en oeuvre dans plusieurs travaux. On peut notamment citer les travaux de Zhao *et al.* Réalisés sur différentes espèces de curcuma (Zhao *et al.*, 2010).

Les travaux de Ramanathan *et al* ont utilisé la technique de la bioautographie sur des extraits de *Swietenia mahagoni*, notamment activité antiradicalaire (DPPH) (Figure.53).



**Figure 53.** CCM de la bioautographie sur des extraits de *Swietenia mahagoni*

Les plaques CCM sont visualisées sous UV (1a-366nm), puis après pulvérisation de méthanol sulfurique (1-b), solution de DPPH (1-c), réactif de Folin-Ciocalteu (1-d). Les composés présentant une activité antiradicalaire peuvent être très facilement identifiés suite à l'observation du profil 1-c où seules 3 composés ont significativement (Sahgal *et al.*, 2009).

#### **3.4.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire par spectrophotométrie UV.**

L'activité antiradicalaire des extraits et du composé isolé a pu être mesurée par spectrophotométrie UV. Pour cela, une solution mère de l'extrait de racines du mois d'août a été préparée gamme de concentrations des différents extraits (16.32 mg : 10 ml, équivalent à une solution à 1 mg eq. plante sèche / mL. Un aliquot de la solution mère a été prélevé (0.3, 0.6, 0.9, 1.2 mL, correspondant à 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg d'équivalent plante sèche) et

mélangé à 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 1 mM. Les solutions ont été préparées en triplicat. Après ajustement du volume à 10 ml par du méthanol, et incubation dans le noir à température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance a été mesurée à 517 nm dans un spectrophotomètre UV. Un blanc a été préparé (1ml de DPPH 1% + 9 ml de méthanol).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été exprimé ainsi :

$$\% \text{Inhibition} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{EXTRAIT}}) / (A_{\text{DPPH}}) \times 100$$

Où  $A_{\text{DPPH}}$  = absorbance de la solution de DPPH

Et  $A_{\text{EXTRAIT}}$  = absorbance de l'extrait

Pour le composé isolé, une solution mère (31,5 mg/20 ml dans le méthanol) a été préparée, puis un aliquot de la solution mère a été prélevé (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, correspondant à 0.315 to 1.25 mg du composé pur). Les pourcentages d'inhibition ont été calculés de la même manière que pour les extraits.

### 3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des alcaloïdes de *Calobota saharae* est testée par la méthode de l'aromatogramme ou technique de diffusion en milieu gélosé.

Cette méthode permet une appréciation qualitative de l'activité des alcaloïdes ; l'aspect qualitatif est analysé par l'estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

#### 3.5.1. L'aromatogramme

Les alcaloïdes sont dilués dans l'éther di-éthylique à 40 %. Les étapes suivies sont schématisées dans la figure annexe (Figure. Etapes de l'étude de l'activité antibactérienne)

On mesure à l'aide d'un pied à coulisse les diamètres de la zone d'inhibition que l'on note soigneusement. Les diamètres trouvés sont ensuite groupés en classe comme suit :

Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm : Classe 1.

Pour un diamètre compris entre 20 et 14 mm : Classe 2.

Pour un diamètre compris entre 14 et 8 mm : Classe 3.

Pour un diamètre inférieur à 8 mm : Classe 4.

#### 3.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Concentration minimale inhibitrice est déterminée sur milieu solide, nous avons testés les dilutions suivantes : 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10. L'estimation de la CMI est faite sur trois souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). L'inoculum correspond à une suspension

bactérienne équivalente à 0.5 Mac Farland isolé à partir d'une culture de 24 h sur gélose Muller- Hinton.

### 3. 6. Matériels d'analyse

#### 3.6.1. Analyse de l'activité antioxydante par HPTLC-MS

L'échantillonneur automatique TLC (Thin-Layer Chromatography) (ATS4) et la chambre de développement automatique (ADC2) de marque CAMAG (Muttenez, Suisse) ont été utilisées pour HPTLC (High-Performance Thin- Layer Chromatography).

La détection a été réalisée en utilisant le TLC visualiseur, le scanner TLC 3 et l'interface TLC-MS (CAMAG). La dérivation des plaques a été réalisée en utilisant le pulvérisateur à DESAGA. Pour TLC-MS, une HPLC binaire pompe Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) couplé à un triple ABSciexQtrap 2000 spectromètre de masse quadrupolaire. L'acquisition de spectres de masse a été réalisée en utilisant l'ionisation électrospray dans le mode négatif (Figure 54 ).



**Figure 54.** Photos des appareils HPTLC-MS /TLC (ATS4)

#### 3.6.2. Analyse structurale de l'activité antioxydante par Résonance magnétique nucléaire (RMN)

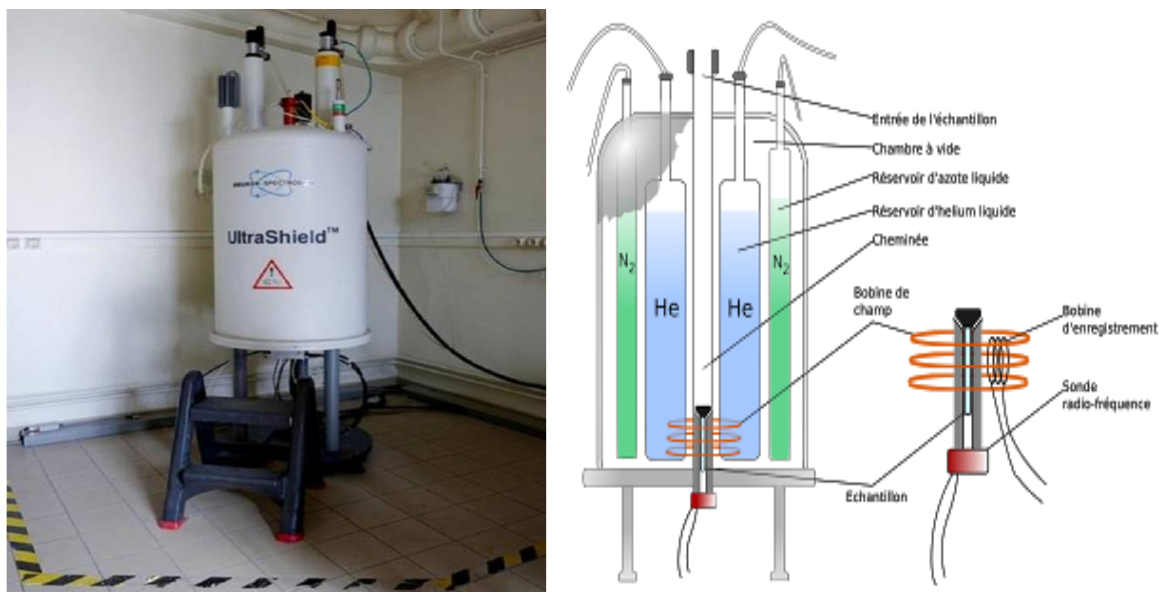
Les noyaux pouvant donner un signal en RMN possèdent un électron libre. Les plus couramment utilisées en analyse structurale de composés organiques sont le proton  $^1\text{H}$  et le carbone  $^{13}\text{C}$ . Mais il est également possible d'enregistrer les signaux émis par l'azote  $^{15}\text{N}$ ...

Soumis à un champ magnétique, ceux-ci entrent en précession et émettent alors un signal



enregistré par le spectromètre de masse. L'intérêt de la spectroscopie de RMN réside dans sa faculté à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule (Figure 55).

La fréquence de résonance des carbones est très sensible à l'environnement électronique et stérique. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes de pratiquement tous les carbones de la molécule.



**Figure 55.** Photo de l'appareil résonance magnétique nucléaire (RMN)

Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre, ou en quelque sorte son empreinte digitale, à partir duquel elle pourra être identifiée. Pour cela, il est donc très important d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange par rapport aux spectres des composés de référence.

Les analyses RMN ont été réalisées sur un appareil Bruker Avance III HD, Wissenbourg, France, (400Mhz et 300 MHz). Les solvants utilisés sont des solvants deutérés qui servent de référence.

## **Partie III**

### **Résultats et Discussion**

## TROISIEME PARTIE : Résultats et Discussion

L'étude réalisée antérieurement dans le cadre du Magistère a porté sur l'écologie et la biologie de *Calobota saharae* ((Coss et Dur.) Boatwr et B.E.van Wy). Ces premiers travaux ont notamment porté sur l'analyse du sol (pédologie), la mesure des paramètres biométriques des différents organes de la plante. L'étude phytochimique a également été amorcée, notamment par le dosage de l'azote total et la mesure de la teneur en alcaloïdes totaux.

Ces résultats seront brièvement présentés ici.

Dans le cadre de ce travail de doctorat, il s'agissait donc d'élargir et d'approfondir la connaissance sur ce genet saharienne vue le changement de la classification de l'espèce *Calobota saharae* au sein du genre *Spartidium* puis du genre *Genista*. Une nouvelle récolte de matériel végétal a été entreprise.

Des études portant sur l'écologie, les caractéristiques morphologique de l'espèce et la phenologie ont été envisagées.

L'étude phytochimique sur les différentes parties de la plante en fonction des différentes saisons a été amorcée. Par la suite, nous avons procédé à l'extraction, au fractionnement et à la purification de différents métabolites secondaires en utilisant diverses techniques de chromatographie (HPLC, CCM, CPG-MS, CCM de partage et HPTLC-MS). Les métabolites secondaires isolés ont été par la suite analysés et caractérisés par des techniques de spectrométrie de masse (SM) et de spectroscopie (UV, RMN).

Concernant l'évaluation des propriétés biologiques de *Calobota saharae*, l'étude antérieure de l'activité antimicrobienne réalisée au cours du Magistère sera rappelée. Ces données ont été complétées dans le cadre de ce travail de doctorat, par la mesure de l'activité antioxydante. Ces différentes étapes de nos travaux seront développées et détaillées tout au long de cette partie.

## CHAPITRE I : ETUDES BILOGIQUES ET BIOMETRIQUES DE L'ESPECE

*Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. Van.)

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Collecte

En vue de réaliser les objectifs envisagés dans l'introduction, le matériel utilisé correspond à des individus issus d'une population de *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. Van Wyk récoltée entre aout 2009 et mars 2010.

Les organes ont été récoltés selon l'état phénologique de la plante : pendant la période de floraison (mars-avril), et fructification (juillet-aout). Comme signalé précédemment, le matériel biologique est récolté au niveau d'une station principale dans laquelle existe une population importante du genêt saharien de *Calobota saharae*. Cette station est située au niveau du cordon dunaire de Bou-Saâda au sein même du lit majeur de l'Oued Maïtar.

Cette population colonise une dépression allongée constituée par le lit majeur de l'Oued Maïtar qui coule au Nord de l'agglomération de Bou-Saâda (Wilaya de M'sila).

Cette station correspond à la population de genêt saharien la plus étendue et dense.

Cette population comporte de nombreux individus se caractérisant par un port arbustif buissonnant, le choix s'est porté sur l'individu qui possède le port le plus élevé (plus 1m de hauteur) qui constitue le buisson le plus grand (50 cm de diamètre) (Figure. 56).



**Figure 56** Photo de la Station Oued El- Maïtar (Bou Saada, mai 2010) (Début fructification de *Calobota. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.).

## 1.2. Reconnaissance et description du matériel végétal

La reconnaissance du matériel végétal utilisé (Figure.57) a été faite sur la base des caractères morphologiques cités dans la flore de Maire (1952-1987).

En outre, cette description originale appelée techniquement une « diagnose » nous permettra de comparer les résultats de l'analyse biométrique des individus issus de la population échantillonnée au sein de la zone d'étude avec cette diagnose.



**Figure 57.** Photo prise pendant la reconnaissance du matériel *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.) Oued Maitar, El-Maadher (Bou Saada, Mars 2010)

Il est fréquent en période hivernale de confondre le genêt saharien avec le rétam (*Retama retam*). Ces 2 espèces appartiennent à la famille botanique des Légumineuses (*Fabaceae*) qui colonisent le même habitat et se développent sur le cordon dunaire de Bou-Saâda. Souvent ces 2 espèces poussent côte à côte (Figure.58) et il est très difficile de les distinguer.

En effet, ces 2 végétaux possèdent le même port arbustif et portent des rameaux qui se ressemblent sensiblement, sont également, utilisées comme des plantes fixatrices de dunes. Les services forestiers utilisent cette propriété (fixatrice de dunes) pour lutter et combattre l'avancée des processus de désertification.



**Figure 58.** Photo de l'aspect morphologique de deux espèces fixatrices de dunes colonisent le même endroit (*Retama retam* et *Calobota saharae*) de la station d'étude (2009)

### 1.2.1. Phénologie :

En dépit du manque d'information relative à la variation spatio-temporelle du stock hydrique du sol ainsi qu'à la conductance stomatique, le suivi de la phénologie de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)) permis d'établir des stratégies propres d'adaptation de ce taxon aux conditions climatiques hyper-arides, qui prévalent dans la zone d'étude.

Les stades phénologiques de *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)) sont réunis dans le tableau (13). La période de végétation très longue, Elle s'étale du mois d'Août au mois de Février. Elle correspond à la période de repos de la plante. L'arbuste porte des rameaux lignifiés portant peu de feuilles. Le développement végétatif commence au mois de Février avec l'apparition des rameaux végétatifs portant des feuilles. L'arbuste change d'aspect il devient dévêtu et vert.

Le début de floraison souvent juste après l'apparition de rameaux végétatifs.

La période de floraison est courte, elle s'étale du début Mars au mois d'Avril la fructification intervienne rapidement après la formation des fleurs.

On observe, sur un même rameau, des fleurs et des calices fructifiées, de même les fleurs ne se forment pas aux mêmes moments. On trouve différents stades floraux sur un même rameau.

**Tableau 13.** Stade phénologique de *C. saharae*

| Période végétative | Début de croissance des rameaux végétatifs | Début de la floraison | Début de la fructification |
|--------------------|--------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Août - février     | Février - Mars                             | Mars-avril            | Avril-mai                  |

Chez *C. saharae*, l'activité photosynthétique, continue dans le temps, est a priori due soit à un ajustement osmotique (xérophiles) qui est due à l'activité somatique intense ce qui traduit à son tour une forte activité photosynthétique, permettant une croissance végétative très longue, soit au système racinaire à la fois superficiel, traçant et pivotant, permettant d'explorer un volume de sol maximum et de bénéficier d'un apport d'eau suffisant même en zone aride et saharienne. Ce caractère permet donc à l'espèce de se comporter comme une arido-active. Cette stratégie est connue chez d'autres espèces de la famille des Fabaceae, et plus précisément chez *Retama raetam* (Abdallah *et al.*, 2003).

### 1.2.2. Morphologie

*Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. est un arbuste non épineux, glabre et rétamioïde dont la hauteur est de 1 à 2 mètres, Les tiges couchées portant des rameaux redressés, droits, simples herbacés, les plus âgés sont lignifiés. Cette plante présente des racines qui s'enfoncent directement dans le sol ou présentent des Stolons qui s'étendent parfois sur 1 à 1,5 mètres et par la suite se prolifèrent dans le sol à une profondeur de quelques dizaines de mètres. Les feuilles simples caduques, unifoliées, très espacées, sessiles, elliptiques, pubescentes à la face inférieure. La surface des feuilles est très réduite : leur longueur moyenne 3,9 mm 4mm par contre leur largeur moyenne est de 0,9 mm.

Les inflorescences en grappe terminales. Fleurs longues de 10-12 mm, Calice velu Soyeux à lèvres égales plus longues que le tube, corolle jaune à étendard glabre aussi long que la carène, androcée monodelphe. Fruit sont des Gousses de longueur moyenne est de 2,22 cm et dont la largeur moyenne est de 0,61 cm aplati, Velu et bosselé. Le nombre de graines par gousses est de 2 graines ; par contre le poids de ces derniers (50 gousses) est de 1,68. Le poids de 50 graines est de 0,50 g. Comme toutes les xérophytes, vivant dans les conditions stressantes, *Calobota saharae* présente des adaptations morphologiques. Ces derniers



consistent en une réduction de leur surface foliaire. Le réseau horizontal des racines permet, l'utilisation à la fois de l'eau de pluie et celle des condensations. Le manchon de sable couvrant la zone pilifère, caractéristique des espaces psammophiles, permet la protection de la racine contre la dessiccation.

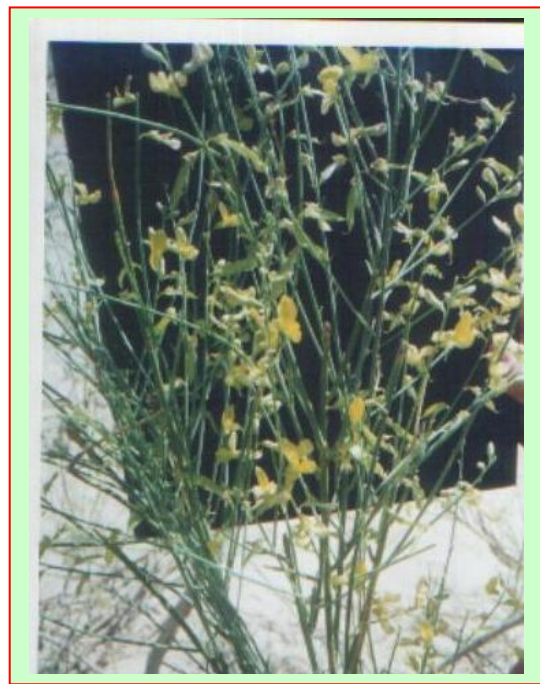
#### 1.2.2.1. Rameaux

En complément de la description dans la diagnose originale de Cosson et Durieu (1855), il est possible de faire la description suivante :

- Les rameaux sont dressés dès la base, les grosses branches sont couvertes d'une écorce brun rouge crevassée longitudinalement
- Par contre les jeunes rameaux sont presque tous florifères (Figure.59) sont plus densément pubescents, verts Les rameaux d'un an et plus glabrescents ou complètement glabres, verts, cylindriques, peu profondément sillonnés, tous effilés, presque toujours aphyllés.



**Figure (a).** Jeunes rameaux pubescents



**Figure (b).** Rameaux florifères

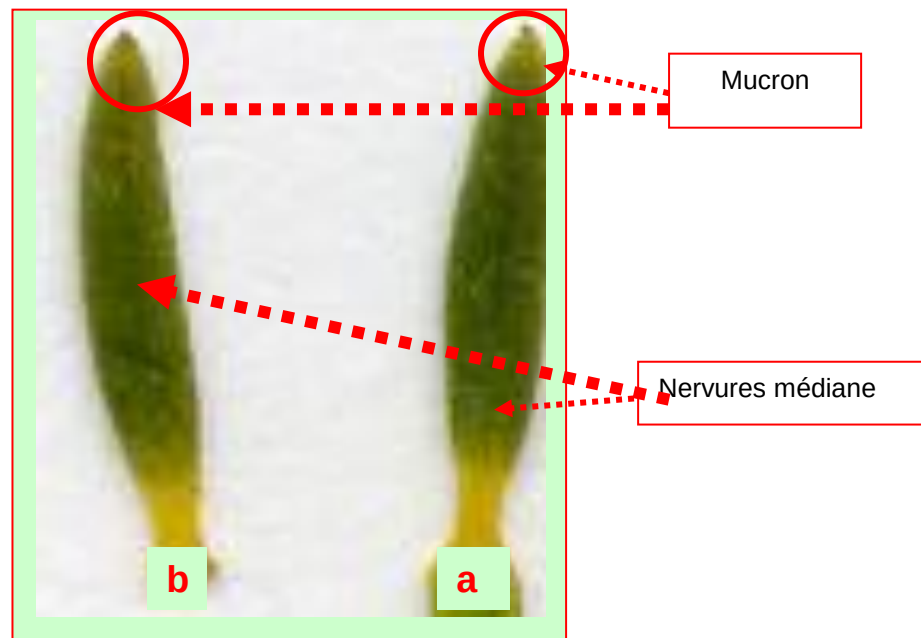
**Figure 59 (a, b).** Rameaux pubescents et florifères de *C. saharae*

#### 1.2.2.2. Feuilles

En complément de la description dans la diagnose originale de Cosson et Durieu (1855), il est possible de faire la description suivante : les feuilles sont très fugaces alternées, non stipulées, toutes uni-foliolées, persistant. Les folioles (Figure.60) sont linéaires oblongues,



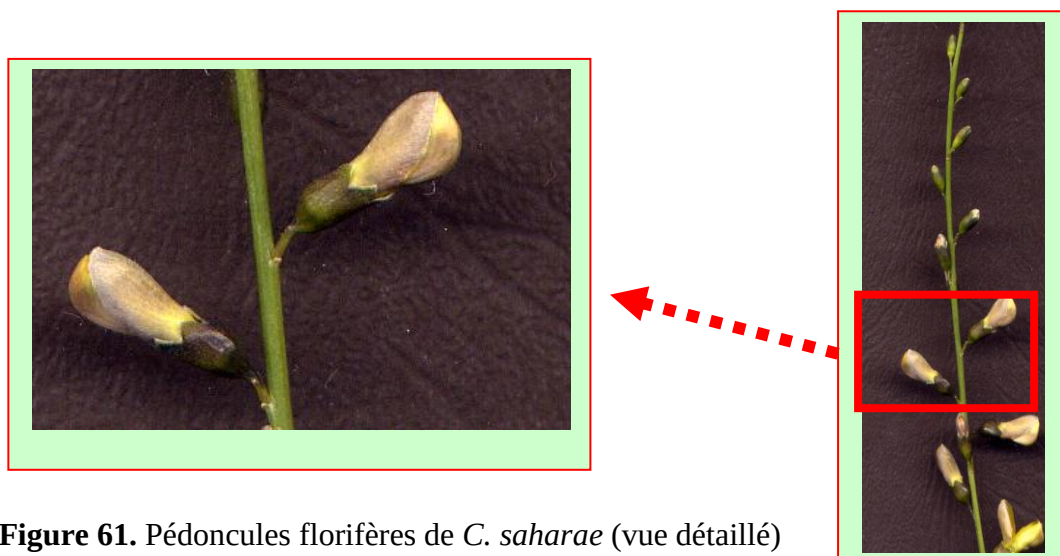
pubescentes soyeuses en dessous, glabres en dessus, entières, subaiguës et un peu mucronulées au sommet, peu atténuée à la base, trinervées à la base, à nervure médiane non ou à peine saillante.



**Figure 60.** Folioles de *C. saharae* (a : face inférieure) ; (b : face supérieure)

### 1.2.2.3. Fleurs

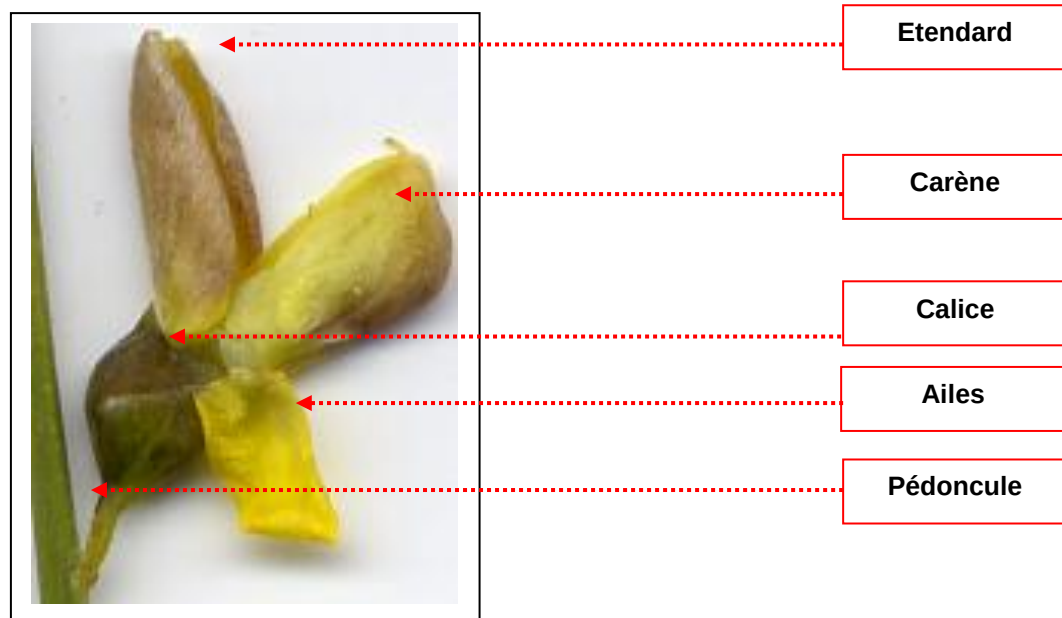
Les inflorescences sont alternes, étalés dressés, formant presque dès la base une grappe lâche, plus ou moins effilée, à axe un peu pubescent ; grappes aphylls (Figure 61).



**Figure 61.** Pédoncles florifères de *C. saharae* (vue détaillé)

La fleur porte un calice (5 dents) de 3 à 5 mm de long campanulé (Figure 61).

La corolle jaune est de 8 à 10 mm de long caduque, l'étendard pubescent sur le dos, largement ovale, de 10 mm long, atténué obtus au sommet, arrondi. Les ailes un peu plus courtes que l'étendard, de 8,5 à 9 mm long., obtuses. Carène glabre, obtuse, large, égalant l'étendard, de 10 x 5 mm (Figure. 62).



**Figure 62.** Fleur du *Calobota saharae* (genêt saharien)

Les étamines de *C. saharae* sont glabres, toutes concrescentes en tube fermé (Figure.63).



**Figure 63.** Les étamines de *C. saharae* (vue détaillée des anthères et filets)

Les anthères jaunes inégales alternativement oblongues linéaires, basifixes, de 1 mm de long et oblongues, dorsifixes de 0,50 mm de long. Les filets des anthères se soudent forment un seul faisceau (monadelphie) en forme de tube. La taille des étamines est variable long moyen et court (10 anthères) (Figure. 64).



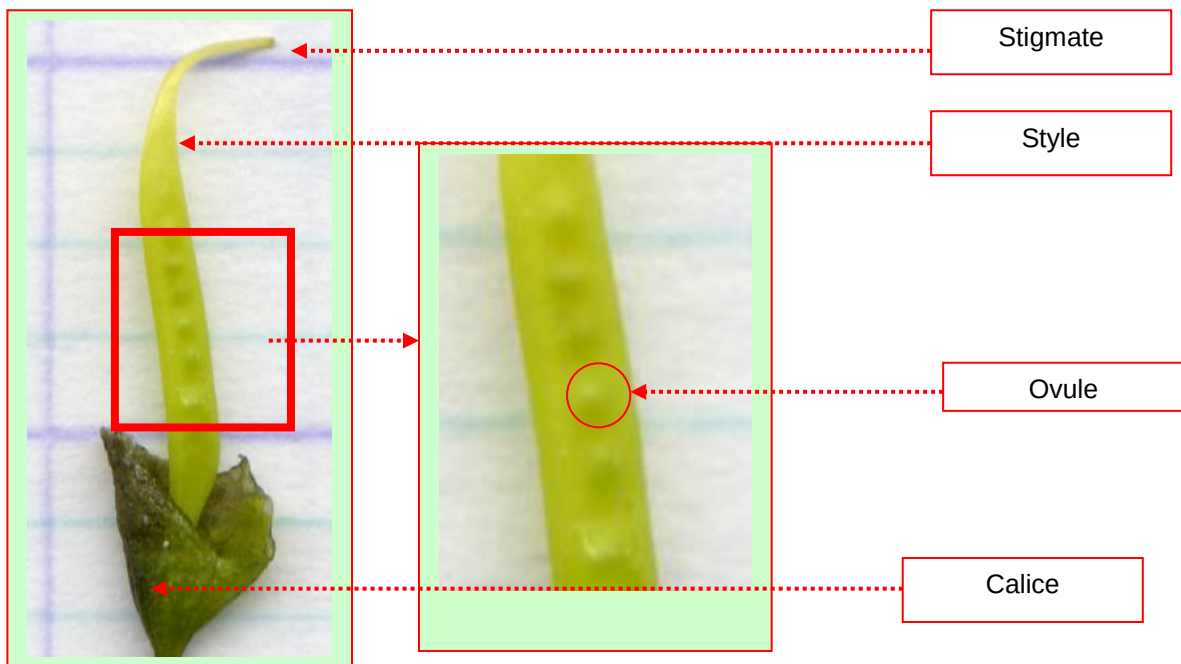
**a** : Vue d'ensemble des 10 anthères



**b** : Vue détaillée taille des anthères

**Figure 64.** Différentes tailles des anthères (long, moyen et court) de *C. saharae*

L'ovaire vert, glabre est atténué à la base. Il comprend 6 à 8 ovules ; il est très comprimé, puis atténué en style plus court que lui ; style fortement incurvé, terminé par un stigmate, à peine oblique (Figure.65).



**Figure 65.** Ovaire de *C. saharae* (vue détaillée de l'ovule)

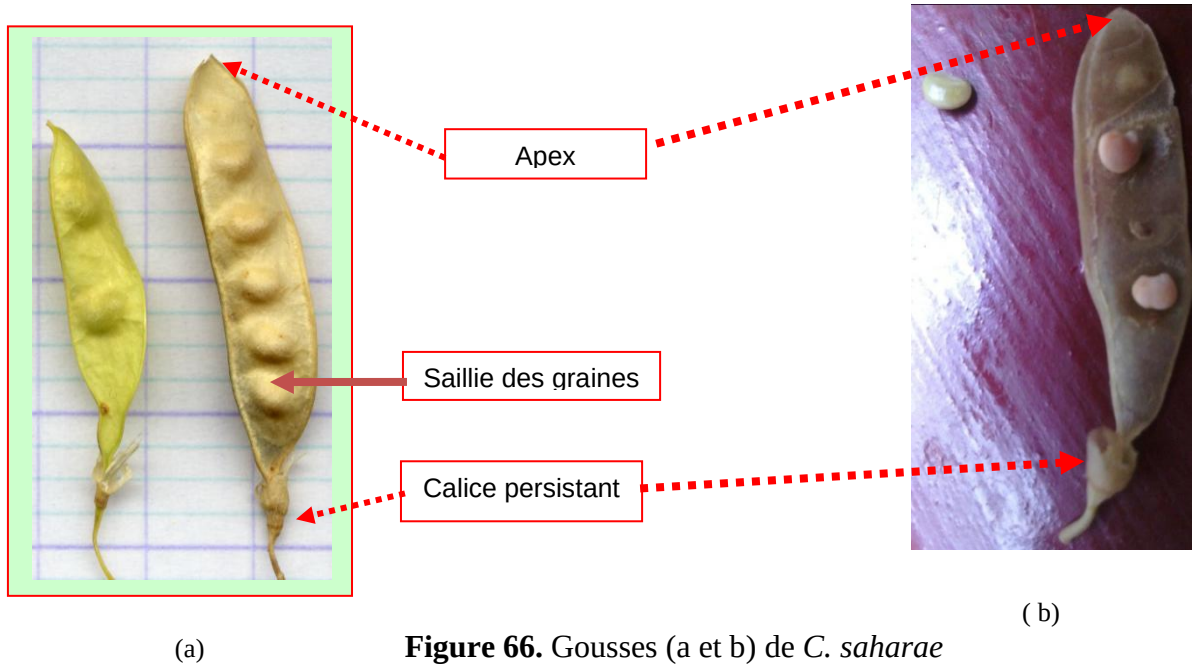
#### 1.2.2.4. Le Fruit

Le fruit est une gousse dont les dimensions ont fait l'objet de mensurations précises sur la base d'un échantillon de 50 individus.

Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant :

Sur le plan morphologique, la gousse est glabre, très aplatie, atténuée et stipitée à la base, arrondi et brièvement apiculée au sommet par la base persistante du style indéhiscence.

La gousse est toruleuse par la saillie des graines et renferme habituellement 2 à 5 graines ; le calice est persistant sur la base du fruit (Figure.66 a).



**Figure 66.** Gousses (a et b) de *C. saharae*

(a) : Gousses de 2 à 5 graines avec un calice est persistant sur la base du fruit  
(b) : Gousses dont l'orientation hilaire est opposé à la base du calice

Les graines de *Calobota saharae* sont orientées perpendiculairement par rapport au placenta, ce qui la caractérise du genre *Lebeckia* (Figure .66 b). Un échantillon représentatif de 50 graines d'un même individu a fait l'objet d'une mensuration, les résultats sont exposés au paragraphe suivant.

Les graines sont plus ou moins réniformes, de couleur brun marron, lisse et comprimées, de dimensions moyennes comprise entre 2,6-3 x 2-2,25 mm, déprimées vers le hile (Figure.67).



**Figure 67.** Graines de *calobota saharae*

#### 1.2.2.5. Racines

Le genêt saharien possède de puissantes racines très profondes de plus de 3 mètres de profondeurs. Malgré tous nos efforts nous n'avons pas pu atteindre la profondeur limite des racines. Cette plante possède 3 types de racines (Meriane. et Kaabeche,2012) (Figure.68).

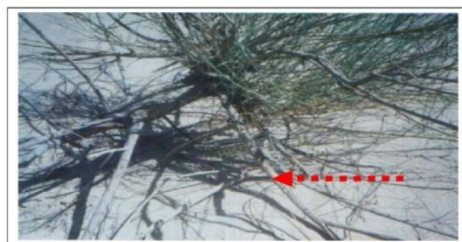
- Des racines principales pivotantes
- Des racines secondaires peu profondes (moins de 1 m de profondeur) très allongées
- Des racines stolonifères souvent à la surface du sol



Racines secondaires



Racine principale



Racines stolonifères

**Figure 68.** Différentes formes des racines de *C. saharae*

*Calobota saharae*, grâce a son système racinaire à la fois traçant et pivotant, semble mieux valoriser les faibles précipitations qui apparaissent occasionnellement dans cette région saharienne. Pourvue des feuilles réduites en écailles, cette espèce n'a qu'une surface transpirante réduite, lui permettant d'ajuster son transfert hydrique tout en restant active sur le plan photosynthétique durant presque toute l'année. Ce taxon constitue ainsi une certaine réserve pastorale pour les animaux, et par son aptitude à fixer l'azote atmosphérique, contribue à l'amélioration de la fertilité du sol (Abdallah *et al.*, 2003).

#### 1.3. Biométrie

Une analyse statistique des mensurations des feuilles et des fruits, a été réalisée au cours du Magistère et a permis d'observer une taille de feuille réduite. En effet, l'analyse d'un échantillon représentatif constitué par 50 feuilles (mensuration de la longueur et de la largeur

des feuilles) d'un même individu fait apparaître les résultats suivants (Annexes : Tableau. Mensuration des feuilles et des gousses) :

La longueur maximale est de 15 mm, la longueur minimale est de 5 mm  
2 feuilles ont une longueur supérieure ou égale à 150 mm  
17 feuilles ont une longueur comprise entre 5 mm et 9 mm  
27 feuilles ont une longueur comprise entre 10 mm et 149 mm  
La largeur maximale est de 6 mm, le minimal est de 2 mm.

Il a également été observé que la moyenne du nombre de graines par gousse est de 2.

Le nombre maximum de graines est égal à 5. Il n'y a pas de proportionnalité entre le nombre de graines par gousse et les dimensions de la gousse. Par exemple, pour une gousse de largeur maximum et de longueur minimum, le nombre de graine peut être égal à 1. Ceci s'explique par le fait que tous les ovules d'une même gousse, quelles que soient les dimensions de cette gousse, ne sont pas fécondés et avortent. Cette situation peut être due à un certain nombre de facteurs d'ordre biologique ou écologique comme par exemple une sécheresse trop élevée ou un taux d'humidité trop bas (Meriane. et Kaabeche .2012).

#### **1.4. Analyse pédologique**

Les analyses pédologiques ont été réalisées dans le cadre du Magistère et ont porté sur l'étude du sol dunaire de Boussaâda. Les résultats de ces études sont brièvement rapportés ici

L'étude menée sur les caractères physico-chimique des sols dunaire de Boussaâda (Oued el Maïther ), première du genre à notre connaissance sur le cordon dunaire montre que ces sols à texture sableuses sont caractérisés par un pH neutre légèrement basique, une conductivité légèrement importante (sols moyennement salés) .Par ailleurs, l'analyse chimique a révélé une teneur faible en éléments nutritifs qui est un critère commun aux sols des zones arides et semi arides) en particulier en potassium et en phosphore , par contre l'azote fait défaut voir (Annexe : Tableau. Analyses pédologiques).

#### **1.5. Liste des échantillons analysés**

Les organes suivants ont été récoltés : organes végétatifs (racines et rameaux) et organes reproducteurs (fleurs et fruits). Tous ces organes de la plante ont été séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière après l'étude des caractères morphologiques et les paramètres biométriques. Un spécimen d'herbier a été déposé au Musée de Matière médicale F. Tillequin au sein de la faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Descartes.

Les échantillons de l'année 2009-2010 (Tableau 14) ont été utilisés pour l'étude dans ma thèse de doctorat sont : (E1), (E2), (E3), (E4), (E5), (E6) et (E7).

**Tableau 14.** Echantillons de *Calobota saharae* récoltés pendant différentes saisons

| Numéro                    | Parties de la plante | Période de récolte |
|---------------------------|----------------------|--------------------|
| Echantillon numéro1 (E1)  | Racines              | Aout 2009          |
| Echantillon numéro2 (E2)  | Racines              | Mars 2010          |
| Echantillon numéro3 (E3)  | Rameaux              | Aout 2009          |
| Echantillon numéro4 (E4)  | Rameaux              | Mars 2010          |
| Echantillon numéro5 (E5)  | Fleurs               | Mars 2010          |
| Echantillon numéro6 (E6)  | Téguments            | Aout 2009          |
| Echantillon numéro7 (E7)  | Graines              | Aout 2009          |
| Echantillon numéro7 (E7a) | Graines              | Aout 2009          |



## CHAPITRE II : ANALYSES PHYTOCHIMIQUES

Pour l'analyse phytochimique de *C. saharae* ((Coss. et Dur.) Boatwr. et B.E.van Wyk), nous avons débuté par l'analyse des alcaloïdes. Nous nous sommes basés sur les travaux antérieurs réalisés au cours du Magistère, qui sont portés sur le dosage de l'azote total et des alcaloïdes totaux. Nous avons, au cours de ce travail de doctorat, entrepris l'étude plus précise des alcaloïdes de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk) à travers une analyse par chromatographie couche mince (CCM) puis par Chromatographie en Phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) de l'extrait alcaloïdique.

Par la suite, l'étude de la composition polyphénolique a été entreprise par une analyse par Chromatographie couche mince, un dosage des flavonoïdes totaux et des polyphénols totaux. Le fractionnement puis l'isolement de composés phénoliques a également été entreprise.

### 1. Alcaloïdes

#### 1.1. Dosage de l'azote total de la partie aérienne et souterraine de la plante

. Le dosage de l'azote total au niveau de la partie aérienne de la plante est rapporté pour la première fois. Les résultats obtenus indiquent que *Calobota saharae* ((Coss. et Dur.) Boatwr. et B.E.van Wyk) contient une quantité très importante de taux de protéine qui varie entre 10% (rameaux) et 32% (graines).

Ces résultats nous permettent d'observer que cette richesse en protéines des graines constitue un élément important à signaler : en effet, ces graines peuvent être utilisées comme un apport en fourrage supplémentaire.

Les résultats obtenus montrent que le sol est très pauvre en azote. La détermination des teneurs en azote des racines en présence ou non de la rhizosphère confirme ces résultats. En effet, la teneur en azote des racines sans rhizosphère est égale à environ deux fois celle des racines avec rhizosphère. L'analyse des différents organes de la plante montre un enrichissement en azote qui atteint son maximum au niveau des graines voir (Annexe : Tableau. Dosage de l'azote total de *C. saharae* ((Coss. et Dur.) Boatwr. et B.E.van Wyk).

L'explication de cet enrichissement en azote ne peut être due à un prélèvement direct au niveau du sol qui est très pauvre. La fixation symbiotique de l'azote par cette légumineuse peut expliquer cet enrichissement.



## **1.2. Dosage des alcaloïdes totaux**

Les alcaloïdes qui se trouvent au niveau des extraits des organes (rameaux, fleurs, graines, péricarpes) ont été détectés au niveau du Laboratoire de Toxicologie et avec l'aide du Professeur BOUZIDI. Nous avons utilisé le réactif de Dragendorff qui a donné un précipité rouge brique au contact de l'extrait brut. Les alcaloïdes extraits du *Calobota saharae* ((Coss. et Dur.)Boatwr. et B.E.van Wyk) se caractérisent par leur odeur caractéristique proche de celle du « henné ». Ils présentent une couleur verdâtre et offre un aspect huileux, liquide à la température ambiante même après avoir séjournés au réfrigérateur.

### **1.2.1. Extraction des alcaloïdes totaux**

Les propriétés basiques des alcaloïdes et les solubilités différentielles qu'ils présentent avec leurs sels sont mises à profit lors de leur extraction.

Deux cas principaux se présentent :

- Alcaloïdes volatils entraînable par la vapeur d'eau : ils sont déplacés de leurs combinaisons naturelles par une base fixe (chaux, soude, magnésie), directement à partir de la plante, puis entraînés par la vapeur d'eau. Après condensation, ils se séparent de la partie aqueuse du distillat à laquelle ils ne sont pas miscibles. Sont obtenues de la sorte la nicotine du tabac ou la spartéine du genêt.
- Alcaloïdes fixes : la plante est traitée par de l'eau ou un alcool (éthanol à 70 p. 100, méthanol) en présence d'acide qui entraîne les alcaloïdes sous forme de sels solubles. La solution extractive est séparée, éventuellement concentrée, et alcalinisée par de la soude ou de l'ammoniaque qui libère les alcaloïdes. Ceux-ci sont alors repris par un solvant organique non miscible à l'eau.

Un second procédé pour déplacer les alcaloïdes consiste à ajouter un agent alcalin directement à la plante, et les alcaloïdes libérés sont récupérés en traitant le tout par un solvant organique.

### **1.2.2. Méthode utilisée dans l'extraction des alcaloïdes**

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des différentes parties aériennes de la plante (rameaux, fleurs, graines et péricarpe de la gousse) a été réalisée par l'appareil de soxhlet après la mouture de la matière végétale sous forme de poudre et traitement par de l'ammoniaque, le solvant utilisé étant l'acétate d'éthyle.

### 1.2.3. Rendements en alcaloïdes totaux

Les rendements sont présentés dans le tableau ci-dessous. Le rendement moyen est de 1,59% (rameaux), 1,32% (péricarpes) par contre il est de 0,46% (Fleur) et de 0,75% (Graine) (Tableau 15).

Le rendement le plus élevé se situe au niveau des rameaux et des téguments du fruit. Par contre, ce rendement est plus faible au niveau des organes reproducteurs (fleur) et des organes de réserve (graine). Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans la bibliographie qui signalent que ce sont les parties vertes de la plante qui accumulent le plus d'alcaloïdes. L'étude quantitative des alcaloïdes par M. Rideau et J-C Chexieux, Confirme la faible teneur en alcaloïdes tertiaires des pétales et surtout des étamines. Feuilles et sépales en renferment une quantité au moins dix fois plus importante. Les pédoncules et les carpelles occupent une position intermédiaire. Les organes chlorophylliens (feuilles, sépales, carpelles) diffèrent des organes non chlorophylliens (pétales, étamines), d'une part, par une teneur en alcaloïdes nettement supérieure (Rideau. et Chexieux 1978).

La plante *Calobota saharae* (Coss et Dur.) Boatwrt et B.E.van Wyk considérée comme alcaloïdifique selon les travaux de Paris et Moyse en 1976 puisque sa teneur en alcaloïdes est suffisamment élevée ( $>1/1000$ ) (Paris. et Moyse en 1976).

**Tableau 15.** Teneurs en alcaloïdes totaux (10 g de la pesée d'essai ; les alcaloïdes totaux sont exprimés en %).

| Echantillons    | E1" % | E2" % | E3" % | E4" % | Rendement moyen % |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| Rameaux de Mars | 1,70  | 1,84  | 1,81  | 1,01  | 1.59              |
| Fleurs          | 0,46  | 0,48  | 0,47  | 0,43  | 0.46              |
| Graines         | 0,433 | 0,933 | 0,783 | 0,866 | 0.75              |
| Téguments       | 1,6   | 1,15  | 1,05  | 1,12  | 1.32              |

### 1.3. Analyses par CCM des alcaloïdes

#### 1.3.1. Extraction et analyse des alcaloïdes par Chromatographie sur Couche Mince

Afin de déterminer les meilleures conditions d'extraction alcaloïdiques de nos échantillons, nous avons réalisé deux types d'extraction. La première décrite dans la littérature par Bourquin et al., consiste à extraire les alcaloïdes par du méthanol puis traiter la phase méthanolique par une base, les alcaloïdes étant ensuite extraits par de l'éther diéthylique (Extraction type I) La seconde extraction est une extraction classique des alcaloïdes qui consiste à traiter la matière végétale par une base (ammoniaque dilué), puis extraire les alcaloïdes par du dichlorométhane (extraction type II).

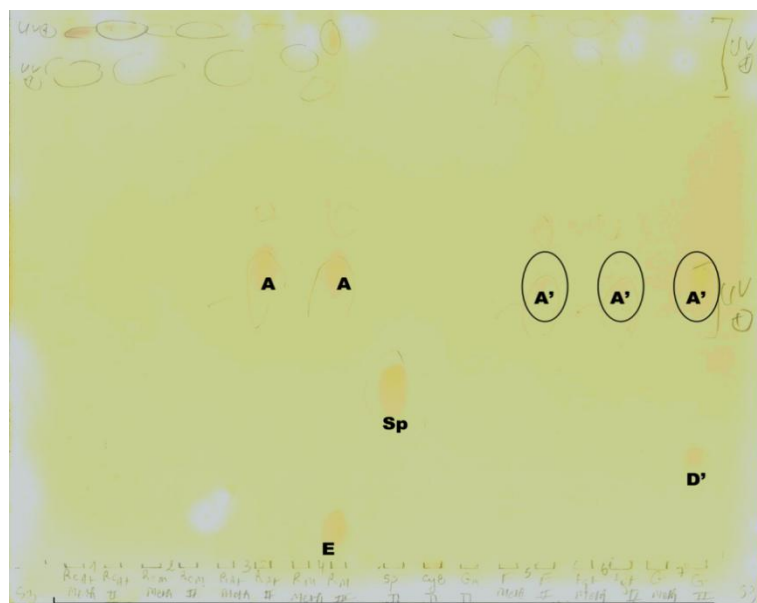
Ces deux types d'extraction ont été réalisés à partir des 7 échantillons. Les extraits ainsi obtenus ont été déposés sur plaque de chromatographie couche mince. Pour chaque échantillon, l'extrait de type I a été déposé à côté de l'extrait de type II (voir tableau 16). Des témoins d'alcaloïdes isolés d'espèces de *Calobota* ont également été déposés : sulfate de spartéine, picrate de cytosine et cytosine basique. Le système de solvants utilisé est le mélange dichlorométhane, méthanol, acide acétique glacial (47,5 : 47,5 : 5, v/v/v).

**Tableau 16.** Dépôts des échantillons pour chaque type d'extractions (TypeI, TypeII)

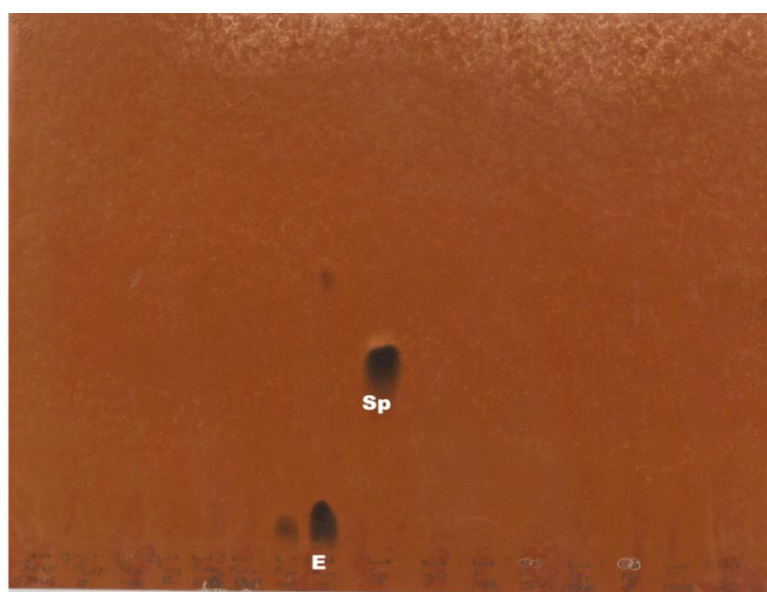
|                   |                    |                 |                    |
|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 1 Racines d'aout  | Extraction type I  | 4' Rameaux mars | Extraction type II |
| 1' Racines d'aout | Extraction type II | 5 Fleurs        | Extraction type I  |
| 2 Racines mars    | Extraction type I  | 5' Fleurs       | Extraction type II |
| 2' Racines mars   | Extraction type II | 6 Téguments     | Extraction type I  |
| 3 Rameaux d'aout  | Extraction type I  | 6' Téguments    | Extraction type II |
| 3' Rameaux d'aout | Extraction type II | 7 Graines       | Extraction type I  |
| 4 Rameaux mars    | Extraction type I  | 7' Graines      | Extraction type II |

La visualisation des alcaloïdes n'a pas été aisée et a nécessité l'utilisation de plusieurs révélateurs afin de pouvoir tous les observer. L'observation dans le visible ne montre aucune tâche. Sous UV, une seule tâche est observée (A') à un Rf d'environ 0.5, ainsi que des tâches au front de solvant. Les premiers révélateurs utilisés ont été le réactif de Dragendorff, puis l'iodoplatinate, révélateurs spécifique des alcaloïdes (Figure.69) et (Figure.70). Ils ont permis de bien visualiser le témoin spartéine. Une tâche importante (E) est observée pour l'extrait

alcaloïdique 4' (rameaux mois de mars – type II).

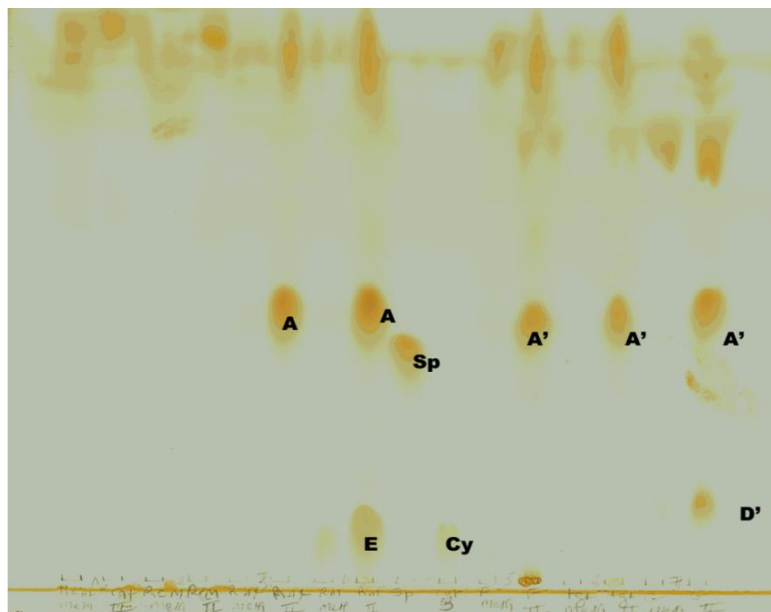


**Figure 69.** CCM récapitulative révélation Dragendorff

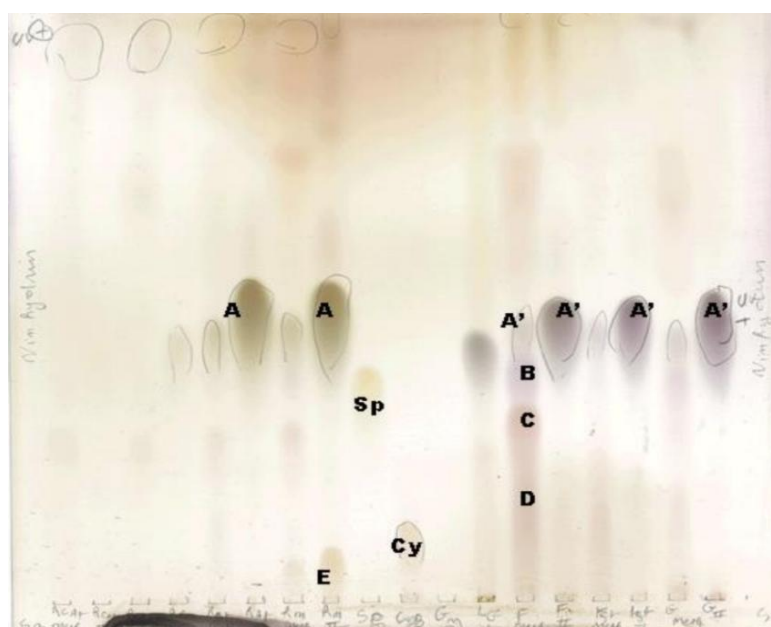


**Figure 70.** CCM récapitulative révélateur Iodoplatinate

Compte-tenu de la faible sensibilité des réactifs utilisés, nous avons choisi d'utiliser des révélateurs non spécifiques : l'iode puis la ninhydrine (Figure.71) et (Figure.72)



**Figure 71.** CCM Récapitulative, révélateur : Iode



**Figure 72 .** CCM récapitulativerévélateur : la ninhydrine

La cytosine est alors visualisée, ainsi que les autres tâches présentes. Au total, 5 tâches ont été visualisées : A, et A' présentes au même Rf mais seul A' est visible sous UV. B, C et D ne sont visibles qu'avec la ninhydrine, (Figure.72) et la tache E a été visualisée avec les quatre révélateurs mentionnés auparavant.

### 1.3.2. Identification de l'ammodendrine par Chromatographie sur Couche Mince

Une seconde chromatographie couche mince a été entreprise en utilisant un témoin ammodendrine du laboratoire et un témoin isoflavone, suite à son isolement à partir du matériel végétal (voir Isolement). La préparation des extraits a été réalisée selon le type II.

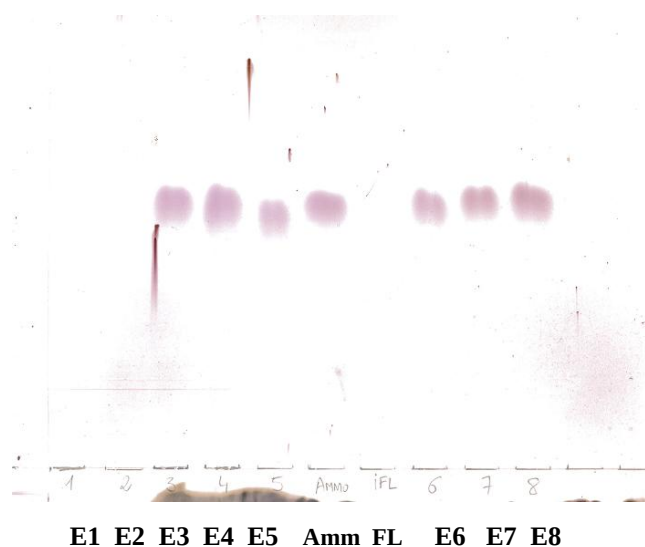
Un seul dépôt a été réalisé pour chaque échantillon (Tableau 17).

**Tableau 17.** Dépôts d'échantillons réalisés selon l'extraction type II

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| 1 Racines d'aout        | Extraction type II |
| 2 Racines mars          | Extraction type II |
| 3 Rameaux d'aout        | Extraction type II |
| 4 Rameaux mars          | Extraction type II |
| 5 Fleurs                | Extraction type II |
| Témoin Ammodendrine     | 4mg/ml             |
| Témoin Isoflavone       | 1 mg/ml            |
| 6 Tégument              | Extraction type II |
| 7 Graine dégraissée     | Extraction type II |
| 8 Graine non dégraissée | Extraction type II |

Le système de solvant est identique à celui utilisé précédemment : mélange dichlorométhane, méthanol, acide acétique glacial (47,5 : 47,5 : 5, v/v/v). La révélation a été réalisée directement avec la ninhydrine, qui avait permis de bien visualiser les alcaloïdes lors des essais précédents.

Dans cette seconde plaque (Figure.73), l'ammmodendrine est identifiée à un Rf d'environ 0.5, elle est donc identifiée dans la majorité des échantillons, mais pas dans les racines récoltées en mars et en décembre (dépôts 1 et 2).



**Figure 73.** Plaque de CCM récapitulative montrant la présence de l'ammmodendrine dans la majorité des échantillons ; révélateur : la ninhydrine

La plaque précédente montre néanmoins que les racines du mois de mars contiennent des traces d'ammодendrine dans l'extraction de type II (dépôt 2'). Il se peut que les dépôts réalisés pour cette seconde plaque soient un peu moins concentrés que les dépôts précédents et ne permettent pas de visualiser ces traces d'ammодendrine.

Une analyse plus précise de la fraction alcaloïdique a été ensuite réalisée par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS).

### 1.3.3 Analyse et identifications des différents extraits alcaloïdiques par CPG-MS

Les extraits alcaloïdiques de type II ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'identification des composés isolés pour chaque chromatogramme (Tableau18) a été réalisée par comparaison aux bases de données NIST 98 et Wiley 275.

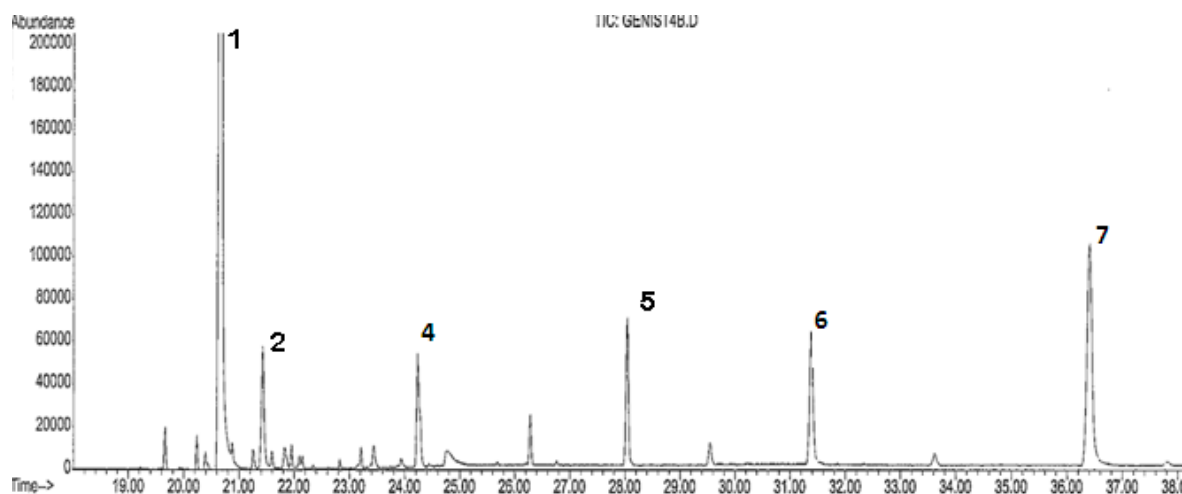
Les chromatogrammes ont été enregistrés de 0 à 52 minutes. Ils sont présentés ci-dessous (Figures.74-79).

Les composés identifiés sont des alcaloïdes, des alcanes et un ester d'acide gras

**Tableau 18.** Identifications des alcaloïdes par GC-MS dans les différents échantillons de *Calobota saharae*

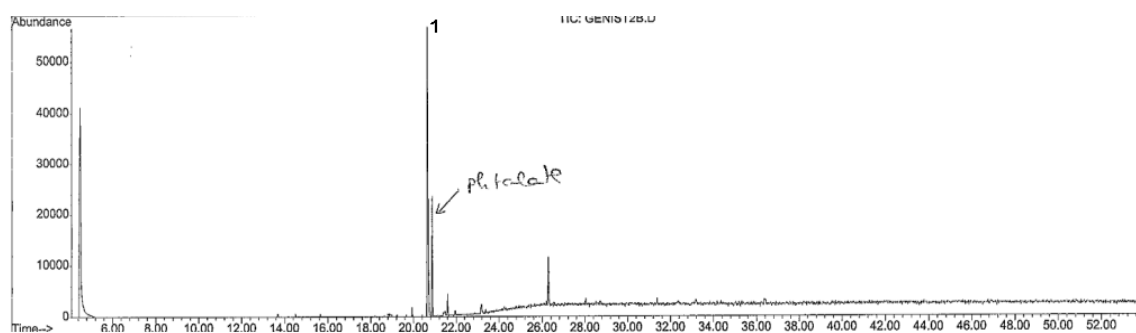
|   | Composés identifiés  | Ts (min)        | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 |
|---|----------------------|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | Ammодendrine         | 20.63-<br>20.67 | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 2 | N-Acethylhystrine    | 21.42           | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| 3 | Linoleate de méthyle | 22.09           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 4 | N-formylammодendrine | 24.22           | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| 5 | Heptacosane          | 28.04           | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| 6 | Nanocosane           | 31.38           | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| 7 | Tricosane            | 36.40           | -  | -  |    | +  | -  | -  | -  |
| 8 | Hentiacontane        | 36.44-<br>36.46 | -  | -  |    | -  | +  | +  | -  |

L'extrait alcaloïdique des rameaux du mois de mars (E4) est celui qui contient le plus d'alcaloïdes (Figure.74) :



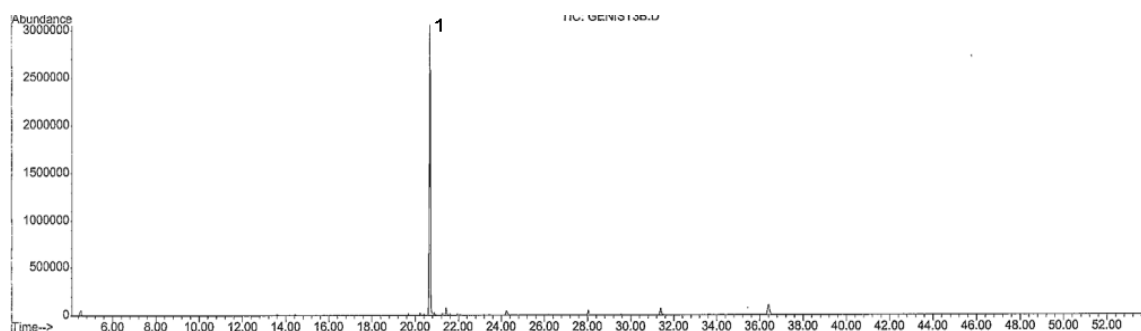
**Figure 74.** Chromatogramme de l'extrait des rameaux mars de *C. saharae typeII* (E4) –  
Agrandissement (temps de 19.00min à 36.00 min)

La comparaison des autres extraits est présentée ci-dessous :



E2

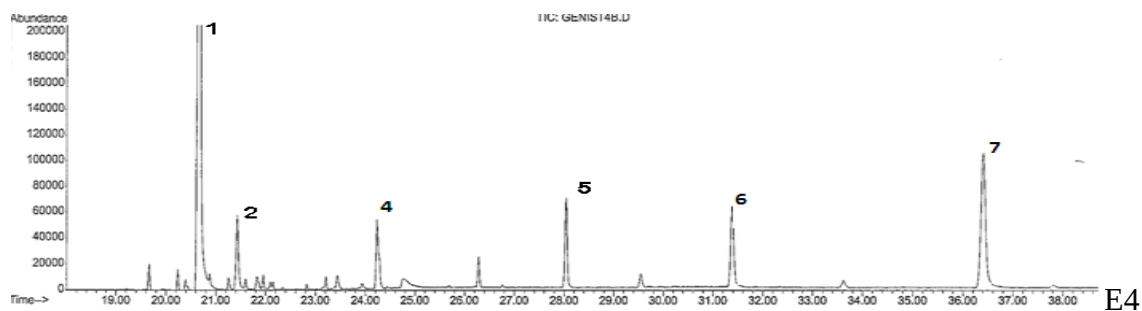
**Figure 75 :** Chromatogramme de l'extrait des racines mars de *C. saharae typeII*(E2)



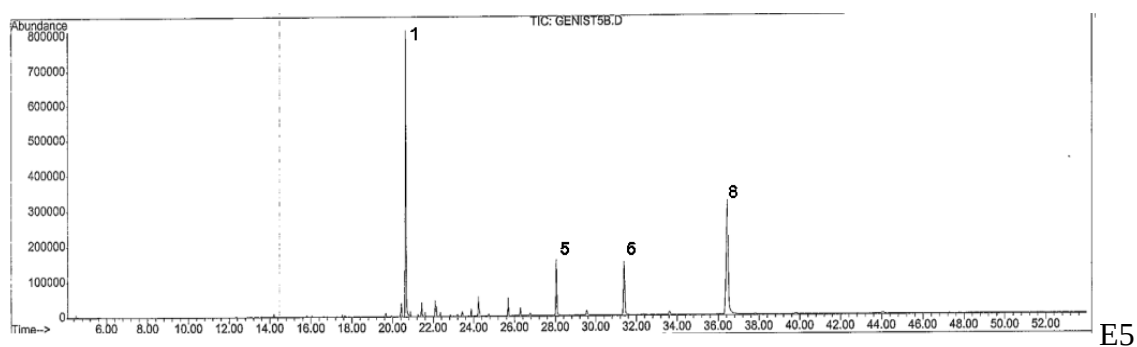
E3

**Figure 76.** Chromatogramme de l'extrait des rameaux d'aout de *C. saharae typeII*(E3)

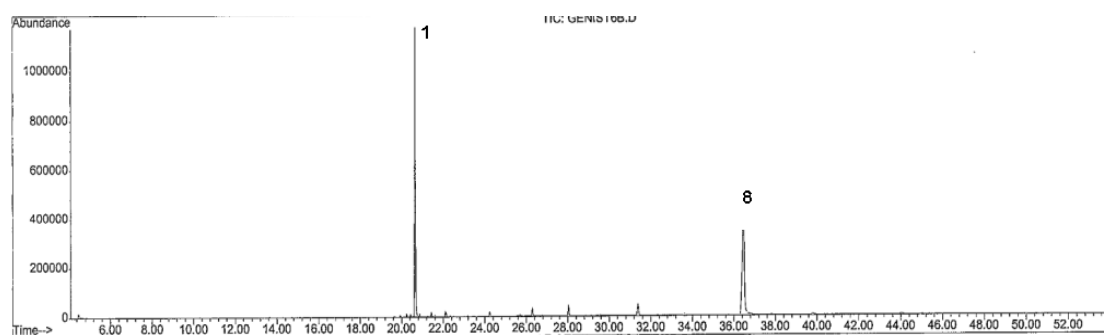




**Figure 74\*.** Chromatogramme de l'extrait des rameaux d'aout de *C. saharae* typeII (E4)

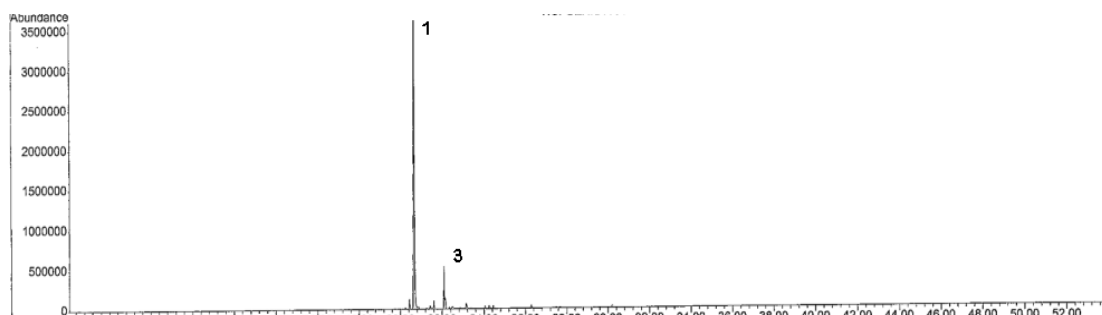


**Figure 77.**Chromatogramme de l'extrait des fleurde *C saharae* typeII(E5)



E6

**Figure 78.** Chromatogramme de l'extrait des teguments de *C. saharae* typeII(E6)



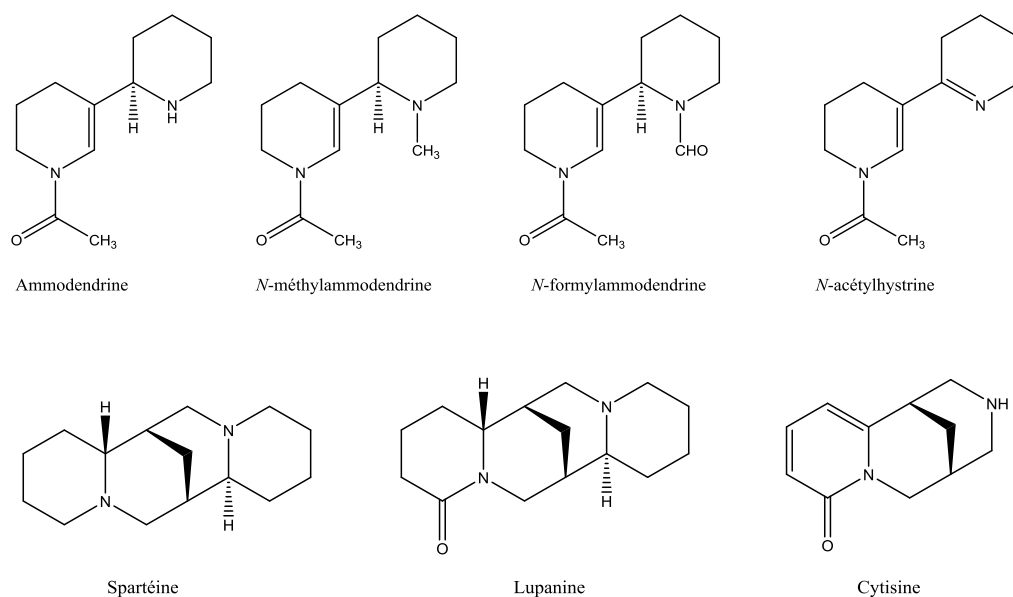
E7

**Figure 79.** Chromatogramme de l'extrait des graines de *C. saharae* typeII(E7)

Au total, 3 alcaloïdes pipéridiniques ont été identifiés au sein de nos échantillons : ammodendrine, N-acétylhystrine et N-formylammodendrine. L'ammodendrine est l'alcaloïde majoritaire et a été détectée dans toutes les parties de la plante, mais n'est pas détectée dans les racines du mois de décembre. Les rameaux collectés en mars contiennent le plus d'alcaloïdes. Les fleurs, contiennent de l'ammodendrine, mais surtout des alcanes.

La comparaison avec les travaux antérieurs d'analyses phytochimiques décrits pour *Calobota saharae* (identifié comme *Spartidium saharae* par Bourquin et al. et *Genista saharae* par Abdelhalim et al., montre des compositions alcaloïdiques variables, notamment dans les types d'alcaloïdes .

Bourquin et al. décrivent la présence de 4 alcaloïdes de type pipéridinique mais aussi de 3 alcaloïdes de type quinolizidinique, dans les parties aériennes de spécimens de la région de Ghardaïa (Algérie). Les travaux de Van Wyk et al., réalisés sur des échantillons marocains et libyens rapportent la présence de 2 alcaloïdes pipéridiniques uniquement, et de traces de spartéine, seul alcaloïde quinolizidinique identifié (Figure 80).



**Figure 80.** Structure des alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques identifiés chez *C. saharae*

La présence de N-formyl ammodendrine a été identifiée à l'état de traces pour la première fois par Abdel-Halim et al. Dans une étude portant sur les parties aériennes d'un échantillon lybien. Il décrit uniquement la présence de 3 alcaloïdes pipéridiniques : ammodendrine, N-formylammodendrine et N-acétylhystrine (Tableau 19).

**Tableau 19.** Composition et distribution des alcaloïdes de *C. saharae* dans différentes régions selon les auteurs.

| Composés identifiés                 | Bourquin et al. 1987 | Abdelhalim et al. 2000 | Van Wyk et al. 1989     | Van Wyk et al. 1989      | Travaux personnels        |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                                     | Parties aériennes    | Parties aériennes      | Feuilles et rameaux     | Fleurs et jeunes gousses | Rameaux mars E4           |
|                                     | Algérie - Ghardaïa   | Libye-Tripoli          | Maroc – Duel el Kherona | Libye – Gebel Nefoussa   | Boussaâda Oued El Maadher |
| <i>Alcaloides pipéridiniques</i>    | +                    | +                      | +                       | +                        | +                         |
| <b>Ammodendrine</b>                 | +                    | +                      | +                       | +                        | +                         |
| <b>N-méthylammodendrine</b>         | +                    | -                      | -                       | -                        | -                         |
| <b>N-formylammodendrine</b>         | -                    | <b>+</b> (trace)       | +                       | +                        | +                         |
| <b>N-Acethylhystrine</b>            | +                    | +                      | -                       | -                        | +                         |
| <b>Anabasine</b>                    | +                    | -                      | -                       | -                        | -                         |
| <i>Alcaloides quinolizidiniques</i> | +                    |                        |                         |                          |                           |
| <b>Spartéine</b>                    | +                    | -                      | <b>+</b> (traces)       | <b>+</b> (traces)        | -                         |
| <b>Lupanine</b>                     | +                    | -                      | -                       | -                        | -                         |
| <b>Cytisine</b>                     | +                    | -                      | -                       | -                        | -                         |
| <i>Autres Cinnamoyl histamines</i>  |                      |                        |                         |                          |                           |

## 2. Polyphénols

Nous avons ensuite envisagé de nous intéresser aux composés phénoliques. Nous avons dans un premier temps effectué le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux, puis nous avons caractérisés ces derniers par chromatographie couche mince. Enfin, nous avons réalisé une chromatographie préparative afin d'isoler les principaux composés phénoliques.

### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par méthode de **Folin-Ciocalteu**. Cette dernière est utilisée, notamment pour le dosage des polyphénols de plusieurs drogues végétales inscrites à la Pharmacopée Française (ANSM, 1993). Nous nous sommes basés sur la monographie du Kinkéliba (feuille).

. Le % en polyphénols totaux dans les extraits est ensuite calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Selon la formule suivante : \% poly phénol total} = \frac{13,12 \times A1}{A2 \times m} \times 100$$

m : Prise d'essai en gramme.

A1 : Absorbance à 715nm 2 min après la dernière addition de réactif.

A2 : Absorbance à 715nm 2min après la dernière addition de réactif et dans les 15min qui suivent la dissolution du pyrogallol.

### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Concernant le dosage des flavonoïdes, la méthode de référence est également décrite à la Pharmacopée. Nous nous sommes basés sur la monographie des fleurs de Carthame de la Pharmacopée Européenne. Elle met en jeu le chlorure d'aluminium. La teneur est calculée selon la formule ci-dessous :

% :  $\frac{A}{m}$

A : Absorbance de la solution à examiner

m : La prise d'essai en gramme

Les résultats obtenus concernant le dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes pour les différentes parties sont rapportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 20).

**Tableau 20.** Teneur de polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits de *C. saharae*

| <b>Teneurs<br/>échantillons</b> | <b>Teneur en<br/>polyphénols<br/>totaux (%)</b> | <b>Teneur en<br/>flavonoïdes (%)</b> |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Racines d'aout                  | 9,328+/-0,217                                   | 2,441+/-0,012                        |
| Racines de mars                 | 5,490+/-0,198                                   | 0,212+/-0,014                        |
| Rameaux d'aout                  | 5,799+/-0,148                                   | 0,213+/-0,022                        |
| Rameaux de mars                 | 6,809+/-0,106                                   | 0,924+/-0,012                        |
| Fleurs                          | 9,067+/-0,144                                   | 2,614+/-0,028                        |
| Téguments                       | 5,062+/-0,163                                   | 1,273+/-0,012                        |
| Graines dégraissées             | 1,996+/-0,163                                   | 0,518+/-0,016                        |

Remarque : En prenant 400 nm comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hyperoside à 420nm

La teneur en flavonoïdes varie de 0.212 à 2.614%, et la teneur en polyphenols totaux de 1.996 à 9.328% Les teneurs les plus élevées sont observées pour les échantillons de racines collectées au mois d'Aout et celui de fleurs collectées au mois de mars.

Concernant ces teneurs élevées dans les racines, il est bien connu que les Fabaceae produisent des flavonoïdes au sein de la rhizosphère pour stimuler la production de facteurs de nodulation (*Nod* factors). Il est à noter que la teneur en flavonoïdes au sein des racines collectées en aout est 10 fois plus élevée que celles des racines collectées en mars, ce qui implique que le processus de nodulation est plus important à cette période.

Concernant la richesse en flavonoïdes et polyphénols des fleurs, il est également connu que le taux de transcription des gènes impliqués dans cette biogénèse est élevé à ce stade phénologique (Cheynier *et al.*,2013) (Zhang *et al.*,2009).

### 2.3. Analyse par Chromatographie Couche Mince

Afin de mieux identifier ces composés phénoliques, une analyse par chromatographie couche mince a été envisagée. Les deux types d'extraits obtenus précédemment (type I et type II), ont été analysés par chromatographie couche mince afin de mettre en évidence la présence des composés phénoliques dans les échantillons de *Calobota saharae* (Tableau 21).

Nous avons utilisé comme témoin le 7-*O*-glucoside de lutéoline, un hétéroside de flavonoïde.

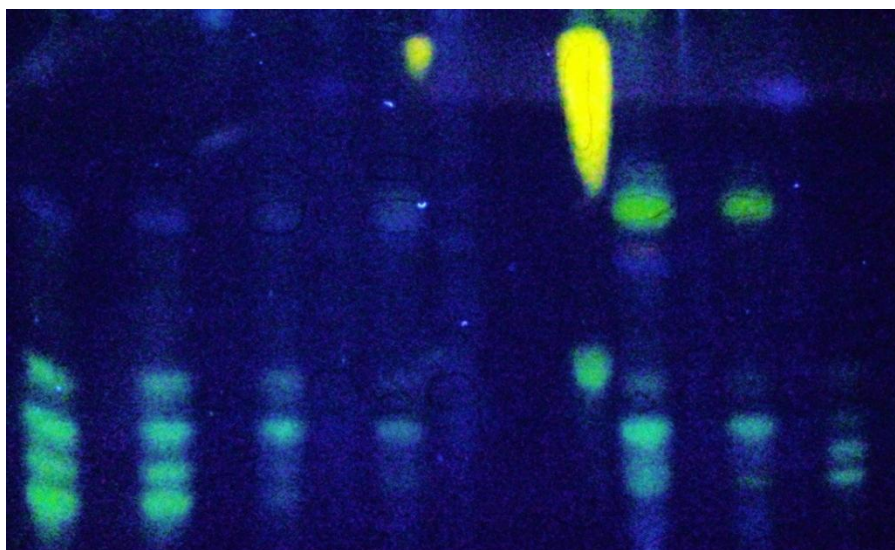
**Tableau 21.** Dépôts des échantillons pour chaque type d'extractions (Type1, Type11)

|                   |                    |                 |                    |
|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 1 Racines d'aout  | Extraction type I  | 4' Rameaux mars | Extraction type II |
| 1' Racines d'aout | Extraction type II | 5 Fleurs        | Extraction type I  |
| 2 Racines mars    | Extraction type I  | 5' Fleurs       | Extraction type II |
| 2' Racines mars   | Extraction type II | 6 Téguments     | Extraction type I  |
| 3 Rameaux d'aout  | Extraction type I  | 6' Téguments    | Extraction type II |
| 3' Rameaux d'aout | Extraction type II | 7 Graines       | Extraction type I  |
| 4 Rameaux mars    | Extraction type I  | 7' Graines      | Extraction type II |

La visualisation des flavonoïdes n'a pas été aisée et a nécessité l'utilisation deux révélateurs afin de pouvoir tous les observer.

Le système de solvant utilisé est un système classique d'élution des composés phénoliques : Acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique glacial : eau (100 :11 :11 :26) (SA). La révélation de la plaque a été réalisée à l'aide du réactif de Neu mettant en œuvre deux réactifs successifs : une solution de diphényl boryl ethylamine à 1% dans le méthanol (D.B.E.A) en premier puis une solution de et polyéthylèneglycol à 5% (P.E.G). Les plaques ont été observées à l'UV à 254 nm puis à 365 nm après révélation.

Les flavonoïdes apparaissent sous forme d'une fluorescence jaune, jaune orange, orange et verdâtre tandis que les acides phénols apparaissent sous forme d'une fluorescence bleue, bleu-violet à bleu-verdâtre (Figure. 81).



**Figure 81.** Plaque CCM des extraits type I et type II des échantillons de *C saharae*  
Migration : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100 :11 :11 :26)  
Révélateurs : 1/ DBEA 2/ PEG)

Nous observons les flavonoïdes sous forme de fluorescence jaune. Le témoin 7-O-glucoside de lutéoline apparaît à un Rf de 0.8. Il est très concentré. Les racines collectées au mois d'août et les fleurs, apparaissent bien contenir une quantité plus élevée que les autres échantillons. Nous observons dans les racines 4 tâches jaunes, identifiées également dans les racines collectées en mars mais, ceux-ci apparaissent de manière moins intense.

## **2.4. Extraction purification et analyse des flavonoïdes par chromatographie liquide haute performance préparative (CLHP).**

Afin d'isoler les constituants de *C. saharae* en vue de leur identification précise, nous avons envisagé un fractionnement par chromatographie liquide haute performance préparative. Cette méthode chromatographique consiste à séparer de manière quantitative les constituants présents au sein d'un extrait après injection sur une colonne chromatographique de type phase inverse (silice greffée C-18). Une pompe haute pression permet d'injecter la phase mobile permettant la séparation des constituants au sein de la colonne.

La CLHP peut fonctionner en mode analytique ou préparatif. Le mode analytique sert à analyser des extraits et nécessite des faibles quantités d'extrait en solution injecté en très faible volume (20 µL en général). Le mode préparatif sert à injecter une quantité importante d'extrait (centaine de mg au gramme) afin d'isoler les constituants présents dans l'extrait. Le mode analytique sert à analyser des extraits et nécessite des faibles quantités d'extrait en solution. Dans ce cas là, les fractions issues de la séparation des constituants de l'extrait par la colonne sont collectées à la sortie de la colonne. Le suivi de ce fractionnement peut se faire par chromatographie couche mince. Nous avons choisi de réaliser ce fractionnement sur l'extrait méthanolique des racines.

### **2.4.1. Fractionnement de l'extrait méthanolique des racines (mars) de *C. saharae***

#### **2.4.1.1 Préparation de l'extrait**

28 g des racines récoltées en mars broyées (poudre) sont placées dans un appareil de Soxhlet avec 250 ml de méthanol. L'extraction a été menée pendant 3 heures. Après refroidissement, la solution extractive (filtration sous hôte) a été récupérée puis évaporée à sec pour fournir 2 grammes d'extrait méthanolique (la différence de pesée du ballon vide et du ballon contenant le produit sec).

La totalité de l'extrait a été utilisée pour le fractionnement.

#### 2.4.1.2 Fractionnement par CLHP préparative.

2g de l'extrait méthanolique ont été résolubilisés dans 10 ml de méthanol. La solution a été filtrée puis injectée dans l'appareil de Chromatographie Liquide à Haute Performance. La colonne utilisée est de type C-18 (phase inverse). La phase mobile utilisée a consisté en un gradient d'eau et de méthanol. Nous avons démarré avec de l'eau (100%) pour augmenter progressivement la fraction de méthanol dans cette phase mobile, par palier de 5 à 10%.

Les différentes fractions récupérées dans les tubes sont séchées puis pesées, leurs masses sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (Tableau 22).

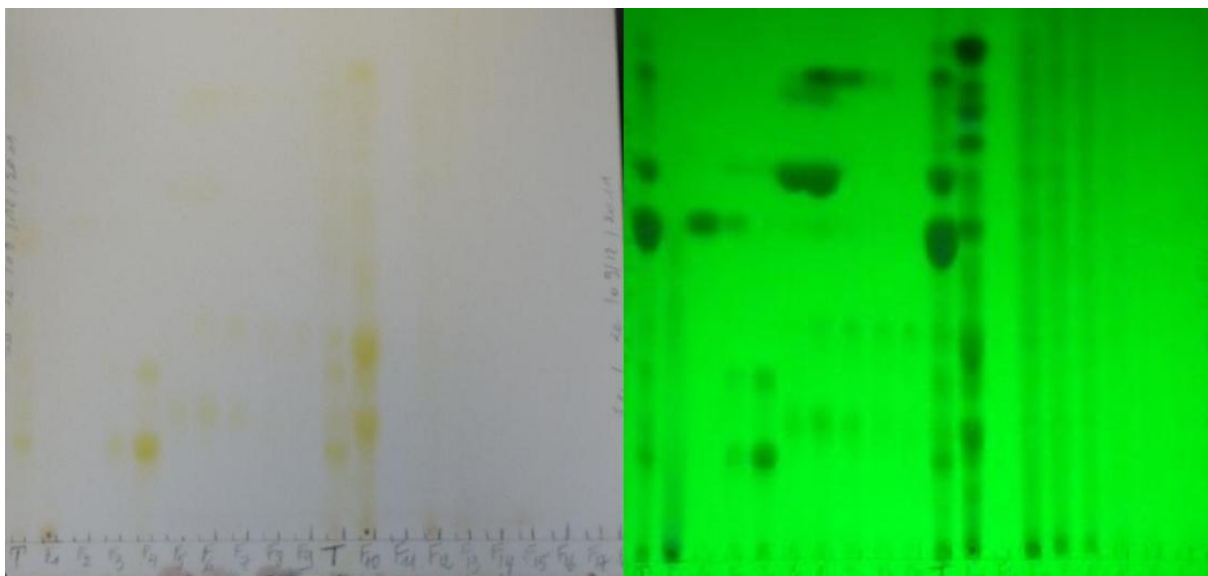
**Tableau 22.** Masse des fractions issues de la CLHP préparative (extrait méthanolique racines de mars de *C..saharae*)

| Fraction HPLC  |  | Masse des fractions | Fraction HPLC   | Masse des fractions |
|----------------|--|---------------------|-----------------|---------------------|
| F <sub>0</sub> |  | Témoin (2g)         | F <sub>10</sub> | 60 mg               |
| F <sub>1</sub> |  | 420 mg              | F <sub>11</sub> | 69mg                |
| F <sub>2</sub> |  | 320 mg              | F <sub>12</sub> | 102,3 mg            |
| F <sub>3</sub> |  | 71,2 mg             | F <sub>13</sub> | 126,2 mg            |
| F <sub>4</sub> |  | 80,8 mg             | F <sub>14</sub> | 127,7 mg            |
| F <sub>5</sub> |  | 78 mg               | F <sub>15</sub> | 100,9 mg            |
| F <sub>6</sub> |  | 125,3 mg            | F <sub>16</sub> | 82 mg               |
| F <sub>7</sub> |  | 75,4 mg             | F <sub>17</sub> | 71,4 mg             |
| F <sub>8</sub> |  | 72 mg               | F <sub>18</sub> | 70,4 mg             |
| F <sub>9</sub> |  | 70,7 mg             | F <sub>19</sub> | 70,8 mg             |

#### 2.4.1.3. Analyse des fractions CLHP des racines de *C. saharae* par CCM

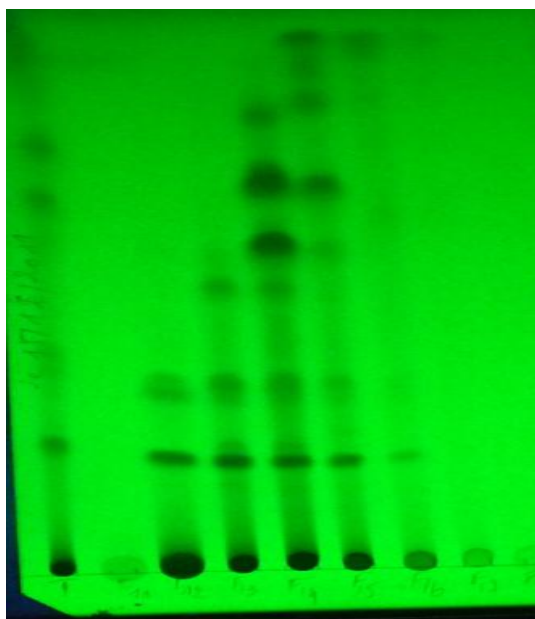
Les différentes fractions obtenues en HPLC ont été analysées par chromatographie couche mince afin de visualiser les composés présents au sein de chaque fraction. L'extrait méthanolique a été déposé comme témoin (T) ainsi que chacune des fractions. Le système de solvant utilisé le système SB : acétate d'éthyle, méthanol, eau 77 /15 /8) (Figure. 82).





**Figure 82.** CCM. Suivi du fractionnement par HPLC de l'extait methanolique des racines de *C. saharae*– Solvant SB

Afin de mieux visualiser les composés des fractions F11 à 18, un autre système a été préparé (SD)<sub>1</sub>:CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>/MeOH, 95 /5 v/v (Figure.83).

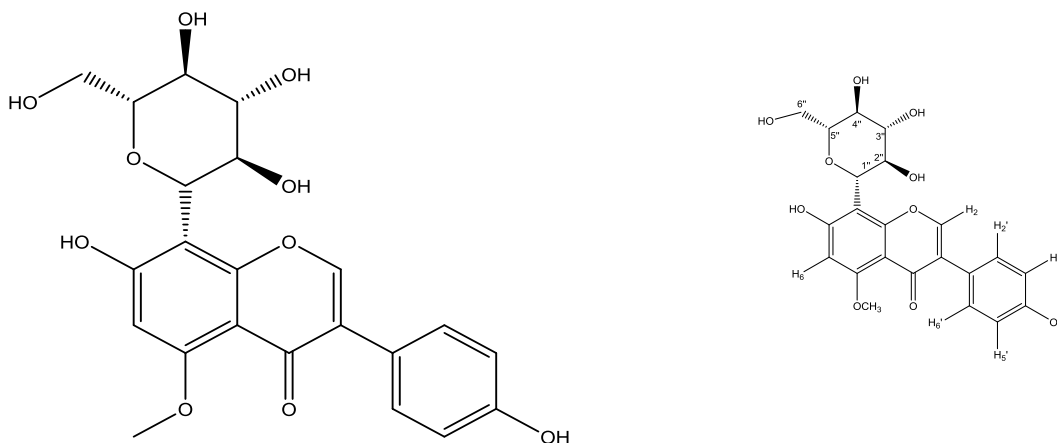


**Figure 83.** CCM des fractions HPLC (F<sub>12-19</sub>) racines de mars de *C.saharae* – solvant(SD)<sub>1</sub>

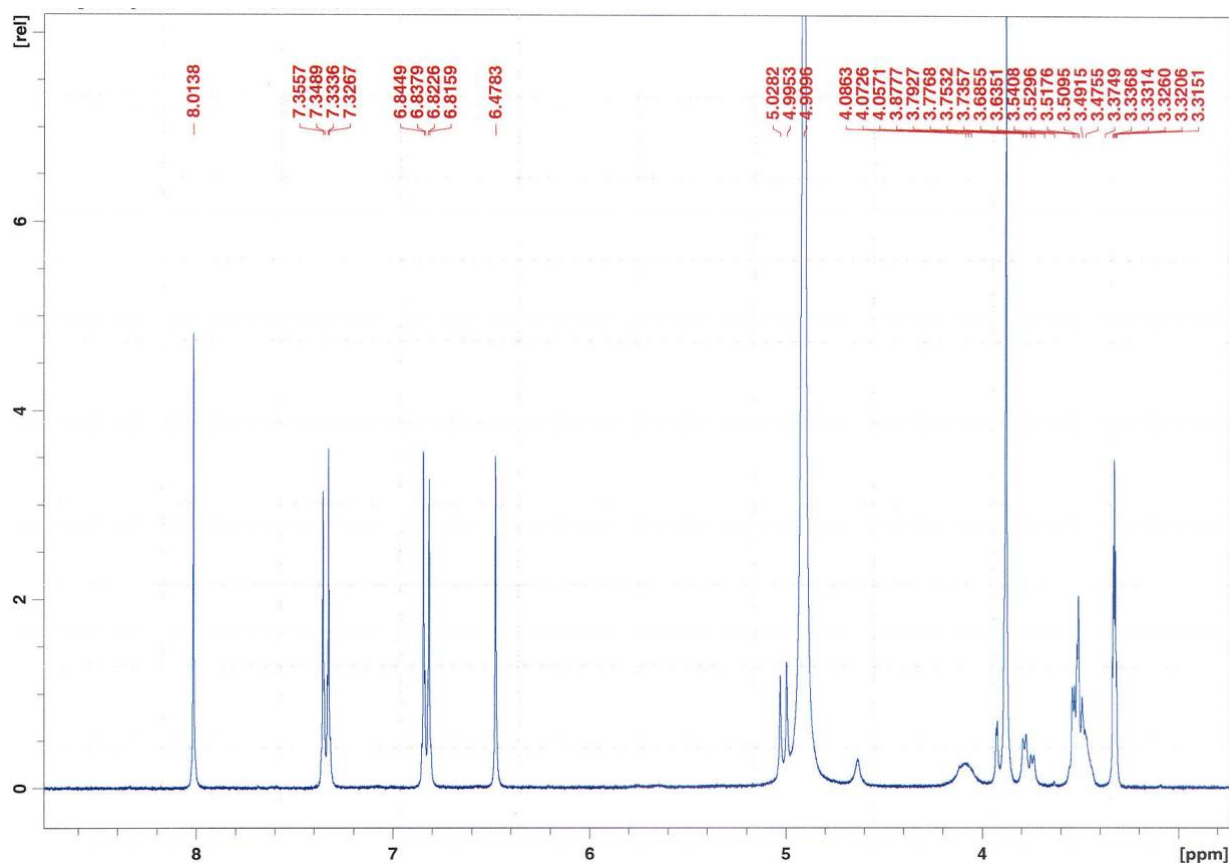
L'analyse des différentes fractions nous permet de voir que la fraction F2 contient un produit pur. Une analyse structurale de ce composé est donc envisagée. Concernant les autres fractions, des tâches majoritaires sont visualisées, néanmoins, afin d'identifier précisément ces composés, une purification supplémentaire est nécessaire.

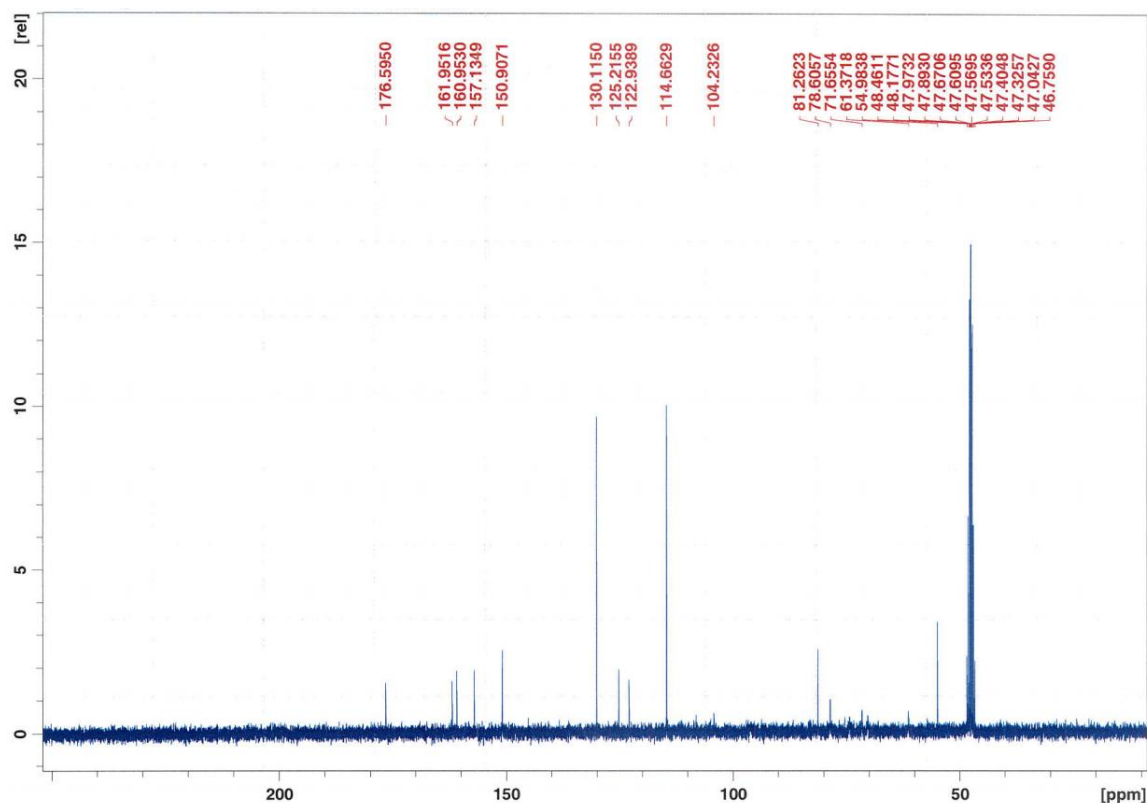
#### 2.4.1.4 Analyse structurale du composé F2

L'analyse par RMN du composé pur présent dans la fraction F2 (figure 84) ; montre que le spectre RMN du proton de ce composé est identique à celui de l'isoflavone précédemment isolée par Benayache et al 2005. Des rameaux de *C. saharae*. Il s'agit de la 5-O-Methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (**5OMeC8CG**).



**Figure 84.** Structure du composé F2 (Structure de la 5-O-Methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine (**5OMeC8CG**))





**Figure 85.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé pur présent dans la fraction 2 (F2)

## 2.4.2. Fractionnement de l'extrait méthanolique de fleurs de *C. saharae*

### 2.4.2.1 Préparation de l'extrait méthanolique

L'extraction des fleurs a été réalisée par extraction méthanolique à chaud avec agitation dans un bain marie (même technique utiliser pour l'extrait méthanolique de racines (mars))

L'utilisation de l'appareil de Soxhlet n'a pas été envisagée.

Après évaporation à sec 7,4 grammes d'extrait méthanolique ont été fournis.

Seul 1g du produit methanolique sec (fleurs) ont été prélevés en vue d'être fractionnés.

### 2.4.2.2 Fractionnement par HPLC préparative

1g de l'extrait méthanolique ont été resolubilisés dans 5 ml de méthanol +5ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , après filtration l'extrait mis en solution a été injecté dans l'appareil de Chromatographie Liquide à Haute Performance. La colonne utilisée est de type C-18 (phase inverse). La phase mobile utilisée a consisté également en un gradient d'eau et de méthanol. Nous avons démarré avec de l'eau (100%) pour augmenter progressivement la fraction de méthanol dans cette phase mobile, par palier de 5 à 10%.

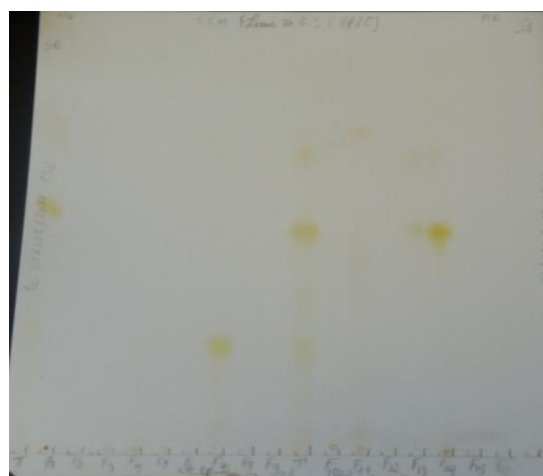
Les différentes fractions sont évaporées à sec puis pesées, leurs masses sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (Tableau 23).

**Tableau 23.** Masse des fractions issues de la CLHP préparative (extrait méthanolique des fleurs de Mars de *C. saharae*)

| Fraction HPLC  | Masse des fractions | Fraction HPLC   | Masse des fractions |
|----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| F <sub>0</sub> | Témoin              | F <sub>10</sub> | 18 mg               |
| F <sub>1</sub> | 420 mg              | F <sub>11</sub> | 25mg                |
| F <sub>2</sub> | 20 mg               | F <sub>12</sub> | 10mg                |
| F <sub>3</sub> | 18 mg               | F <sub>13</sub> | 13 mg               |
| F <sub>4</sub> | 27 mg               | F <sub>14</sub> | 14 mg               |
| F <sub>5</sub> | 12 mg               | F <sub>15</sub> |                     |
| F <sub>6</sub> | 10 mg               | F <sub>16</sub> |                     |
| F <sub>7</sub> | 22 mg               | F <sub>17</sub> |                     |
| F <sub>8</sub> | 17 mg               | F <sub>18</sub> |                     |
| F <sub>9</sub> | 24 mg               | F <sub>19</sub> |                     |

#### 2.4.2.3. Analyse des fractions CLHP de fleurs de *C. saharae* par CCM

Les différentes fractions obtenues en HPLC ont été analysées par chromatographie couche mince afin de visualiser les composés présents au sein de chaque fraction. L'extrait méthanolique a été déposé comme témoin (T) ainsi que chacune des fractions. Le système de solvant utilisé le système SB : acétate d'éthyle, méthanol, eau 77 /15 /8. (Figure.86) et (Figure.87).



**Figure 86.** CCM Suivi du fractionnement par HPLC de l'extait methanolique de fleurs de *C. saharae*– Solvant SB



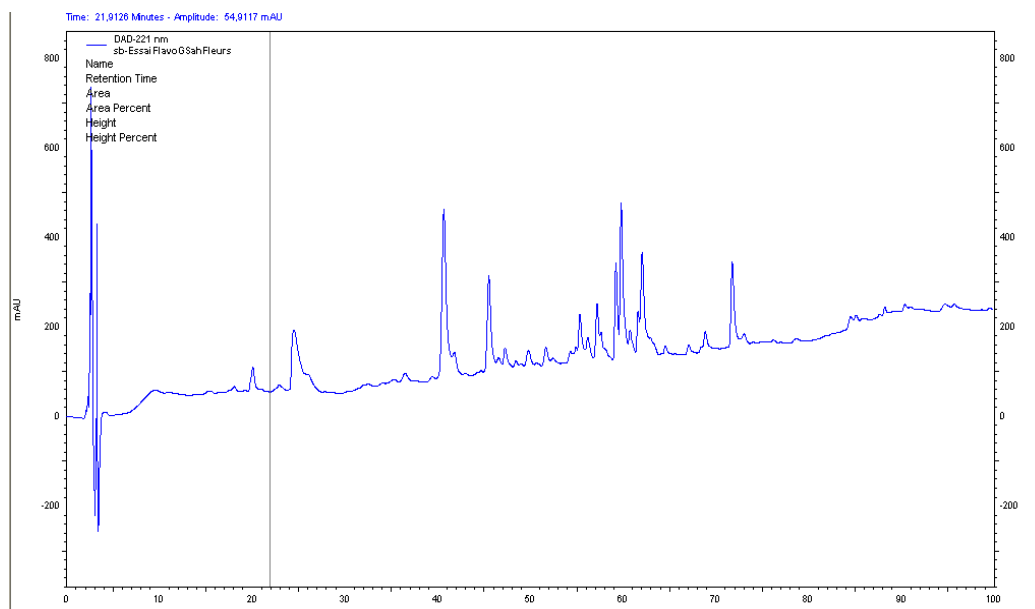
**Figure 87.** CCM Suivi des différentes fractions par HPLC de l'extrait méthanolique de fleurs de *C. saharae*– Solvant SB

## 2.5. Analyse par HPLC analytique des extraits méthanoliques de fleurs

Une analyse des extraits méthanoliques des fleurs a ensuite été entreprise en utilisant l'isoflavone isolée et la lutéoline-7-*O*-glucoside comme témoins. La méthode utilisée est basée sur les travaux de (Rauter *et al.*, 2005) ayant mis au point une méthode HPLC destinée à analyser un extrait de *Genista tenera*.

Cette méthode met en œuvre un gradient progressif débutant par une phase aqueuse acide (0.1% d'acide phosphorique) puis un mélange d'eau et d'acétonitrile 60/40 comprenant toujours 0.1% d'acide phosphorique.

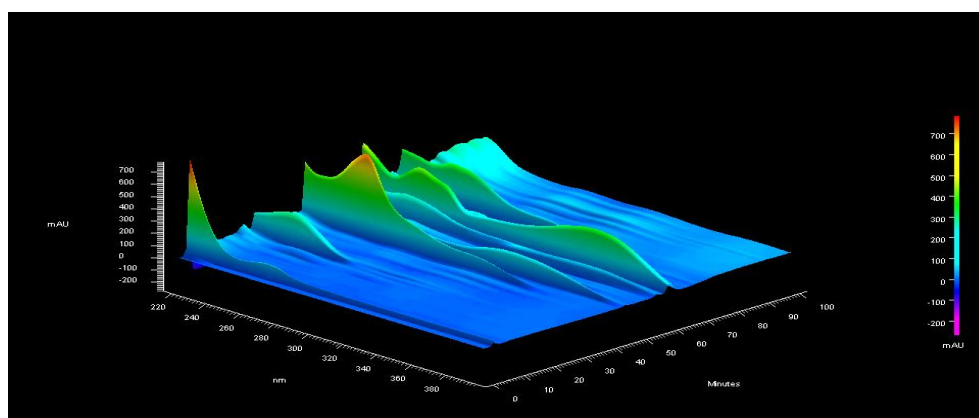
Nous avons appliqué cette méthode légèrement modifiée en utilisant l'acide formique au lieu de l'acide phosphorique. L'utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes est particulièrement intéressante dans le cas des flavonoïdes, compte-tenu de leurs spectres d'absorption spécifiques dans l'UV. En effet, ce type de détecteur peut mesurer des absorbances à plusieurs longueurs d'ondes en même temps et fournir ainsi un spectre UV simultanément pour chaque pic chromatographique. Les spectres UV de chaque composé peuvent être visualisés et on peut ainsi comparer aisément le pic chromatographique d'un extrait avec celui d'un composé de référence. Les témoins utilisés sont un *O*-hétéroside de flavone (7-*O*-glucoside de lutéoline) et un C-glycoside d'isoflavone. Les chromatogrammes de l'extrait méthanolique de fleurs sont présentés ci-dessous (Figure 88) :



**Figure 88.** Chromatogrammes 2D de l'extrait méthanolique des fleurs

Le chromatogramme 2D montre les pics chromatographiques identifiés à 220 nm (Figure.88)

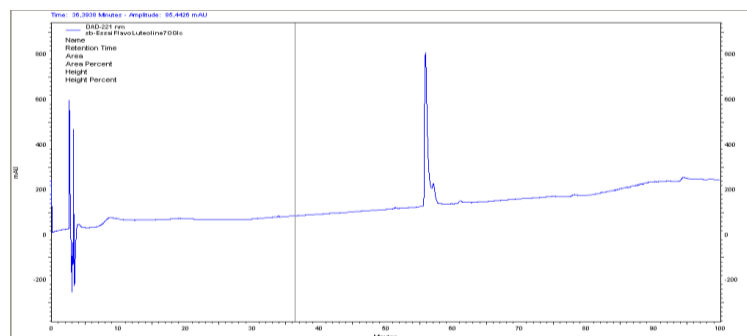
Le chromatogramme 3D ci-dessous permet de visualiser le spectre UV enregistré entre 220 et 400 nm pour chaque pic chromatographique (Figure.89).



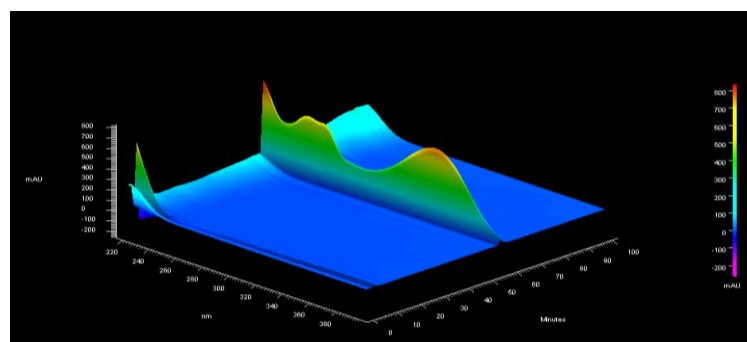
**Figure 89 .**Chromatogrammes3D de l'extrait méthanolique de fleurs

La comparaison avec les témoins permet de les identifier ou non sur le chromatogramme de l'extrait. L'isoflavone est détectée à un temps de rétention de 38.80 min alors que le 7-O-glucoside de lutéoline est détecté à un Tr de 55.92 min.

Le chromatogramme du témoin lutéoline -7-O-glucoside en 2D et en 3D sont présentés ci-dessous (Figure.90) et (Figure .91 ) (Rauter *et al.*, 2005).

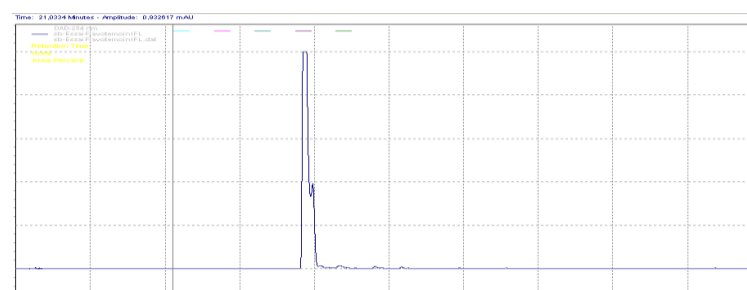


**Figure 90.** Chromatogrammes 2D du 7-O-glucoside de lutéoline

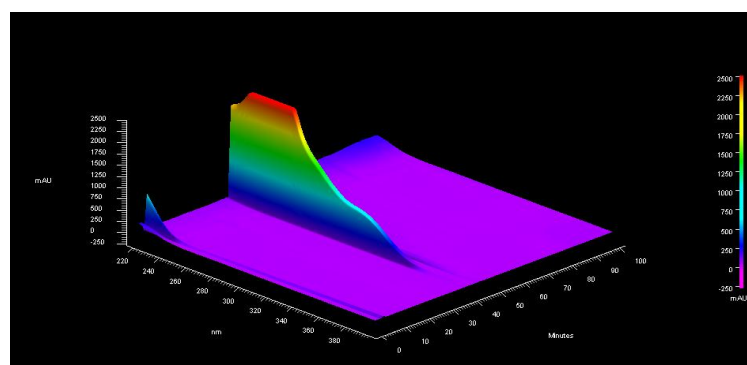


**Figure 91.** Chromatogrammes 3D du 7-O-glucoside de lutéoline

Le chromatogramme du témoin isoflavone en 2D et en 3D sont présentés ci-dessous (Figure. 92) et (Figure 93).



**Figure 92 .** Chromatogramme 2D de l'isoflavone



**Figure 93 .** Chromatogramme 3D de l'isoflavone

## CHAPITRE III : ACTIVITES BIOLOGIQUES

L'activité antioxydante des différents extraits issus de la plante étudiée en fonction des différentes saisons a été évaluée *in-vitro* par deux méthodes différentes :

- Le piégeage du radical libre DPPH
- Le test de bioautographie sur CCMHP

### 1. Evaluation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. Van.)) et analyse par CCM normale (Mise au point) :

En vue d'une étude de l'activité antiradicalaire des extraits de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)) par CCMHP (Chromatographie Couche Mince Haute Performance), une étude préliminaire sur plaque de CCM normale a été réalisée. Pour cela, les extraits méthanoliques des différents échantillons ont été préparés et déposés avec des témoins antioxydants de référence : le rutoside et la quercétine. L'isoflavone précédemment isolée a également été déposée.

#### 1.1. Préparation des extraits

Une extraction méthanolique a été menée en plaçant 10 g de chaque échantillon de *C. saharae* avec 100 mL de méthanol, pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons. Les extraits ont ensuite été filtrés et évaporés à sec. Les rendements d'extraction sont rapportés dans le tableau 24.

**Tableau 24.** Rendement des extraits méthanoliques secs de *C. Saharae*

| Echantillons | Periode de<br>recolte | Rendement<br>des extraits (%) |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|
| Racines      | Aout 2009             | <b>16.31</b>                  |
| Racines      | Mars 2010             | 8.78                          |
| Rameaux      | Aout 2009             | 10.93                         |
| Rameaux      | Mars 2010             | 15.07                         |
| Fleurs       | Mars2010              | <b>18.00</b>                  |
| Tegument     | Aout 2009             | 6.69                          |
| Graines      | Aoutt 2009            | 7.70                          |



## **1.2. Préparations des dépôts**

### **1.2.1. Extraits de *C. saharae***

Une solution mère à 10 mg/ ml (GS0) de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (E1) a été préparée. Des dilutions de cette solution mère ont été réalisées afin d'obtenir les solutions GS 1 (2.5 mg/ml), GS2 (5.0 mg/ml) et GS3 (7.5 mg/ml).

### **1.2.2. Témoins**

Les témoins utilisés sont : le rutoside et la quercétine et la 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine (**5OMeC8CG**) isolée. Une gamme de 5 concentrations des témoins a été préparée. A partir d'une solution mère S0 à 5mg/ml des dilutions ont été réalisées pour obtenir les concentrations S1 à S4 : 0.5mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, et 2 mg/ml.

### **1.2.3. Solution de 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

Une solution de **DPPH** à 0,05% a été préparée en solubilisant 100mg de poudre de DPPH dans 200.0 ml de MeOH ( fiole jaugée).

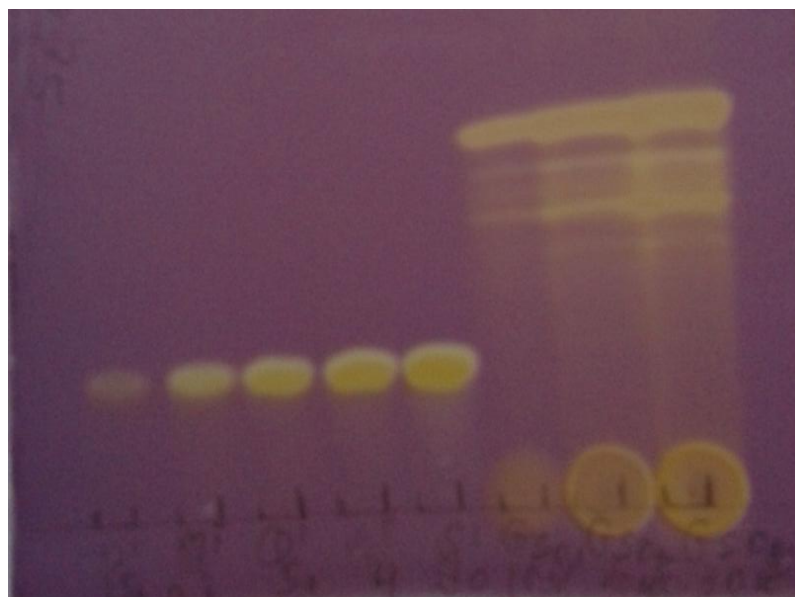
## **1.3. Migration et révélation des Plaques CCM**

L'éluions de nos plaques a été menée par des solvants polaires et apolaires (SAf, SBf, SE, SE' et SE'') respectivement : (Acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique, eau :100 /11/ 11/ 26) ;(Acétate d'éthyle, méthanol, eau :77/15/ 8) ; (Dichloromethane, méthanol : 90/10), (Dichloromethane, méthanol, acide formique : 90/10 :1) ; (Dichloromethane, méthanol, acide formique :90/5/5).

Les plaques ont été visualisées sous UV puis immergées dans une solution de **DPPH** à 0,05%, préparée en solubilisant 100 mg de poudre de DPPH dans 200.0 ml.

## **1.4. Résultats obtenus avec le témoin quercétine**

Le système de solvant ayant donné le meilleur résultat avec le témoin quercétine est le mélange Dichlorométhane / Méthanol / Acide formique (E'') 90 :5 :5 v/v/v. La gamme de concentration est correcte et permet de bien visualier l'activité antioxydante du témoin. Les 3 concentrations testées pour l'extrait permettent également de bien visualiser l'activité antioxydante. La concentration GS1 paraît un peu moins bien que les autres (Figure 94).



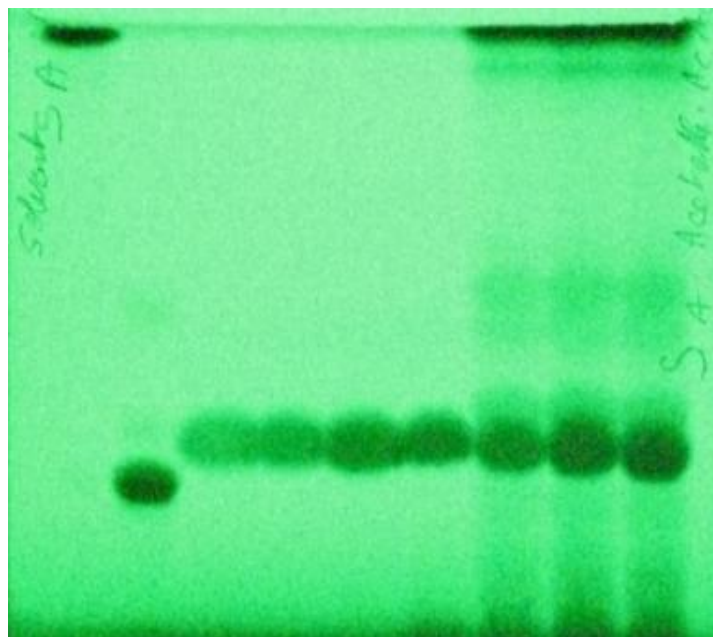
Quercétine (mg/ml)      Extraits Racines Aout de *C.saharae*  
QS1   QS2   QS3   QS4   QS0    GS1   GS2   GS3

**Figure 94.** Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (**E1**) de *C.saharae*  
 Migration : Dichlorométhane, Méthanol et Acide formique (**E''**) :90/5/5 ;  
 Révélateur : solution de **DPPH** à 0,05% ; Témoin : **Quercétine**.

Les molécules capables de piéger le DPPH dans sont plus apolaires que la quercétine et sont observées à des Rf autour de 0.75, ainsi que des composés plus polaires restés au niveau du point de dépôt (hétérosides ?).

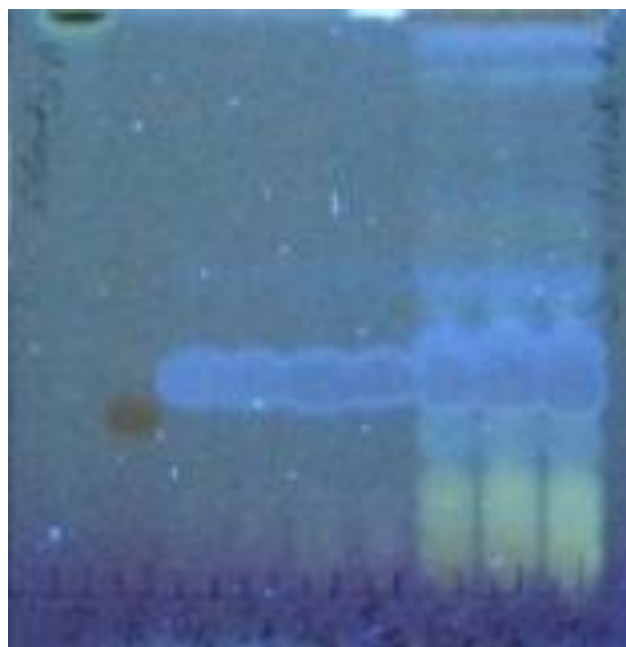
### 1.5. Résultats obtenus avec le témoin rutoside et la 5-O-methoxy-8-C- $\beta$ -D glucopyranosyl-génistéine (5OMeC8CG)

Le système de solvant ayant donné le meilleur résultat avec le témoin rutoside et et la 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-génistéine est le mélange (Acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique, eau : 100/11/11/26, v/v/v/v) (Figure.95) ;(Figure.96) et (Figure.97).



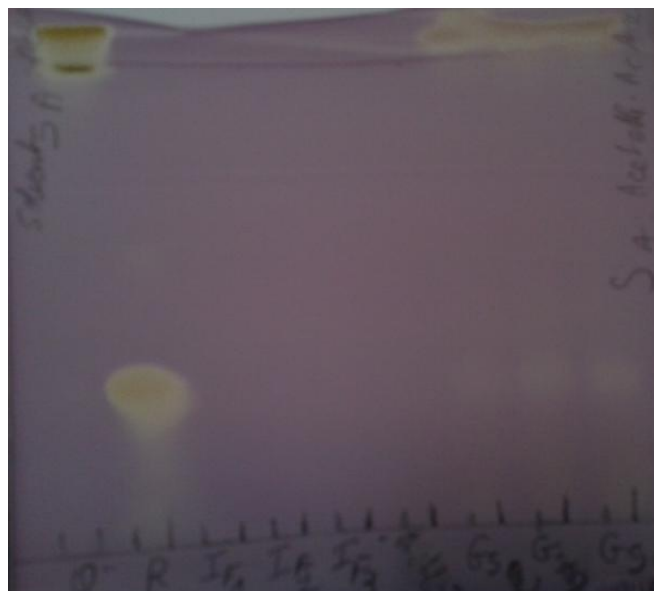
**Rutoside 5OMeC8CG Extraits racines de *C. saharae***  
**5mg/ml 0.5 1.0 1.5 2.0 (mg/ml) GS1 GS2 GS3**

**Figure 95.** Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (E1) de *C. saharae*  
 Migration : Acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique et eau (SAf) : 100/11/11/26  
 Révélateur : solution de **DPPH** à 0,05% ; Témoins : **Rutoside, 5OMeC8CG**



**Rutoside 5OMeC8CG Extraits racines de *C. saharae***  
**5mg/ml 0.5, 1.0 1.5 2.0 (mg/ml) GS1 GS2 GS3**

**Figure 96.** Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (E1) de *C. saharae*  
 Migration : Acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique et eau (SAf) : 100/11/11/26.  
 Révélateur : solution de **DPPH** à 0,05% ; Témoins : **Rutoside, 5OMeC8CG**



Rutoside 5OMeC8CG Extraits racines de *C. saharae*  
5mg/ml 0.5, 1.0 1.5 2.0 (mg/ml) GS1 GS2 GS3

**Figure 97.** Plaque de CCM de l'extrait méthanolique des racines d'Aout (**E1**) de *C. saharae*  
Migration : Acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique, eau : 100/11/11/26 (**SAf**) ;  
Révélateur : solution de **DPPH** à 0,05% ; Témoins : **Rutoside**, **5OMeC8CG**.

L'analyse de ces résultats préliminaires montre que les molécules capables de piéger le DPPH observées dans le système plus apolaire ont migré en front de solvant. Les plus polaires, situées au point de dépôt dans le système de solvant précédent, ont cette fois ci migré et se retrouvent à un Rf proche de celui de la 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine (**5OMeC8CG**). Cependant, le dépôt de la gamme étalon 5OMeC8CG isolée, montre qu'à aucune des concentrations déposées, la 5OMeC8CG n'est capable de piéger le radical DPPH. La molécule possédant cette activité antiradicalaire dans l'extrait n'est donc pas la 5OMeC8CG.

## 2. Evaluation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Calobota saharae* par bioautographie sur CCMHP

La séparation des composés a été effectuée en utilisant du gel de silice CCMHP plaques de 60 F254 de 200 × 100 mm obtenu auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne).

### 2.1. Préparations des dépôts

Les dépôts ont été les suivants : 2 µg de chaque échantillon de *C. saharae* ont été appliqués sur les plaques comme suit : racines Août (piste 1), les racines Mars (piste 2) ; rameaux (banches) Août (piste 3); rameaux (Branches) Mars (piste 4) ; fleurs (piste 5) ;

tégument des graines (piste 6); graines (piste 7). Les molécules pures quercétine (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) et 5OMeC8CG (piste 8) ont également été déposées.

## 2.2. Eluant

Les deux phases mobiles qui ont été retenues lors de la mise au point précédente ont été utilisées :

- Une phase mobile « apolaire », **SD** (dichlorométhane-méthanol 95: 5, v / v.) et une phase mobile polaire **SAf** : (acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique- eau 100 : 11 : 11: 26, v / v / v ).

## 2.3. Mise en œuvre

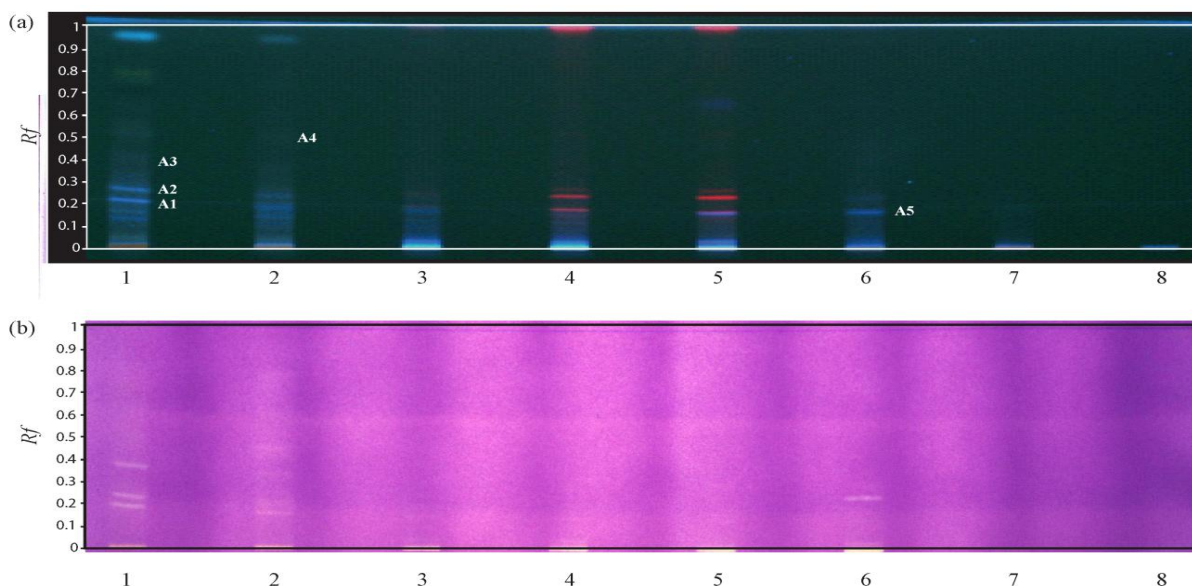
Trois plaques identiques ont été réalisées pour chaque système de solvant.

La première pour dérivatisation avec le réactif de Neu (2-aminoethyldiphenyl borate ), la seconde pour la bioautographie au DPPH, et la troisième pour le prélèvement des composés chromatographiés en vue de leur analyse de masse (interface HPTLC-MS).

Après élution, et séchage à 40 ° C pendant 5 min sur un appareil de chauffage CAMAG plaque TLC.

Les deux plaques destinées à la dérivatisation ont été pulvérisées avec le réactif de Neu (2-aminoethyldiphenyl borate ). Les deux plaques destinées à la bioautographie ont été préalablement observées sous UV. Pulvérisées avec une solution à 0,05% de DPPH (Figure.98) et (Figure.99).

## 2.4. Résultats obtenus avec la phase mobile apolaire

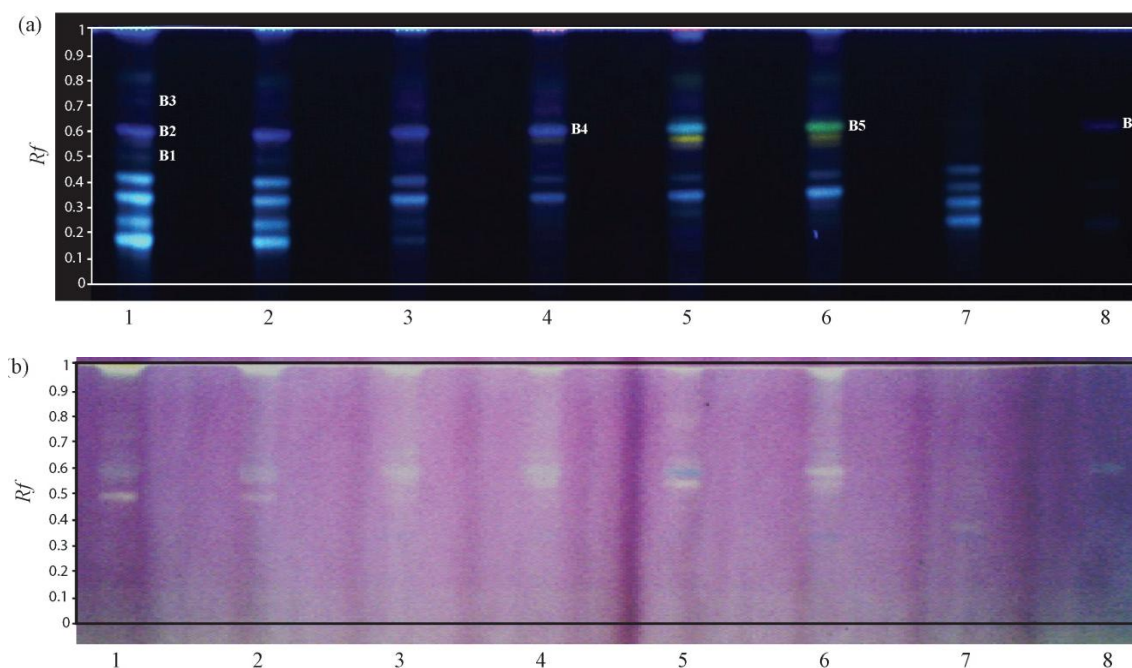


**Figure 98.** Analyse CCMHP : Pistes 1-7 :extraits methanoliques des sept glycopyranosyl isoflavone les echantillons(7) de *C.saharae* . Piste 8 :isoflavone purifié (5-methoxy-4',7-trihydroxy-8

(a) : CCMHP :détection à 366nm après dérivatisation avec 2-aminoethyldiphenyl borate ;

(b) : photo de plaque avec DPPH.

## 2.5. Résultats obtenus avec la phase mobile polaire



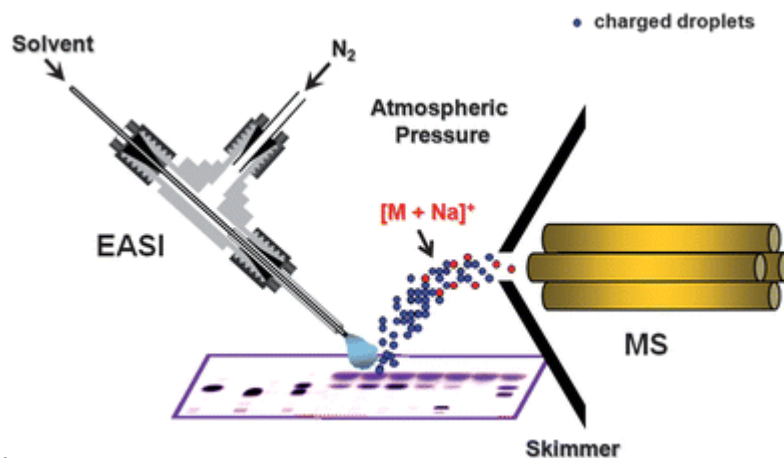
**Figure 99.** Analyse CCMHP : Pistes 1-7 : extraits méthanoliques des septes échantillons (7) de *C.saharae*. Piste 8 : isoflavone purifié (5-méthoxy-4',7-trihydroxy-8 glycopyranosylisoflavone)

(a) : CCMHP : détection à 366nm après dérivatisation avec 2-aminoethyldiphenyl borate .

(b) : photo de plaque avec DPPH

## 2.6. Déréplication des extraits par analyse HPTLC-MS

Pour la déréplication par analyse HPTLC-MS, une interface a été utilisée pour l'extraction des composés actifs à partir des plaques de HPTLC en utilisant un mélange méthanol à un débit d'écoulement de 0,2 ml min. cette interface a été connectée entre la pompe binaire et le spectromètre de masse équipé d'une source ESI (Figure 100)



**Figure 100.** Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance (CCMHP ou HPTLC).

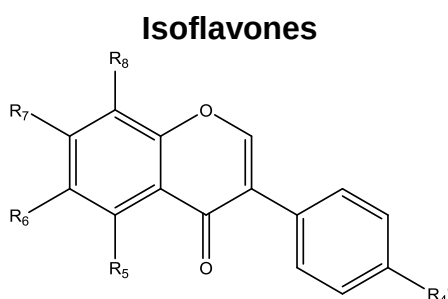
L'acquisition des spectres MS a été effectuée en mode d'ionisation négatif avec un débit de gaz à une température de 550 ° C et une pulvérisation égale à -4500 V.

Les valeurs de m/z de chaque zone extraite sont comparées avec les valeurs de m/z des constituants isolés au sein du genre *Genista* obtenus dans le Dictionary of Natural products.

### 2.6.1. Données issues de la consultation du DNP

La consultation du Dictionary of Natural Products (DNP) a été réalisée pour le genre *Genista* et pour le genre *Calobota*.

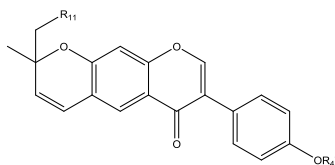
Aucune donnée n'est disponible pour le genre *Calobota*. Pour le genre *Genista*, 56 composés sont répertoriés dans le Dictionary of Natural Products : des flavonoïdes, des isoflavones, des alcaloïdes et des triterpènes. Les composés phénoliques sont présentés ci-dessous (Figure101).



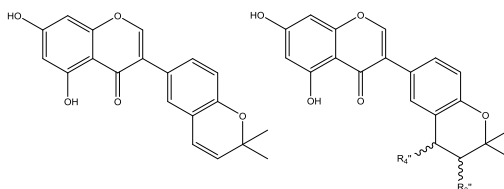
| Nom                                                                | R5               | R6 | R7               | R8      | R4'              | Formule brute                                   |
|--------------------------------------------------------------------|------------------|----|------------------|---------|------------------|-------------------------------------------------|
| 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone                                 | OH               | H  | OCH <sub>3</sub> | H       | OH               | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  |
| 4',7-Dihydroxy-5-methoxyisoflavone                                 | OCH <sub>3</sub> | H  | OH               | H       | OH               | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  |
| 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone;<br>4'-O-β-D-Glucopyranoside    | OH               | H  | OCH <sub>3</sub> | H       | O-β-D-Glc        | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> |
| 8-C-β-D-Glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyisoflavone                 | OH               | H  | OH               | β-D-Glc | OH               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> |
| 8-C-β-D-Glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyisoflavone;<br>5-Me ether* | OCH <sub>3</sub> | H  | OH               | β-D-Glc | OH               | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> |
| 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone;<br>7-O-β-D-Glucopyranoside         | H                | H  | O-β-D-Glc        | H       | OCH <sub>3</sub> | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  |

5-O-Methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine : (\*= **5OMeC8CG**)

### Isoflavones prénylées

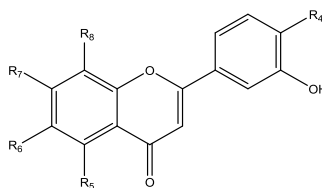


| Nom                                   |            | R4'  | R10                | Formule brute                                   |
|---------------------------------------|------------|------|--------------------|-------------------------------------------------|
| Alpinumisoflavone;<br>Hydroxy(2)      | 11-        | -H   | CH <sub>2</sub> OH | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>  |
| Alpinumisoflavone;<br>Glucopyranoside | 4'-O- β-D- | -Glc | CH <sub>3</sub>    | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub> |



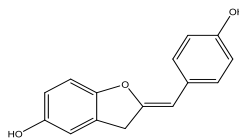
| Nom                                  |                    | R3''  | R4'' | Formule brute                                  |
|--------------------------------------|--------------------|-------|------|------------------------------------------------|
| Isoderrone                           |                    | CH=CH |      | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> |
| Isoderrone;<br>Dihydro,<br>dihydroxy | 3',4'-<br>3'S,4'R- | OH    | OH   | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> |
| Ficuisoflavone                       |                    | OH    | H    | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> |

### Flavonoïdes



| Nom                                                                                                   | R5 | R6 | R7 | R8       | R4'            | Formule brute                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----------|----------------|-------------------------------------------------|
| 8-C- β -D-<br>Glucopyranosyl-<br>3',4',5,7-<br>tetrahydroxyflavone;<br>4'-O- β -D-<br>Glucopyranoside | OH | H  | OH | β -D-Glc | O -β-D-<br>Glc | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> |

### Aurones



| Nom                                | Formule brute                                  |
|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 4',6-Dihydroxyaurone<br>; (Z)-form | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> |

**Figure 101.** Structure des composés phénoliques (flavonoïdes et isoflavonoïdes)



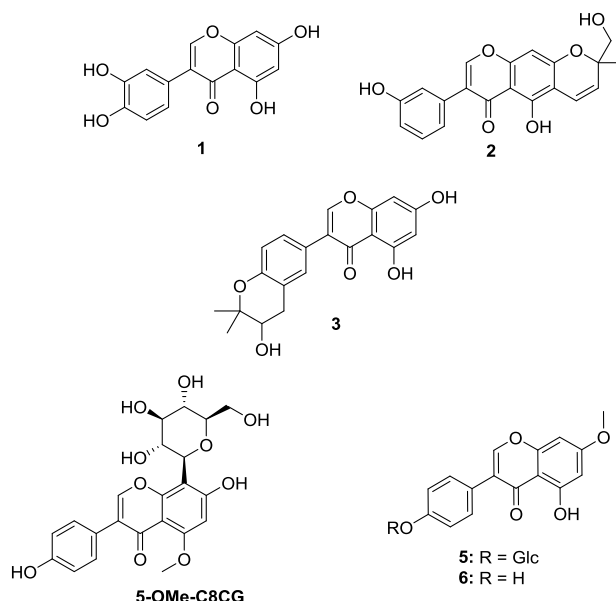
### 2.6.2. Déréplication

La déréplication a consisté à comparer les masses moléculaires correspondantes aux différentes valeurs de  $m/z$  obtenues par l'analyse HPTLC-MS aux masses moléculaires des composés présents dans le DNP.

Les résultats sont présentés dans le tableau 25. Les structures proposées sont des structures probables (Figure.102). N'ayant pas disposé de technique de fragmentation, la confirmation de l'identification par comparaison des schémas de fragmentation n'a pas été possible.

**Tableau 25.** Structures probables des composés de *C. saharae* analysés par CCMHP-MS

| Numéro<br>du spot | Valeurs de $m/z$<br>[M-H] <sup>-</sup> | Structures probable                                                                    |
|-------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| A1                | 299.2                                  | -                                                                                      |
| A2                | 285.1                                  | 3', 4', 5, 7-tetrahydroxy-isoflavone ( <b>1</b> )                                      |
| A3                | 351.2                                  | Hydroxyalpinumisoflavone ( <b>2</b> )                                                  |
| A4                | 465.2                                  | -                                                                                      |
| A5                | 285.1/353.1                            | tetrahydroxy-isoflavone ( <b>1</b> )/ficuisoflavone ( <b>3</b> )                       |
| B1                | -                                      | -                                                                                      |
| B2                | 445.2                                  | 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosyl<br>isoflavone( <b>5OMeC8CG</b> )            |
| B3                | 445.2                                  | 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'-O-β-D-<br>glucopyranosideisoflavone ( <b>5</b> ) |
| B4                | 283.1                                  | 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone ( <b>6</b> )                                        |
| B5                | 445.2/575.6/325<br>.2                  | -                                                                                      |



**Figure 102.** Structures putatives des composés identifiés de *C. saharae*

### 2.6.3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de racines et de la 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine

Les % de piégeage du radical DPPH ont été mesurés pour des solutions de  $5 \times 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup> à  $15 \times 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>. Le calcul d'une CI<sub>50</sub> (Concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH) a pu être réalisé pour l'extrait. La CI<sub>50</sub> est de 8.27 µg mL<sup>-1</sup> d'extrait méthanolique de racines, correspondant à 0.49 mg de plante sèche. Pour la 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine, aucune CI<sub>50</sub> n'a pu être mesurée. Les pourcentages d'inhibition des différentes solutions testées ont varié entre 15.12% (à 20 µg mL<sup>-1</sup>) et 34.43% (à 80 µg mL<sup>-1</sup>). La 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine semble donc apporter une faible contribution à l'activité antioxydante de l'extrait.

Les zones étudiées correspondent aux zones ayant réagi avec le DPPH (spots numérotés de A1 à A5 et de B1 à B5). La 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosyl isoflavone (spot B2) identifiée par le Dictionary of Natural Products est également connue sous la dénomination 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine que nous avons isolée. Les spots B2, B4 et B5 se retrouvant au même niveau de R<sub>f</sub>, il est difficile de savoir lequel a réagi avec le DPPH.

L'activité antioxydante ne peut être rapportée à la seule 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine qui inhibe faiblement le radical DPPH et il est donc probable que ce soit le spot B4 qui ait le plus réagi : la 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone.

### 3. Evaluation de l'activité antibactérienne

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre des travaux de Magistère. Ils sont présentés ici afin de corréler l'activité antibactérienne avec les données issues de l'étude phytochimique.

#### 3.1. Aromatogrammes réalisés avec les extraits alcaloïdiques

Les extraits alcaloïdiques obtenus à partir des fleurs, rameaux, téguments de la graine et graine ont été incubés en présence de différentes bactéries. Les résultats de l'aromatogramme montrent que les extraits alcaloïdiques *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)), inhibent la croissance des bactéries. Cette inhibition touche aussi bien les Gram- (négatif) que les Gram+ (positif). Cependant l'activité antibactérienne de cette substance n'est pas similaire sur toutes les souches testées. L'examen des résultats permet de faire les observations suivantes voir (Annexe : Figures et Tableaux. Diamètre (mm) d'inhibition des extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.) :

- Les diamètres de la zone d'inhibition varient entre 6 mm à 23 mm. Les activités les plus marquées sont notées pour *Serratia* (alcaloïdes des rameaux), *Klebsiella* et *Staphylococcus* (alcaloïdes des fleurs), *Escherichia*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* (alcaloïdes de la graine).
- *Escherichia coli* ne présente aucune sensibilité au contact des alcaloïdes des péricarpes.
- Le diamètre de la zone d'inhibition sur *Pseudomonas* varie entre 15 à 24 mm malgré que de nombreux auteurs rapportent la tolérance de *Pseudomonas aeruginosa* aux métabolismes secondaires notamment aux huiles essentielles extraites de diverses plantes (Hammer *et al.*, 1999).
- Les extraits alcaloïdiques de la graine ainsi des rameaux ont un grand effet inhibiteur sur la majorité des souches testées.
- Le genre *Pseudomonas* présente une sensibilité au contact des extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae* et surtout ceux de la graine.

#### 3.2. La concentration minimale inhibitrice :

L'inhibition de la croissance des bactéries (ATCC) est proportionnelle à la concentration des alcaloïdes de *C. saharae*. La croissance bactérienne est inhibée à des fortes concentrations (1/2 et 1/3), elle est nulle à partir de la concentration 1/5 voir

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des alcaloïdes de la graine est de 1/3 sur *Escherichia* et *Pseudomonas*, par contre elle est de 1/2 sur *Staphylococcus*.

La CMI des alcaloïdes de la fleur est de 1/4 sur *Escherichia* mais elle est de 1/3 pour les alcaloïdes des rameaux. Le genre *Pseudomonas* présente une CMI qui est de 1/3 au contact

des alcaloïdes des péricarpes, voir (Annexe : Tableau. La CMI des différents extraient alcaloidiques de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)).

### **3.2. L'antibiogramme**

Les résultats de l'antibiogramme des cinq souches testées voir (Tableau en annexe) nous a montré que les souches prélevées des malades (*Serratia et Klebsiella*) sont résistantes à la majorité des antibiogrammes (AMX, AMC, CTX, ...etc), mais par contre elles sont sensibles aux différents alcaloïdes de la plante. Par contre les souches ATCC (*Escherichia, Pseudomonas et Staphylococcus*) sont sensibles à la majorité des antibiotiques testés de même ces souches possèdent une sensibilité envers les différents alcaloïdes dont la zone d'inhibition varie entre 15 à 24 mm de diamètre.

## CONCLUSION GENERALE

L'étude morphologique est en accord avec la description faite de l'espèce *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, dans la tribu des Crotalariae et non plus dans la tribu des Genistae. Au niveau de l'habitat de la plante, l'analyse du sol a montré que le sol dunaire est pauvre en matière organique et en azote.

Le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl dans les différents organes de la plante est variable, cependant le taux est maximal dans la graine (32% de protéines).

Les alcaloïdes sont présents dans quasiment toutes les parties de la plante (rendement moyen est de 4.2%), mais semblent se concentrer dans les parties vertes (rameaux et péricarpes).

Au total, 3 alcaloïdes pipéridiniques ont été identifiés : ammodendrine, *N*-acétylhystrine et *N*-formylammodendrine.

La teneur en flavonoïdes varie de 0.212 à 2.614%, et la teneur en polyphénols totaux de 1.996 à 9.328%. Les teneurs les plus élevées sont observées pour les échantillons de racines collectées au mois d'Aout et celui de fleurs collectées au mois de mars. Une purification par HPLC préparative a permis d'isoler la 5-*O*-Méthoxy-8-*C*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-génistéine (**5OMeC8CG**).

La bioautographie par HPTLC et la déréplication par couplage à la spectrométrie de masse (HPTLC-MS) a permis une identification putative des composés phénoliques présentant une activité antioxydante (piégeage du radical DPPH). Les molécules principales identifiées comme contributrices à l'activité antioxydante ont été identifiées putativement comme étant la 3', 4', 5, 7-tétrahydroxyisoflavones, la ficuisoflavone, 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone et la 4', 5-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone-4'-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside.

La 5-*O*-methoxy-8-*C*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-génistéine ne participe que faiblement à l'activité antiradicalaire des extraits. Il est donc probable que ce soit le spot B4 qui ait le plus réagi : la 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone.

Concernant l'activité antibactérienne, les souches *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, présentent une sensibilité aux extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae*. La souche *Pseudomonas*, généralement résistante aux antibiotiques présente une sensibilité intermédiaire aux produits testés.

## PERSPECTIVES

L'espèce *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, joue un rôle important dans la fixation des dunes. Son étude phytochimique a montré une forte production de flavonoïdes et d'alcaloïdes et ont permis d'identifier la 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone qui pourraient être intéressante compte tenu de sa forte implication dans l'activité antioxydante.

La fraction alcaloïdique présente une activité antibactérienne intéressante. La toxicité des alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques limite leur utilisation en thérapeutique. L'étude du mécanisme d'action de ces composés peut éventuellement permettre d'identifier une nouvelle cible thérapeutique. De plus, des analogues moins toxiques peuvent être recherchés sur la base de ces modèles naturels.

Pour poursuivre l'étude de l'intérêt biologique de ces composés, il faudrait cependant envisager d'identifier une plante abondante qui contienne ces molécules, éventuellement d'autres espèces de *Genista* des régions plus au nord, afin d'envisager une extraction en grosse quantité de ces composés et de les étudier sur différents modèles biologiques.

Par ailleurs, la comparaison phytochimique avec d'autres espèces du genre *Calobota* serait intéressante.

## REFERENCES

## REFERENCES

- Abdallah L., Chaieb M. et Le Floch E. 2003.** Potentiel hydrique et phénologie de deux arbustes de la Tunisie saharienne. *Ecologia mediterranea*, tome 29, fascicule 2 :165-178.
- Abdel Halim O.B., Abdel Fattah H.A., Halaweish. F and Halim A.F.2000.** Isoflavones and alkaloids from *Spartidium saharae*. *Nat. Prod. Sciences*, 6;189-192.
- Andres A., Donovan S. M. and Schmidt K.M. S .2009•** Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 :563–569.
- Anonyme, 2003.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Ministère de la santé de la population et de la réforme (Algérie), 3<sup>ème</sup> édition, 16 p
- Ansm .1993.** Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé.
- Antosiak A., Milowska K., Maczynska K., Rozalska S. and Gabryelak T.2016.** Cytotoxic activity of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteus* L. and genistein against human SK-OV-3 ovarian carcinoma cell line. *Med Chem Res* ,26: 64–73.
- APG III (Angiosperm Phylogeny Group III), 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 16 (2): 105–121.
- Azani N., Babibeau M., Bailey C.D., Banks H., Barbosa A.R. Boatwright J.S. and Barbosa P.R .2017.** A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Phylogeny and classification of the Leguminosae, LPWG **Taxon**, 66(1) : 44–77.
- Bagnouls, F. et Gaussen, H.1953.** Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*.88 :193-239.
- Battandier J-A. et Trabut L-C.1888.** Flore de l'Algérie ancienne flore d'Alger transformée. Dicotylédones, par J-A Battandier.1<sup>o</sup> Fascicul. Thalamiflores. p 202.
- Beaudeau J.-L ., Delattre, J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A ., et Peynet, J. 2006.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de L'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21 (3): 144–150.
- Benayache, F. 2005.** A new isoflavone from *Genista saharae* (fabaceae). *Biochem. Systemat. Ecol*, 33: 635–638.
- Bentham, G. 1844.** Enumeration of Leguminosae indigenous to southern Asia and central and southern Africa. *Hooker's London Journal of Botany* 3: 355–363.
- Berta - Vanrullen. I., Saul C . et Thomann C. 2005.** Sécurité et bénéfices des phyto-



estrogènes apportés par l'alimentation. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) p360.

- Boatwright J. S. 2009.** Systematic studies of the genus *Lebeckia* and related genera of the tribe crotalarieae (Fabaceae). Ph.D. thesis. Johannesburg: University of Johannesburg: Taxonomy of the genus *Calobota*. Philosophiae Doctor in Botany. Université of Johannesburg. 6: 68 -186.
- Boatwright J. S., le Roux M. M., Wink M., Morozova T. and van Wyk B.-E. 2008.** Phylogenetic relationships of the tribe Crotalarieae (Fabaceae) inferred from DNA sequences and morphology. *Systematic Botany* ,33: 752 – 761.
- Boatwright J. S., Tilney P.M. and Van Wyk, B.-E. 2010.** Taxonomy of *Wiborgiella* (Crotalarieae, Fabaceae), a Genus Endemic to the Greater Cape Region of South Africa. *Systematic Botany* 35(2): 325–340.
- Boatwright J.S., Tilney P.M. and Van Wyk B.-E.2009.** The generic concept of *Lebeckia* (Crotalarieae, Fabaceae): Reinstatement of the genus *Calobota* and the new genus *Wiborgiella*. *South African Journal of Botany*,75: 546–556.
- Boatwright J.S., Tilney P.M. and Van Wyk B.-E .2008b.**A taxonomic revision of the genus *Rothia* (Crotalarieae, Fabaceae). *Australian Systematic Botany* 21: 422-430.
- Boido C. C., Tasso B., Boido V. and Sparatore F. 2003.** Cytisine derivatives as ligands for neuronal nicotine receptors and with various pharmacological activities. *Il Farmaco*, 58(3) : 265-277.
- Borges L., Bruneau A., Cardoso D., Crisp M., Delgado-Salinas A., Doyle J.J., Egan A., Herendeen P.S., 2013.**Towards a new classification system for legumes: Progress report from the 6th International Legume Conference. *South African Journal of Botany*, 89 : 3-9.
- Bouchouka EL-M., Djilani A. and Bekkouche A. 2012.** Antibacterial and antioxidant Activities of three endemic plants from Algerian sahara . *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 11(1): 61-65.
- Bourquin D., Brenneissen, R. and Wicky .K.1987.** Zur Alkaloid fuhrung von Spartidium (Coss.et Dur) Pomel (Fabaceae). *pharm acta hel*,62 :10 -11.
- Boutefnouchet S. 2016-2017.**Cours DU Nutrition. Université Paris-Descartes.
- Boutefnouchet S. 2015-2016.**Cours de phytochimie. Université Paris-Descartes.
- Brenda J., Boersma B. J., D'Alessandro T., Benton M.R ., Kirk M ., Wilson L. S., Prasain J., Botting N.P., Barnes S., Darley-Usmar V. M., Patel R.P. 2003.** Neutrophil Myeloperoxidase Chlorinates and Nitrates Soy Isoflavones and Enhances Their Antioxidant Properties *Free Radical Biology and Medicine*, 35, (11) :1417–1430.

- Bruneau A., Doyle J.J., Herendeen P., Hughes C., Kenicer G., Lewis G. 2013a.** Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *LPWG.Taxon* 62 : 217–248.
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 418-419.
- Bruneton J. 2005.** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux, 3ème Editions Lavoisier.
- Cardoso D., Pennington R.T., de Queiroz L.P., Boatwright J.S., Van Wyk B.-E., Wojciechowski M.F. and Lavin M.2013.** Reconstructing the deep- branching relation-ships of the papilionoid legumes, *South African Journal of Botany*, 89: 58-75.
- Cheyrier V ., Comte G ., Davies K.M., Lattanzio V. and Martens S .2013.** Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 1-20.
- Choi C., Cho H., Park J., Cho C. and Song Y. 2003.** Suppressive Effects of Genistein on Oxidative Stress and NFκB Activation in RAW 264.7 Macrophages, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(9): 1916-1922.
- Cornwell T., Cohick W. and Raskin I. 2004.** Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* ,65: 995–1016.
- Cosson E. et Durieu De M.1855.**Société Botanique de France.Séance du 13 Avril.*Bull. Soc. Bot. Fr*, T2, p247.
- Cosson, E.et Durieu De-M .1855.** Bulletin de la Société Botanique de France, Tome 2, p247.
- Couch J-F.1926.** Relative Toxicity of The Lupine Alkaloid. *Journal of Agricultural Research*, Vol. XXXII, No. 1, Key No. A-106: 51-67.
- Cronquist A., and Takhtajan A. L.1981.**An Integrated System of Classification of Flowering Plants.Columbia Univ.Press, New York, 1262 p.
- Dang Z., Jung K., Zhu L., Lai W., Xie H., Lee K-H., Huang L .and Chen C-H .2014.** Identification and Synthesis of Quinolizidines with Anti-Influenza A Virus Activity. *ACS Med Chem Lett.*14; 5(8): 942–946.
- De Nysschen A-M., Van Wyk B-E and Van Heerden F.R. 1998.** Seed flavonoids of the Podalyrieae and Liparieae (Fabaceae). *Systematic and Evolution. Pl. Syst. E*, 212: 1 11
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F. 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65(4) : 337–353.
- Djebaili S. 1978.** Recherches phytosociologiques et écologiques sur la végétation des hautes plaines steppiques et de l'Atlas Saharien algérien. Thèse Doct., Univ. Sc. Tech.

- Dr Carlo Muller R.1857.** Annales Botanices Systematicae. Synopsis Plantarum Phanerogamicarum. Planta *Dicotyledoneae*. Tome 4. P469.
- Dupont F. et Guignard J.L. 2007.** Abrégé de Botanique, Les familles de plantes. 14<sup>ème</sup> édition Editions Masson, Paris; 285 p.
- Ecklon Ch.F. et Zeyher C.1836.** Plantarum Africae Australis Extratropicae. Collectae Determinatae et Expositae. Enumeratio, Pars II, p :191.
- Erdemoglu N., Ozkan S. and Tosun F.2007.** Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochem Rev* ,6: 197–201.
- Euzeby J. P. And Kudos T. 2001.** Corrigenda to the validation lists. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1933-1938.
- Faugeras, G. et Paris.R. 1965.** Chimiotaxonomie des Papilionacees-Genistées. *Bulletin de la société Botanique de France*,112 :sup1 ,75-102.
- Favier A .2006.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6) :390-396.
- Fengpei, Du., Bing, Peng., Runhua, Lu., Haixiang, Gao. And Zhiqiang, Zhou. 2010.** Structure, electronic properties and radical scavenging mechanisms of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A: A density functional study *Journal of Molecular Structure. Theochem* ,955: 1–6.
- Galleano M., Calabro V., Prince P.D., Litterio M.C., Piotrkowski B., Vazquez-Prieto M.A., Miatello R.M., Oteiza and Fraga P.I. 2012.** Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259: 87–94.
- Ganai A.A. et Farooqi H .2015.** Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomedicine & pharmacotherapy* 76 :30-38.
- Genne D. et Siegrist H., 2003.** De l’antibiogramme à la prescription d’un antibiotique. *Forum Med Suisse*, 20: 464-468.
- Ghedira, K 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et Emplois en Thérapeutique. *Laboratoire de Pharmacognosie ; Phytothérapie* 3(4) : 162- 169.
- Green. B.T ., Lee S. T., Panter K. E. and Brown D.R. 2012.** Piperidine alkaloids: Human and food animal teratogens. *Food and Chemical Toxicology*, 50( 6): 2049-2055.
- Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985–990.
- Harborne J. B .1969.** Chemosystematics of the leguminosae, flavonoid and patterns in the tribe genistae. *Phytochemistry*, 8 :1449-1456.

- Hatimi A. et Tahrouch S. 2007.** Caractérisations chimiques, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du Souss- Massa. *Biomatec Echo*, 2, (5): 85-97.
- Havsteen. Bent H .2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids *The Pharmacology & Therapeutics*, 96 (2-3) :67-202.
- Havsteen B.H.2002.**The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *The Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3): 67-202.
- Hegnauer, R. 1988.** Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*, vol. 21, (8): 2423-2427.
- Hopkins W.G. 2003.** Physiologie végétale. Paris : 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A. 514p.
- Iwashina T. 2000.** The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113 : 287–299.
- Kaabeche, M.1995a.** Flore et végétation dans le Chott El-Hodna (Algérie). *Doc. Phytosoc.*, N.S., Camerino, Univ. degli Studi, Italia. Vol. 15: 393-402.
- Kaabeche M. 1998.** Les pelouses steppiques a dominante therophytiques du Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Essai de synthèse phytosociologiques par application de technique numériques d'analyse. *Doc. Phytosoc*, N.S., Vol.26 : 61-72.
- Kaabeche, M. 1990.** Les Groupements Végétaux de la Région de Boussaada. Essai de synthèse sur la végétation steppique du Maghreb Thèse de Doctorat D'Université. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.104 p.
- Kass, E.and Wink, M.1994.** Molecular Phylogeny of the Papillioideae (Family Leguminosae): RbcL Gene Sequences versus Chemical Taxonomy. *Bot Acta*, 108 149-162.
- Kawai M., Hirano T ., Higa S., Arimitsu J., Maruta M., Kuwahara Y., Ohkawara T., Hagihara K., Yamadori T ., Shima Y ;, Ogata A ., Kawase I and Tanaka T. 2007.**Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergology International*, 56(2):113-123.
- Carlsson. B., Corton. J. Ch., Safe.S. H., Saag.PT., Burg B. and Gustafsson J-Å. 1998.** Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139 (10): 4252-4263.
- Liu H., Zhang L. and Lu S. 2012.** Evaluation of antioxidant and immunity activities of 96 quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, 17 (4): 4281–4291.
- Lograda T.2010.** Etude Caryologique et Phytochimique de Six Espèces Endémiques du genre *Genista* L. en Algérie.Thèse doctorat en sciences.
- Maire R. 1952-1987.** Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine,

- Cyrénaïque et Sahara). Le Chevalier, Paris. 1(16) : p 5559.
- Maire R. 1926.** Notice phytogéographique de l'Algérie et de la Tunisie. Avec 1 carte Alger.
- Mekkiou R., Touahar H., Dijoux-Franca M.G., Mariotte, A.M., Benayache S. and Benayache, F. 2005.** A new isoflavone from *Genista saharae* (fabaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005, pp.635-638
- Meriane Dj. and Kaabache M. 2012.** Ecology, Biology and Biometry of an Endemic Fabaceae: *Genista Saharae* (Cosson and Durieu). *Journal of Life Sciences*, 6:501-504.
- Mladenka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R. 2010.** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (6): 963–975.
- Morel S. 2011.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Angers, Français.
- Muniz M.N. 2006.** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : La (+) Anatoxine -a et la Camptothécine. Thèse de doctorat. Université de Grenoble I. p.11-29.
- Newmann D.J., Cragg D.M., 2007.** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *Journal of Natural Products*, 70 (3): 461–477.
- Oki K., Y., Ito K., Yamamoto T., Fukabori Y., Kurokawa K. and Yamanaka H. 2002.** Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCAP and PC-3. *Int. J. Cancer*. 99; 846–852.
- Oskolski A.A., Stepanova A.V., Boatwright J.S., Tilney P.M., VanWyk B.-E. 2014.** A survey of wood anatomical characters in the tribe Crotalariaeae (Fabaceae) South African Journal of Botany 94 (2014) 155–165.
- Ould el Hadj M.D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H. 2003.** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région Ouargla (Sahara Septentrional Est). *Courrier du Savoir*, 3 : 47-51.
- Ozenda P. 1977.** Flore du Sahara. Paris, C.N.R.S., 622 p.
- Pabreza L A., Dhawan S. and Kellar K J. 1991.** [3H] cytosine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain. *Molecular Pharmacology*, 39 (1): 9-12.
- Panter KE., Gardner DR. and Molyneux RJ. 1998.** Teratogenic and fetotoxic effects of two piperidine alkaloid- containing lupines (*L. formosus* and *L. arbustus*) in cows. *Journal of Natural Toxins*, 17(2) :131-140.
- Paris R. R. et Moys H. 1976.** Précis de la matière médicale. Tome 1, édition Masson. *Plantamedica* 9(7) : 592-595.
- Pharmacopée Européenne. 2005.** 5ème Ed, Conseil de l'Europe : Strasbourg, 2, 2667p.

- Polhill R-M. 1976.** Genisteae (Adans.) Benth. and related tribes (Leguminosae). In: V, H, Heywood ed (s). *Botanical systematics* :143-368.
- Polhill, R. M. 1981.**Tribe 29. Crotalariaeae (Benth.) Hutch in *Advances in Legume Systematics* 1, eds. R. M. Polhill and P. H. Raven. Kew : *Royal Botanic Gardens* :399–402.
- Pomel A .1874.** Nouveau matériau pour la Flore Atlantique (Extrait du bulletin de la société climatologie d'Alger), p173.
- Pool-Zobel B L., Adlercreutz H., Glei M., Liegibel U.M ., Sittlington J., I., Wahala K. and Rechkemmer G .2000.** Isoflavonoid and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human cells colon. *Carcinogenesis*.21, (6) :1247–1252.
- Qi W., Weber Ch. R., Wasland K.and Savkovic S.D. 2011.** Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. . *BMC Cancer*, 11 : 219.
- Radford E. A., Catullo G. et De Montmollin B. 2011.** Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale : Sites prioritaires pour la conservation. Gland, Suisse et Malaga, Espagne. (UICN), *Planta life* ,124 p.
- Ramade F.1984.** Eléments d'écologieEcologie fondamentale. Ed. Mc Graw-Hill, Paris. 397p.
- Ramallo I. A., Zacchino S.A. and Furlan R. L. E. 2006.** A Rapid TLC Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers, *Phytochem. Anal.* 17: 15–19.
- Rauter A.P., Martins A., Borges C., Ferreira J., Justrino J., Bronze M.-R., Coelho A.V., Choi Y.H. and Verpoorte R. 2005.** Liquid chromatography-diode array detection electrospray ionisation mass spectrometry / nuclear magnetic resonance analysis of the antihyperglycemic flavonoid extract of *Gensita tenera*. *Journal of Chromatography A*, 1089: 59-64.
- Record. I. R., Dreosti I.E. and McInerney J. K. 1995.** The antioxidant activity of genistein in vitro, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6 ( 9): 481-485.
- Rideau M. et Chexieux J-C. 1978.** Variations du taux des alcaloïdes furoquinoléiques dans la fleur de *Choisya ternata* Kunth. au cours de son épanouissement. *Bull. Soc. bot. Fr*, 125 : 127-137.
- Rotelli A. E., Guardia T., Juárez A. O., de la Rocha N. E. and Pelzer L.E.2003.** Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation *Pharmacological Research*, 48(6): 601–606.

- Rucinska A. and Gabryelak T . 2009.** Effect of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteus* on DNA damage assessed using the comet assay *in vitro*. *Cell Biology International* ,33(2):247–252.
- Rucinska A., Kirko S. and Gabryelak T. 2007.** Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Cell Biology International*, 31(11):1371-1378.
- Sahgal G., Ramanathan S., Sasidharan S., Mordi M.N., Ismail S. and Mansor, S.M. 2009.** *In vitro* antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules*, 14: 4476–4485.
- Salmon M., Ammiche A., Guermi A., Redjem A et Ozer A., 2009.** Bou Saada : une ville touristique confrontée au développement urbain. Apport à la télédétection. Journées d'animation scientifique. AUF, Alger.
- Salvamani S., Gunasekaran B., Shaharuddin, Noor A., Aqlima Ahmad, S and Shukor, M Y .2014.** Anti-atherosclerotic Effects of Plant Flavonoids. *BioMed, Research International*, p:1-11.
- Setchell K. D. R. and Cassidy A. 1999.** Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal of Nutrition*,129 (3): 758S–767S.
- Singleton P. 1999.** Bactériologie. Cours de 2ème cycle 2ème Edition, éd. Dunod, p 415.
- Skibola C.F. and Smith M.T. 2000.** Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and medicine*, 29(3-4): 375–383.
- Station météorologique de Boussaâda (Ain Diss) .2015.**
- Stoclet J-C. et Schini-Kerth V.2011.** Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. Dietary flavonoids and human health . *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69, 78-90.
- Suzuki K., Koike H., Matsui H., Ono Y., Hasumi M., Nakazato H., Okugi H., Sekine Y., Oki K., Ito K., Yamamoto T., Fukabori Y., Kurokawa K., Yamanaka H. 2002.** Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int. J. Cancer*: 99, 846–852.
- Tian G., Kober F-X., Lewandrowski U., Sickmann A ., Lennarz W. J and Schindelin H. 2008.** The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires conformationally flexible molecule. *J Biol Chem* 283(48):33630-33640.
- Unesco .1960.** Les plantes médicinales des régions arides. Recherches sur les zones arides, Paris, p 99.
- Van Wyk B.-E. and Verdoorn, G.H. 1989.** Alkaloids of the genera *Aspalathus*, *Rafnia* and *Wiborgia*. *S. Afr. Tydskr. Plantk*, 55(5): 520–522.

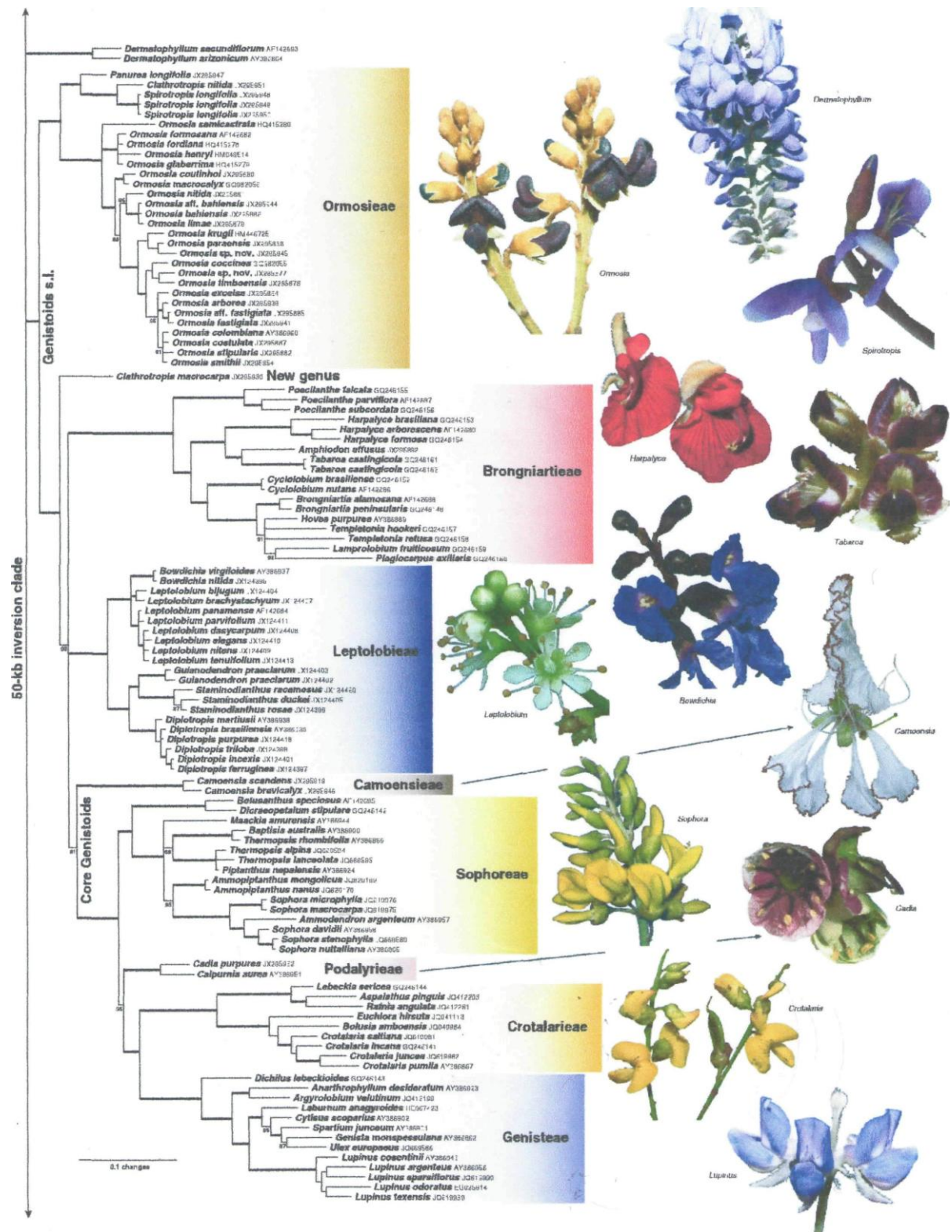
- Van Wyk B.-E. and Verdoorn, G.H. 1990.** Alkaloids as taxonomic characters in the tribe crotalariae (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 18: 503-515.
- Van Wyk B.-E., Greinwald, R., Verdoorn, G.H. and Witte .L.1989.** Chemotaxonomic significance of alkaloids in the genus *Spartidium* (Fabaceae Crotalariaeae). *S.Afr. J. Bot* ,55(5):523-527.
- Van Wyk , B.-E. 2003.** The value of chemosystematics in clarifying relationships in the genistoid tribes of papilionoid legumes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 875–884
- Van Wyk B -E .,Verdoorn., ,G.H and Schutte ,A.L. 1988a.** Observations on the occurrence and distribution of alkaloids in some genera and species of the tribe Crotalariaeae (Fabaceae). *S. Afr. 1. Bot*, 54:75- 79.
- Van Wyk B.-E and Verdoorn,G.H .1989.** Chemotaxonomic survey of major alkaloids in *Lotononis* and *Buchenroedera*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(5):385-389.
- Van Wyk B.-E. and Verdoorn,G.H .1989a .** Chemotaxonomic significance of alkaloids in the genus *Lebeckia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17, (3): 225-229.
- Van Wyk B.-E and Verdoorn ,G H. .1989 b.** Chemotaxonomic significance of alkaloids in the genus *Pearsonia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(5): 391-394.
- Van Wyk B.-E and Verdoorn ,G H. .1989.** Taxonomic Relationships amongst Some Genera of Leguminosae Tribe Crotalariaeae and *Argyrolobium* (Genisteae) .Kew Bulletin, Vol. 44, No. 3, pp. 397-423.
- Van Wyk B.-E., Verdoorn ,G.H. and Schutte ,A.L. 1988 b.** Chemotaxonomic value of alkaloids in the genus *Dichilus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16:471- 474.
- Van Wyk, B.-E. 2005.** Tribe Crotalariaeae. In: Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M. (Eds.), *Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew*: 273–281.
- Wink M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- Wink, M., Mohamed, G.I.A., 2003.** Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on amolecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 897–917.
- Wink M. 2013.** Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 89: 164–175.
- Wojciechowski M .F., Lavin M. and Sanderson M. J.2004.** A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported sub clades within the family. *Am.J.Bot.* 91(11):1846-1862.



- Yahara T., Javadi F., Onado Y., Paganucci De Queiroz L., Faith D.P., Prado D.E., et al** 2013. Global legume diversity assessment: Concept, key indicators, and strategies. *Taxon* 62(2): 249-266.
- Zhang J., Subramanian S., Stacey G. and Yu O. 2009.** Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of medicago truncatula by sinorhizobium meliloti. *The Plant Journal*, 57, 171-183.
- Zhang J., Du F., Peng B., Lu R., Gao H .and Zhou Z. 2010.** Structure, electronic properties and radical scavenging mechanisms of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A: A density functional study. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 955 (1-3) :1–6.
- Zhao J., Zhang J.-S., Yang B., Lv G.-P.and Li S -P. 2010.** Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of curcuma using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis. *Molecules*, 15: 7547–7557.
- Zhou S., Hu Y., Zhang B., Teng Z., Gan H., Wang Q., Huan M. and Mei Q. 2008.** Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *J Agric Food*, 56 (18): 8354-8359.
- Zobel H., Adlercreutz M., Glei U.M., Liegibel J., Sittlington I., Rowland K.W. and G. Rechkemmer.2000.** Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* ,21 (6) :1247 – 1252.

## ANNEXES

**Figure.** Suite de la phylogénie des papilionoideae (Variation architecturale des fleurs dans le clade genistoïde).



## Clé des Espèces de *Calobota* (Boatwright J.S et al ,2009).

1. Plantes arbustives fortement a tendance epineuses, les gousses comprimées Latéralement, souvent falciformes.....2
2. Plantes arbustes effeuillée, si les feuilles sont alternées et largement Séparée...3
  3. Pétales pileuse, ovaire pubescent et les gousses densément tomenteux.***C. pungens***
  3. Pétales glabres, gousses glabres..... 4
  4. Fleurs généralement (15-) 16-18 (-20) mm de long; gousses (21-) 28 - 49 (- 53) de long; plantes limitées au Nord Cape..... ***C. cuspidosa***
  4. Fleurs généralement 8-11 mm de long; gousses 14-17 (-33) mm de long; plantes restreintes à l'Ester Cape..... ***C. psiloloba***
2. Les plantes à feuilles densément, feuilles alternes et fasciculée.....5
  5. Feuilles trifoliolées, jeunes tiges vertes, les gousses serrée entre les graines..... ***C.spinescens***
  5. Feuilles unifoliolée, jeunes tiges brunes, gousses pas rétrécie entre Les graines .....***C. acanthoclada***
1. Plantes non épineuses, les gousses semi-cylindriques, si comprimé latéralement, puis les plantes non armés, ériger ou vergée, arbustes effeuillés limités à l'Afrique du Nord..... 6
  6. Feuilles largement obovale ou orbiculaire (8-25 mm de large), court et soyeuse
  7. Feuilles trifoliolées, inflorescences long, spicate et densément fleuris (plus de 100 fleurs), les gousses ovoïdes à elliptiques, 1 à 2 épépiné.....***C.elongata***
  7. Feuilles uni folioles (trifoliolées rarement), inflorescences courte, racemeuse se et 7 à 16 fleurs, gousses linéaire, 5 à 7 épépiné.... ***C.obovata***
  6. Feuilles elliptiques à oblancéolées, linéaire, spatulées, ou rarement ovales ou obovales et généralement moins de 10 mm de large , pubescent ou soyeuse.....8
  8. Pétales d'ailes plus longues que la quille, folioles étroites et beaucoup plus Courte que les pétioles.....9
  9. Plantes gousses et pistil pifose et non soyeuse, glabres....***C .halenbergensis***
  9. Plantes soyeuse, cosses et pubères pistil ou soyeuse ... .....10
  10. Les feuilles non pliées vers l'intérieur et dirigées vers le Même côté, fleurs 7-11 mm de long, pétales alaires pas ext Extrêmement longue (aile quille rapport lamina de moins de 1: 1.3) .....***C.sericea***
  10. Feuilles condupliquée et unilatéral, fleurs 12-15 mm long, Pétales et ailes extrêmement longue (aile à la quille lamina rapport de 2: 1).....***C. lotononoides***
  8. Pétales d'ailes plus courtes que la quille, folioles large et aussi longtemps un s ou légèrement plus courte que les pétioles ou pétioles absent..... 11
  11. Les plantes densément feuilles et soyeuse au moins sur les jeunes branches.....12
  12. Fleurs généralement grandes (entre 13 et 35 mm de long) grands pétales, de l'aile avec sculptant étendant aux basale inférieurs, parties centrale inférieure et supérieure ou distal la plus bas .....13
  13. Apex des feuilles mucronulate; calices, l'ovaire et les gousses

- Sont glabres.....**C. cytisoides**
13. Apex des Feuilles aiguë, calices, de l'ovaire et les gousses  
soyeuse.....**C. thunbergii**
12. Fleurs de taille moyenne (entre 11 et 17 mm de long), les pétales de l'aile  
avec modelage restreinte à la base supérieurs et les parties centrales  
supérieures ..... 14
14. Feuilles trifoliolées avec un pétiole distinct, les gousses tomenteux et  
non entre les graines..... **C. cinerea**
14. Feuilles gousses simples et sessiles, à court et un peu soyeus resserrée  
entre les graines ..... **C. linearifolia**
11. Plantes pratiquement effeuillées et non soyeuse
15. Feuilles si sont présentes elliptiques à ovoïdes, pétales de carène , pistil  
et les gousses sont glabres Limité à l'Afrique du Nord.....**C. saharae**

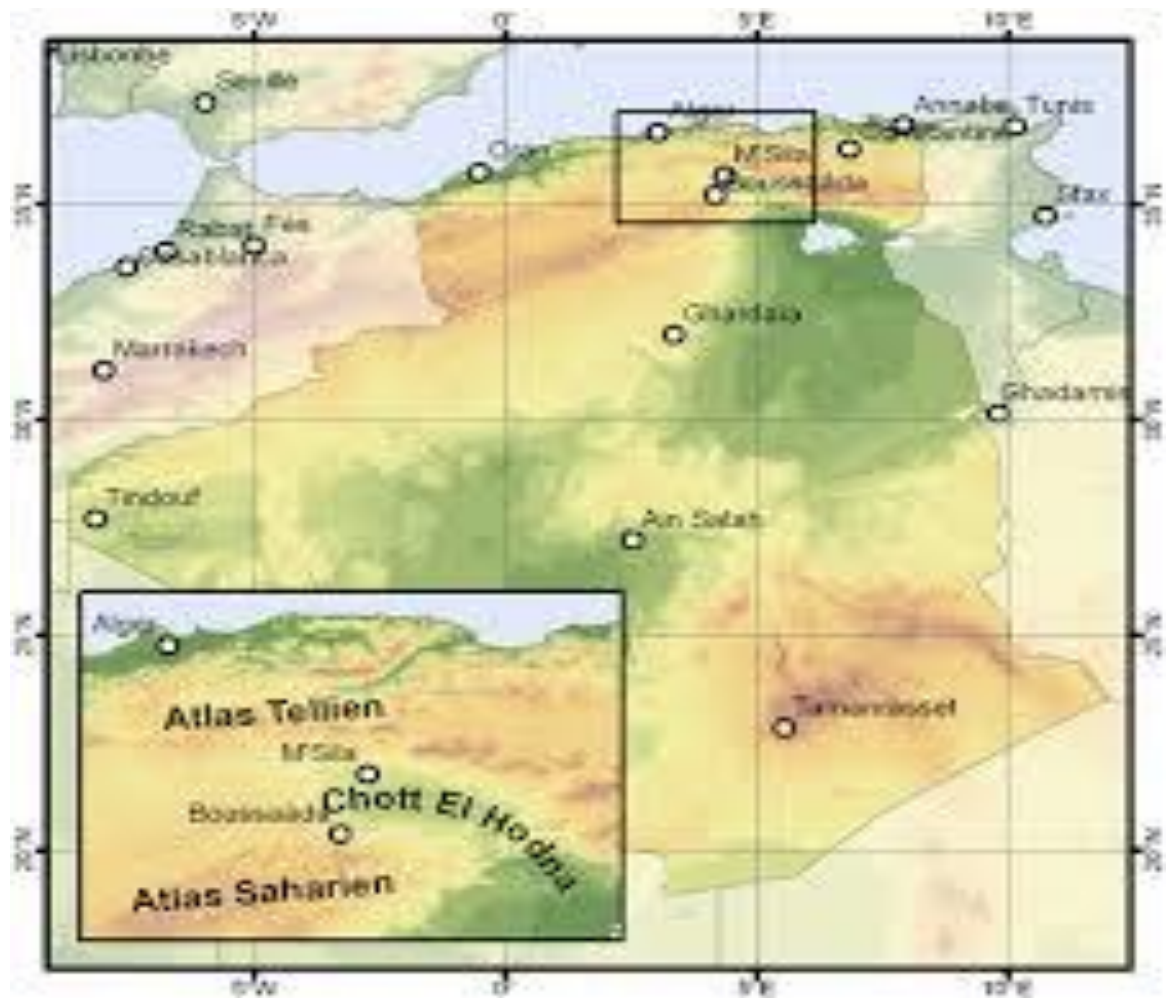
## Les genres de la tribu

Selon des recherches bibliographiques les genres de la tribu de Crotalariaea sont 16 genres (A.A. Oskolski 20014)

- Aspalathus L.
- Bolusia Benth.
- Calobota Eckl. & Zeyh.
- Crotalaria L.
- Euchlora (Eckl. & Zeyh.) B.-E. van Wyk & Boatwr.
- Ezoloba B.-E. van Wyk & Boatwr.
- Lebeckia Thunb.
- Leobordea Del.
- Listia E. Mey.
- Lotononis (DC.) Eckl. & Zeyh.
- Pearsonia Dummer
- Rafnia Thunb.
- Robynsiophyton R. Wilczek
- Rothia Pers.
- Wiborgia Thunb.
- Wiborgiella Boatwr. & B.-E. van Wyk
- 

## Les espèces de *Calobota*

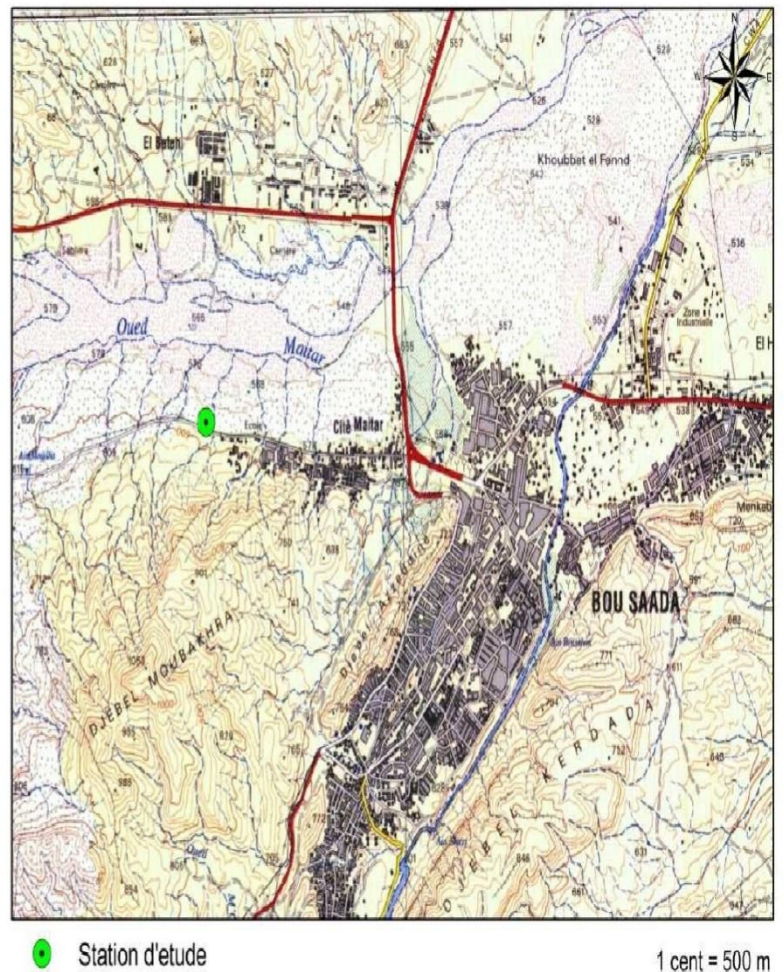
- Calobota acanthoclada (Dinter) Boatwr. and B.-E. Van Wyk
- Calobota angustifolia (E. Mey.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota cinerea (E. Mey.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota cuspidosa (Burch.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota cytisoides (Berg.) Eckl. and Zeyh.
- Calobota elongata (Thunb.) Boatwr. and B.-E. Van Wyk
- Calobota halenbergensis (Merxm. & A. Schreib.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota linearifolia (E. Mey.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota lotononoides (Schltr.) Boatwr. and B.-E. Van Wyk
- Calobota obovata (Schinz) Boatwr. and B.-E. Van Wyk
- Calobota psiloloba (E. Mey.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota pungens (Thunb.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- **Calobota saharae** (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota sericea (Thunb.) Boatwr. & B.-E. van Wyk
- Calobota spinescens (Harv.) Boatwr. & B.-E. van Wyk



**Figure .** Carte : Localisation de la ville de Bou Saada, a la bordure Chott El Hodna, a la bordure Nord de l'Atlas saharien (Salmon et *al.*,2009)



| LEGENDE                                                                 |  |
|-------------------------------------------------------------------------|--|
| Autoroute (route à deux chaussées séparées)                             |  |
| Route de très bonne viabilité (plus de 10,5 mètres)                     |  |
| Route de bonne viabilité (entre 7 et 10,5 mètres)                       |  |
| Route de moyenne viabilité (entre 6 et 7 mètres)                        |  |
| Route étroite (inférieure à 6 mètres)                                   |  |
| Piste ou chemin non revêtu                                              |  |
| Sentier piétonnier                                                      |  |
| Route en remblai (1), en déblai (2), tunnel (3)                         |  |
| Route bordée d'arbres                                                   |  |
| Route nationale                                                         |  |
| Chemin de village                                                       |  |
| Passage à niveau (1), supérieur (2), inférieur (3)                      |  |
| Chemin de fer à deux voies normales (1,435m)                            |  |
| Chemin de fer à une voie normale (1,435m)                               |  |
| Chemin de fer à voie étroite (1,06m)                                    |  |
| Chemin de fer abandonné (1) à voie déposée (2)                          |  |
| Chemin de fer électrifié                                                |  |
| Ligne électrique de haute tension                                       |  |
| Ligne électrique de moyenne tension                                     |  |
| Centrale électrique (1), transformateur (2)                             |  |
| Point géodésique : sur phare (1), sur minaret (2), sur koubba (3)       |  |
| Marabout (1), tombe isolée (2), hanjar (3)                              |  |
| Cimetière : musulman (1), chrétien (2)                                  |  |
| Mosquée : de grande dimension (1), de petite dimension (2)              |  |
| Construction : remarquable (1), ordinaire (2), en ruine (3)             |  |
| Silos (1), réservoir d'hydrocarbures (2)                                |  |
| Scade (1), terrain de sport (2), carrière (3)                           |  |
| Mine (1), stèle (2), antenne (3)                                        |  |
| Pont (1), viaduc (2)                                                    |  |
| Conduite : forcée au sol (1), souterraine (2)                           |  |
| Oued permanent (1), temporaire (2)                                      |  |
| Oued bordé d'arbres                                                     |  |
| Canal (1), aqueduc (2), fossé (3)                                       |  |
| Falaise littorale (1), sable humide (2), gâlets (3)                     |  |
| Chott et sebkha (1), zone inondable (2), marais (3), marecage (4)       |  |
| Puits (1), source (2), château d'eau (3), Bassin (4)                    |  |
| Réservoir (1), abreuvoir (2)                                            |  |
| Barrage important (1), retenue collinaire (2), digue (3)                |  |
| Phare (1), feu (2), station de pompage (3)                              |  |
| Escarpement rocheux (1)                                                 |  |
| Courbes : maîtresse (2), normale (3), intermédiaire (4), de cuvette (5) |  |
| Talus naturel (1), sable sec (2)                                        |  |
| Forêt, bois (1), maquis arboré (2), maquis épars (3)                    |  |
| Vergier (1), vigne (2), oliveraie (3)                                   |  |
| Alfa (1), palmier (2), cactus (3)                                       |  |
| Limite de végétation (1), hale végétale (2)                             |  |



## Localisation géographique de la region d'étude (Oued Maitar à Bou-Saada)

Coordonnée Géographique WGS 1984 UTM Zone 31 Nord

(DALI Zahia)

Boussaâda -Caractéristiques de station météorologique d'Ain Diss

Coordonnées

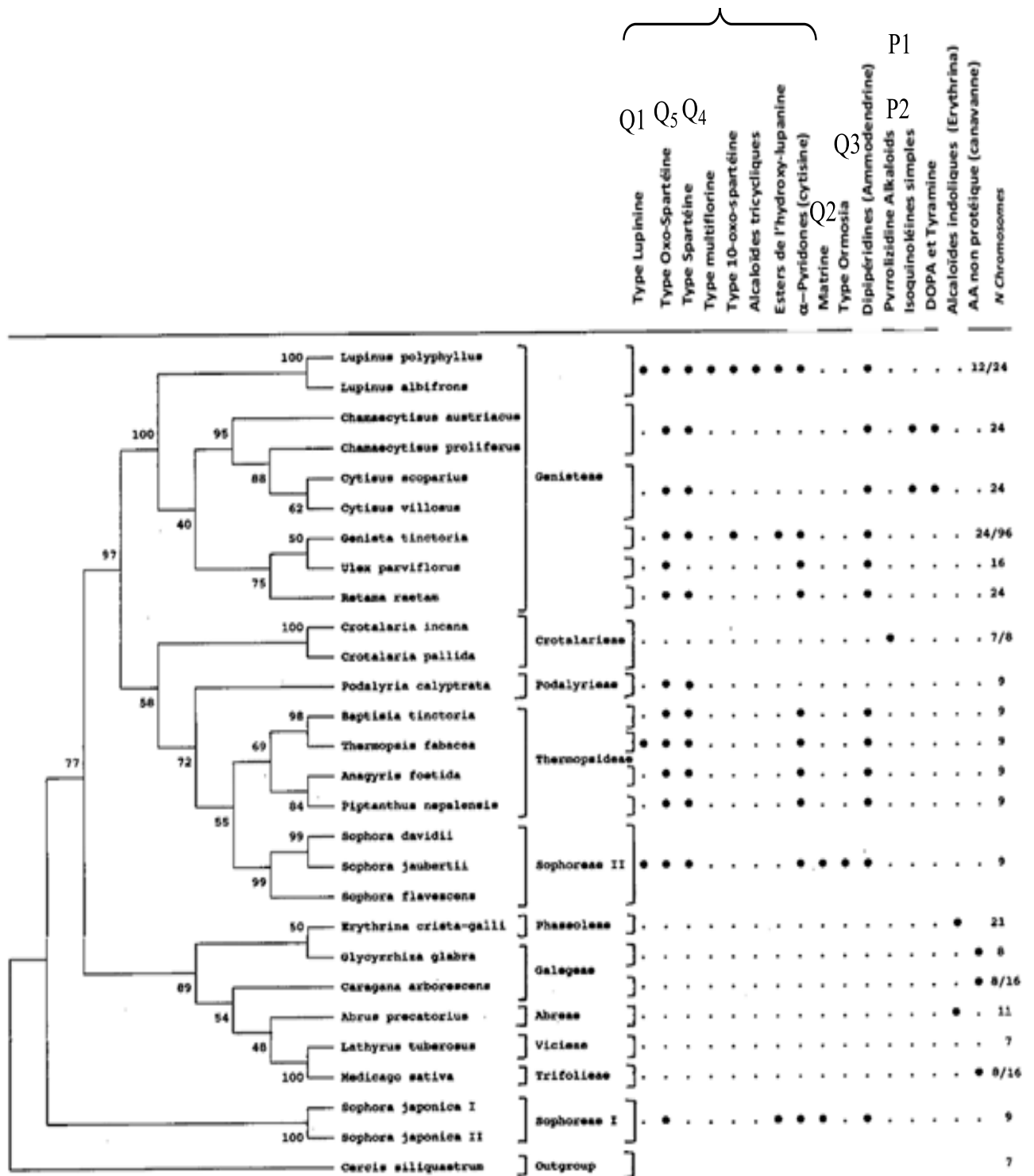
N°20-°35: Latitude

E°12-Longitude: 04°

m 459 :Altitude

(Données disponibles P (mm) et T (°C

# Alcaloïdes quinolizidiniques



**Figure.** Schéma de la répartition des alcaloïdes au sein de la sous-famille des (Papilionoideae) (Kass .et Wink. 1994)



**Tableau.** Distribution des flavones, flavonoles et isoflavones dans le genre *Genista*

| <i>Genista</i><br>(sections, species) |                                                | Occurrence of |    |    |      |         |            |    |    |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|---------------|----|----|------|---------|------------|----|----|
|                                       |                                                | Isoflavones   |    |    |      | Flavone | Flavonols* |    |    |
|                                       |                                                | Fm            | Da | Gn | 5MGn | Lu      | Km         | Qu | Fs |
| SUBGENUS GENISTA                      |                                                |               |    |    |      |         |            |    |    |
| Genista                               | <i>G. tinctoria</i> L.                         | —             | +  | +  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. januensis</i> Viv                        | —             | —  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. lydia</i> Boiss                          | —             | +  | +  | +    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. ramosissima</i> (Desf) Poiret            | —             | —  | —  | —    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. cinerea</i> (Vill.) DC                   | —             | +  | —  | —    | —       | —          | —  | +  |
|                                       | <i>G. valentina</i> (Willd ex Spreng.) Steudel | —             | +  | —  | —    | —       | +          | +  | +  |
| Spartioides                           | <i>G. florida</i> L.                           | —             | +  | —  | —    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. obtusirama</i> Gay ex Spach              | —             | +  | +  | +    | +       | —          | —  | +  |
|                                       | <i>G. pseudopilosa</i> Cosson                  | —             | —  | —  | —    | —       | +          | +  | —  |
|                                       | <i>G. teretifolia</i> Willk.                   | +             | +  | —  | —    | +       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. sericea</i> Wulf                         | —             | +  | +  | +    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. subcapitata</i> Pančič                   | +             | +  | +  | +    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. villarsii</i> Clementi                   | +             | +  | +  | +    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. albida</i> Willd                         | —             | +  | +  | —    | —       | +          | +  | —  |
| Erinacoides                           | <i>G. pilosa</i> L.                            | —             | +  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. lobelii</i> DC                           | —             | +  | +  | +    | —       | +          | —  | —  |
|                                       | <i>G. pumila</i> (Deb. & Rev.) Vierhapper      | —             | +  | —  | —    | —       | +          | +  | +  |
|                                       | <i>G. baetica</i> Spach                        | —             | +  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. salzmännii</i> DC                        | +             | +  | +  | +    | —       | +          | —  | —  |
|                                       | <i>G. hystrix</i> Lange                        | —             | —  | +  | +    | —       | +          | —  | —  |
| Scorpioides                           | <i>G. scorpius</i> (L.) DC                     | —             | —  | +  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. corsica</i> (Lois) DC                    | —             | +  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. carpetana</i> Leresche ex Lang           | —             | +  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. morisii</i> Colla                        | —             | +  | +  | +    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. ferox</i> (Poiret) Poiret                | —             | —  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | SUBGENUS PHYLLOBOTRYS                          |               |    |    |      |         |            |    |    |
| Phyllobotrys                          | <i>G. anglica</i> L.                           | —             | +  | +  | —    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. falcata</i> Brot.                        | —             | +  | —  | —    | —       | +          | +  | —  |
| Voglera                               | <i>G. micrantha</i> Ortega                     | —             | —  | —  | +    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. sylvestris</i> Scop.                     | —             | —  | —  | —    | —       | +          | +  | —  |
|                                       | <i>G. aristata</i> C. J. Presl.                | —             | +  | —  | —    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. hispanica</i> L.                         | —             | +  | +  | +    | —       | +          | —  | —  |
|                                       | <i>G. germanica</i> L.                         | —             | +  | —  | —    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. hirsuta</i> Vahl                         | —             | +  | —  | —    | —       | +          | —  | —  |
|                                       | <i>G. ulicina</i> Desf                         | —             | +  | +  | +    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. tournefortii</i> Spach.                  | —             | —  | —  | —    | —       | +          | +  | —  |
|                                       | <i>G. triacanthos</i> Brot.                    | —             | —  | +  | +    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. tridens</i> (Cav.) DC                    | —             | +  | +  | +    | —       | —          | +  | —  |
|                                       | <i>G. cupanii</i> Guss                         | —             | +  | +  | +    | —       | —          | —  | —  |
| SUBGENUS SPARTOCARPUS                 |                                                |               |    |    |      |         |            |    |    |
| Spartocarpus                          | <i>G. radiata</i> (L.) Scop                    | —             | +  | +  | +    | —       | +          | +  | —  |
|                                       | <i>G. sessilifolia</i> DC                      | +             | +  | +  | —    | —       | —          | —  | +  |
|                                       | <i>G. nissana</i> Petrovic                     | +             | +  | —  | —    | +       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. aetnensis</i> (Rafin ex Biv) DC          | +             | +  | +  | +    | —       | —          | —  | —  |
|                                       | <i>G. spartioides</i> Spach                    | —             | —  | +  | —    | +       | —          | —  | —  |

**Tableau.** Distribution des flavones, flavonoles et isoflavones dans le genre *Genista* (suite du tableau)

| <i>Genista</i><br>(sections, species) |                                    | Occurrence of |    |    |      |         |            |    |    |
|---------------------------------------|------------------------------------|---------------|----|----|------|---------|------------|----|----|
|                                       |                                    | Isoflavones   |    |    |      | Flavone | Flavonols* |    |    |
|                                       |                                    | Fm            | Da | Gn | 5MGn | Lu      | Km         | Qu | Fs |
|                                       |                                    |               |    |    |      |         |            |    |    |
| Acanthospartus                        | <i>G. acanthoclada</i> DC          | —             | +  | +  | —    | +       | —          | —  | —  |
| Cephalospartus                        | <i>G. capitellata</i> Cosson       | —             | +  | —  | —    | —       | +          | —  | —  |
|                                       | <i>G. umbellata</i> (Desf.) Poiret | —             | +  | —  | —    | —       | —          | —  | —  |

\* Key: Fm, formononetin; Da, daidzein; Gn, genistein; 5MGn, 5-methylgenistein; Lu, luteolin; Km, kaempferol; Qu, quercetin; Fs, fisetin (?).

† Luteolin present in these species as the 5-glucoside, galuteolin.

**Tableau.** Distribution des flavones, flavonoles et isoflavones dans le genre *Genista* (suite)

|                                                                  | Isoflavone   | Leucoantho<br>cyanidin | Flavone                           | Flavonol*                    |
|------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>Petteria ramentacea</i> (Sieber)<br>C. Presl.                 | —            | —                      | —                                 | Fs                           |
| <i>Teline stenopetala</i> Webb                                   | Da, Gn, 5MGn | —                      | Lu                                | Qu, Fs                       |
| <i>T. rosmarinifolia</i> Webb &<br>Berth.                        | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | Km                           |
| <i>T. monspessulana</i> (L.)<br>C. Koch                          | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | My, Qu, Km                   |
| <i>T. linifolia</i> (L.) Webb &<br>Berth.                        | Gn           | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>T. canariensis</i> Webb &<br>Berth.                           | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | Qu, Fs                       |
| <i>T. congesta</i> Webb & Berth.                                 | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | Fs                           |
| <i>T. spachiana</i> (syn. <i>Genista</i><br><i>canariensis</i> ) | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | Qu, Fs                       |
| <i>Ulex parviflorus</i> Poirret                                  | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>U. gallii</i> Planchon                                        | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>U. minor</i> Roth                                             | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>U. boivinii</i> Webb                                          | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>U. europaeus</i> L.                                           | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>Stauracanthos genistoides</i><br>(Brot) Samp.                 | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>Erinacea anthyllis</i> Link                                   | Da, Gn, 5MGn | —                      | —                                 | —                            |
| <i>Podocytisus caramanicus</i> B & H                             | —            | —                      | Lu                                | —                            |
| <i>Lygos monosperma</i> (L.) Heywood                             | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>L. raetam</i> (Forsk) Heywood                                 | Da, Gn, 5MGn | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>Chamaespartium sagittale</i> (L.)<br>P. Gibbs                 | Da, Gn, 5MGn | —                      | Lu, Ap                            | —                            |
| <i>Calycotome spinosa</i> (L.) Link                              | Gn, 5MGn     | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>C. villosa</i> (Poir) Link                                    | Gn, 5MGn     | —                      | Gf                                | —                            |
| Crotolarieae Type                                                |              |                        |                                   |                              |
| <i>Hypocalyptus obcordatus</i> Thunb                             | —            | Cy, Dp                 | —                                 | My, Qu                       |
| <i>Loddigesia oxalidifolia</i> Sims                              | —            | Cy, Dp                 | —                                 | My, Qu, Km                   |
| <i>Crotalaria pumila</i> Rafin.                                  | —            | —                      | Gf                                | —                            |
| <i>C. anseralis</i>                                              | —            | Cy, Dn                 | Gf                                | —                            |
| Lupineae type                                                    |              |                        |                                   |                              |
| <i>Argyrolobium</i> 5 spp.                                       | all—ve       | all—ve                 | Gf in 2                           | Qu in 1 spp.<br>Km in 1 spp. |
| <i>Lupinus</i> 26 spp.                                           | all—ve       | all—ve                 | Gf in 15 spp.<br>Lu/Ap in 12 spp. | Km/Qu in 13<br>spp.          |

**Tableau :** Mensuration des feuilles *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)).

| <b>N°</b> | <b>Largeur</b> | <b>Longueur</b> | <b>Signes</b> |
|-----------|----------------|-----------------|---------------|
| 1         | 5,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 2         | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 3         | 6,0 mm         | 1,5 cm          | /             |
| 4         | 4,5 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 5         | 3,5 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 6         | 4,5 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 7         | 4,5 mm         | 0,5 cm          | /             |
| 8         | 5,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 9         | 3,0 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 10        | 3,5 mm         | 1,2 cm          | /             |
| 11        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 12        | 4,9 mm         | 1,1 cm          | /             |
| 13        | 4,2 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 14        | 3,1 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 15        | 4,0 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 16        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 17        | 3,8 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 18        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 19        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 20        | 3,5 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 21        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 22        | 4,0 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 23        | 3,5 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 24        | 5,0 mm         | 1,2 cm          | /             |
| 25        | 4,2 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 26        | 6,0 mm         | 1,5 cm          | /             |
| 27        | 3,3 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 28        | 5,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 29        | 3,5 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 30        | 4,0 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 31        | 3,5 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 32        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 33        | 4,1 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 34        | 4,0 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 35        | 4,5 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 36        | 3,5 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 37        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 38        | 3,8 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 39        | 3,5 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 40        | 2,0 mm         | 0,7 cm          | /             |
| 41        | 3,8 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 42        | 3,0 mm         | 0,5 cm          | /             |
| 43        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 44        | 3,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 45        | 3,0 mm         | 0,5 cm          | /             |
| 46        | 4,0 mm         | 1,0 cm          | /             |
| 47        | 3,0 mm         | 0,8 cm          | /             |
| 48        | 3,5 mm         | 0,9 cm          | /             |
| 49        | 3,0 mm         | 0,5 cm          | /             |
| 50        | 5,0 mm         | 1,0 cm          | /             |

**Tableau.** Mensuration des gousses *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)).

| N° | Nb. Graines / Gousse | Larg. Gousse | Long. Gousse | Aspects des gousses                           |
|----|----------------------|--------------|--------------|-----------------------------------------------|
| 01 | 3                    | 0,7 cm       | 2,5 cm       | 2 points noir et 1 point marron               |
| 02 | 2                    | 0,7 cm       | 2,3 cm       | /                                             |
| 03 | 3                    | 0,5 cm       | 2,3 cm       | Couleur jaune et point marron                 |
| 04 | 3                    | 0,6 cm       | 3,0 cm       | Couleur jaune et vert                         |
| 05 | 3                    | 0,6 cm       | 1,8 cm       | Couleur jaune et 2 points marron              |
| 06 | 3                    | 0,6 cm       | 2,4 cm       | Retournement de la poche                      |
| 07 | 1                    | 0,6 cm       | 1,5 cm       | /                                             |
| 08 | 3                    | 0,5 cm       | 2,2 cm       | Point marron                                  |
| 09 | 2                    | 0,5 cm       | 1,8 cm       | Couleur jaune et 2 points marron              |
| 10 | 1                    | 0,8 cm       | 2,2 cm       | Couleur jaune et vert                         |
| 11 | 5                    | 0,6 cm       | 2,8 cm       | Point marron                                  |
| 12 | 1                    | 0,5 cm       | 1,5 cm       | /                                             |
| 13 | 1                    | 0,7 cm       | 2,2 cm       | /                                             |
| 14 | 2                    | 0,6 cm       | 1,9 cm       | /                                             |
| 15 | 2                    | 0,6 cm       | 2,3 cm       | /                                             |
| 16 | 3                    | 0,5 cm       | 2,2 cm       | Point marron                                  |
| 17 | 1                    | 0,7 cm       | 1,7 cm       | 4 Points marron                               |
| 18 | 1                    | 0,7 cm       | 2,2 cm       | Couleur jaune et 2 points marron              |
| 19 | 4                    | 0,7 cm       | 2,8 cm       | /                                             |
| 20 | 1                    | 0,5 cm       | 1,4 cm       | Couleur jaune et vert                         |
| 21 | 1                    | 0,7 cm       | 1,7 cm       | Couleur jaune et vert foncé                   |
| 22 | 2                    | 0,4 cm       | 1,5 cm       | Couleur jaune et vert 2 points marron         |
| 23 | 1                    | 0,7 cm       | 2,0 cm       | Couleur jaune et vert foncé, 1 point marron   |
| 24 | 2                    | 0,6 cm       | 2,5 cm       | 2 points marron                               |
| 25 | 2                    | 0,6 cm       | 3,0 cm       | /                                             |
| 26 | 2                    | 0,6 cm       | 2,5 cm       | Point marron                                  |
| 27 | 3                    | 0,6 cm       | 2,3 cm       | Point noir                                    |
| 28 | 1                    | 0,7 cm       | 1,7 cm       | Couleur jaune                                 |
| 29 | 2                    | 0,7 cm       | 2,9 cm       | /                                             |
| 30 | 1                    | 0,5 cm       | 1,8 cm       | /                                             |
| 31 | 1                    | 0,7 cm       | 2,9 cm       | Couleur verte foncé et 1 point marron         |
| 32 | 2                    | 0,6 cm       | 2,0 cm       | /                                             |
| 33 | 3                    | 0,6 cm       | 2,3 cm       | 4 points marron                               |
| 34 | 1                    | 0,7 cm       | 1,9 cm       | 1 point marron                                |
| 35 | 2                    | 0,5 cm       | 3,1 cm       | /                                             |
| 36 | 1                    | 0,7 cm       | 2,5 cm       | 2 points marron                               |
| 37 | 3                    | 0,7 cm       | 2,8 cm       | Couleur jaune et 6 points marron              |
| 38 | 1                    | 0,7 cm       | 1,9 cm       | /                                             |
| 39 | 4                    | 0,7 cm       | 3,0 cm       | 3 points marron                               |
| 40 | 1                    | 0,5 cm       | 1,4 cm       | 2 points marron                               |
| 41 | 2                    | 0,7 cm       | 2,6 cm       | /                                             |
| 42 | 4                    | 0,6 cm       | 2,8 cm       | /                                             |
| 43 | 2                    | 0,5 cm       | 2,2 cm       | 3 points noir                                 |
| 44 | 2                    | 0,6 cm       | 2,5 cm       | 1 point noir                                  |
| 45 | 4                    | 0,6 cm       | 2,6 cm       | 2 points marron avec retournement de la poche |
| 46 | 1                    | 0,6 cm       | 1,6 cm       | Couleur jaune et verte, 4 points noir         |
| 47 | 2                    | 0,5 cm       | 2,3 cm       | /                                             |
| 48 | 1                    | 0,6 cm       | 1,6 cm       | 2 points marron                               |
| 49 | 1                    | 0,7 cm       | 2,2 cm       | Couleur jaune et verte                        |
| 50 | 2                    | 0,6 cm       | 2,3 cm       | Couleur jaune et 2 points marron              |

**Tableau.** Analyses pédologiques (réalisées sur du sol proche de la rhizosphère du genêt saharien) de *C. saharae* ((Coss et Dur) Boatwr et B.E.van Wy).

| Echantillons | pH  | Ce<br>(us /cm) | MO%  | CT<br>% | CA<br>‰ | P2O5<br>‰ | N‰ | K<br>ppm | A%   | L%   | S%    |
|--------------|-----|----------------|------|---------|---------|-----------|----|----------|------|------|-------|
| MI2S         | 7.7 | 76.8           | 0.23 | 67.9    | 1.9     | 0.06      | 0  | 68.75    | 0.6  | 3.75 | 88.78 |
| AL2S         | 7.9 | 105.2          | 0.2  | 83      | 0.37    | .....     | 0  | 56.25    | 3.15 | 3.6  | 88.6  |
| Al2p20       | 7.7 | 101.3          | 0.33 | 81.1    | 0.12    | .....     | 0  | 87.5     | 0.2  | 3.2  | 93.75 |
| MI2p156      | 8.2 | 144.5          | 0.46 | 88      | 0.25    | 0.04      | 0  | 100      | 2.45 | 0.65 | 92.15 |

Ce = conductivité électrique, MO = matière organique, CA= calcaire actif, CT = calcaire total, N= azote, K = potassium, A = argile, L = limons, S = sables.

Liste des echantillons :

MI2S : Sable mois de mars en surface

AL2S : Sable mois d'avril en surface

Al2p20 : Sable mois d'avril en profondeur de 20cm

MI2p156 : Sable mois de mars en profondeur de 156 cm

**Tableau.** Dosage de l'azote total par organe de la partie souterraine (A) et de la partie aérienne (B) de *C. saharae* ((Coss. et Dur.)Boatwr. et B.E.van Wyk)

| A : Désignation 1       | T'aux d'azote | Taux de protéine |
|-------------------------|---------------|------------------|
| Racine + Rhizosphère    | 0.478%        | <b>2.987%</b>    |
| Racine + Rhizosphère    | 0.48%         | <b>3.00%</b>     |
| Racine sans Rhizosphère | 0.925 %       | <b>5.78%</b>     |
| Racine sans Rhizosphère | 0.92 %        | <b>5.70%</b>     |
| Sable                   | 0.07 %        | <b>0.10%</b>     |

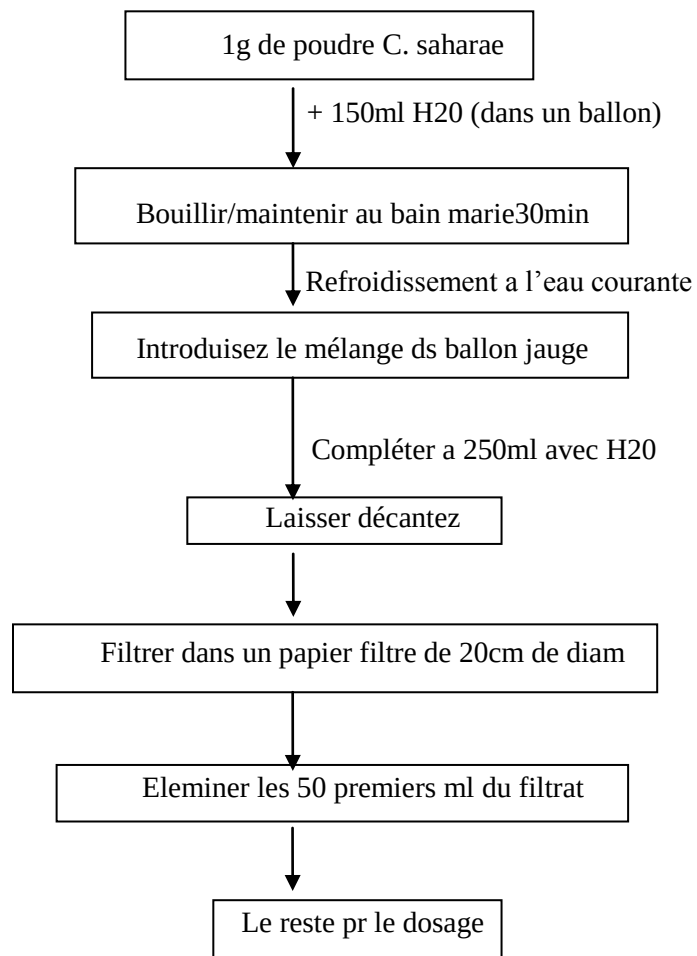
N.B: le volume de l'essai à blanc est de 1.8ml

Désignation 2 : catalyseur : 91%k<sub>2</sub>so<sub>4</sub>+9% Cu so<sub>4</sub>)

Destination 1 et 2 : catalyseur : 91% k<sub>2</sub>so<sub>4</sub>+9% Cu so<sub>4</sub>

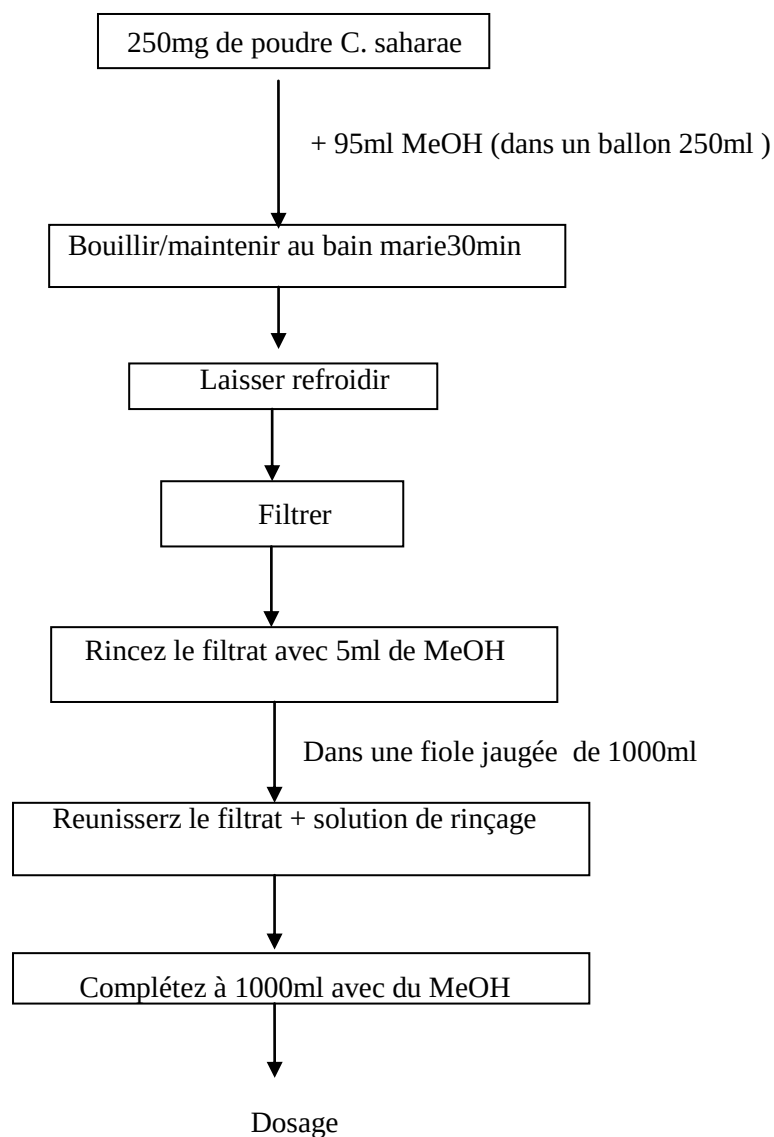
| B : Désignation 2 | T'aux d'azote | Taux de protéine |
|-------------------|---------------|------------------|
| Téguments         | 1.90 %        | <b>11.90%</b>    |
|                   | 1.94%         | <b>12.14%</b>    |
|                   | 1.89%         | <b>11.81%</b>    |
|                   | 1.92%         | <b>12.01%</b>    |
| Graines           | 4.76%         | <b>29.75 %</b>   |
|                   | 4.79%         | <b>29.96%</b>    |
|                   | 5.19%         | <b>32.44 %</b>   |
|                   | 5.21%         | <b>32.56 %</b>   |
| Fleurs            | 2.69%         | <b>16.84%</b>    |
|                   | 2.69%         | <b>16.84%</b>    |
|                   | 2,66%         | <b>16,63%</b>    |
|                   | 2.51 %        | <b>16.25 %</b>   |
| Rameaux           | 1,58%         | <b>09,88%</b>    |
|                   | 1,58%         | <b>09,88%</b>    |
|                   | 1.60%         | <b>10,00 %</b>   |
|                   | 1.58 %        | <b>9.875 %</b>   |

## Dosage des poly phénols totaux (Folin-Ciocalteu)



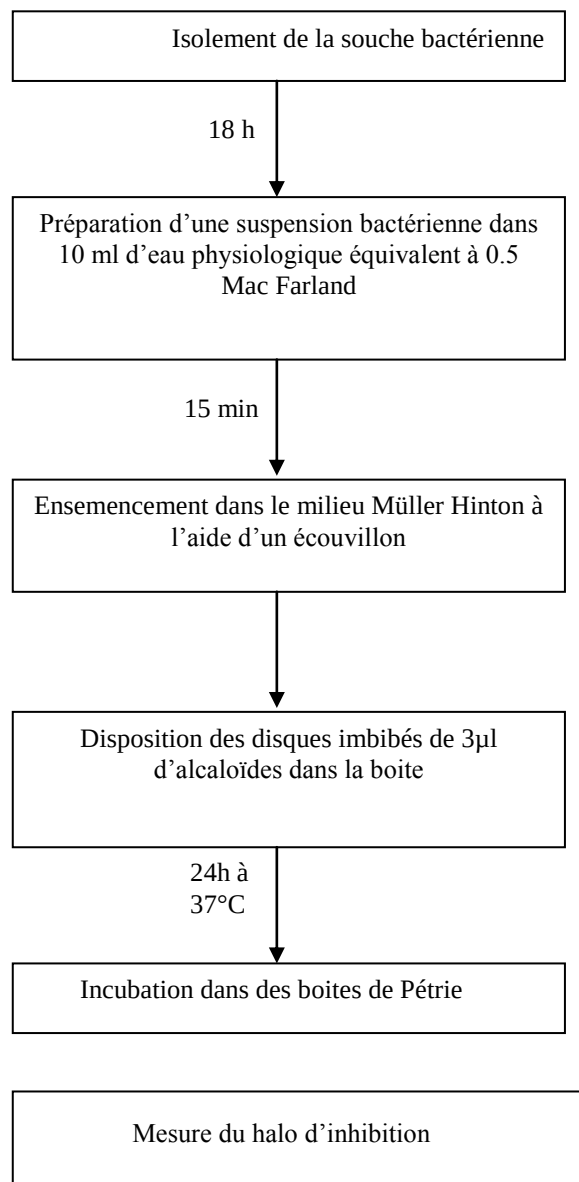
### Protocole du dosage des poly phénols

## Dosage des flavonoïdes totaux (Chlorure d'aluminium)

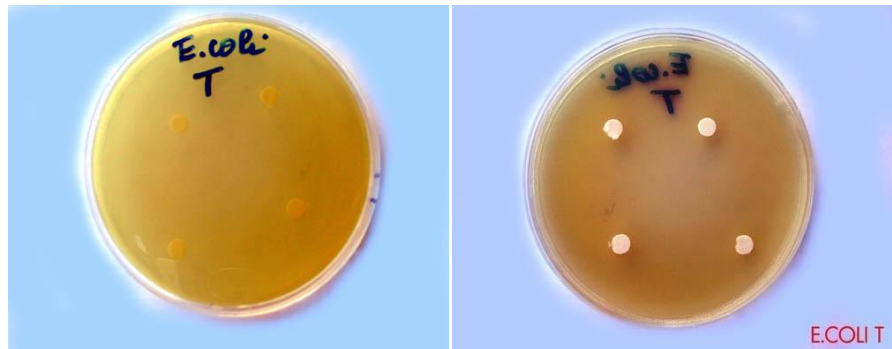


### Protocole du dosage des flavonoïdes

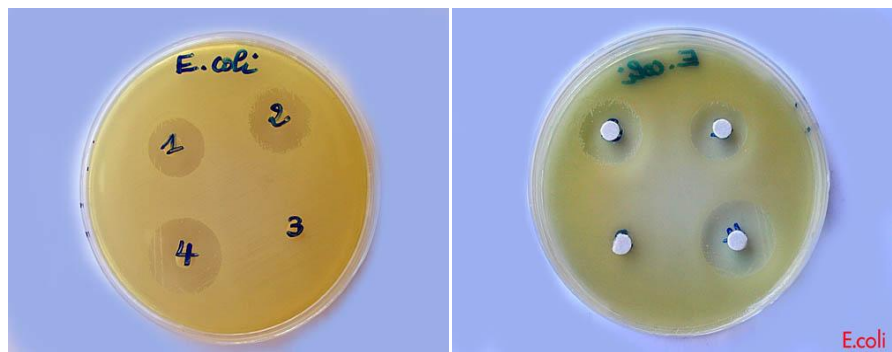




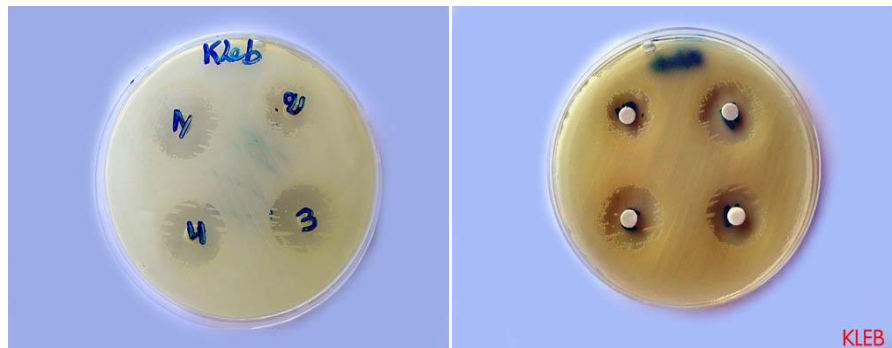
**Figure :** Etapes de l'étude sur l'activité antibactérienne.



(a)



(b)



(c)

**Figure.** Diamètre d'inhibition des extraits alcaloïdiques de *C.saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)).

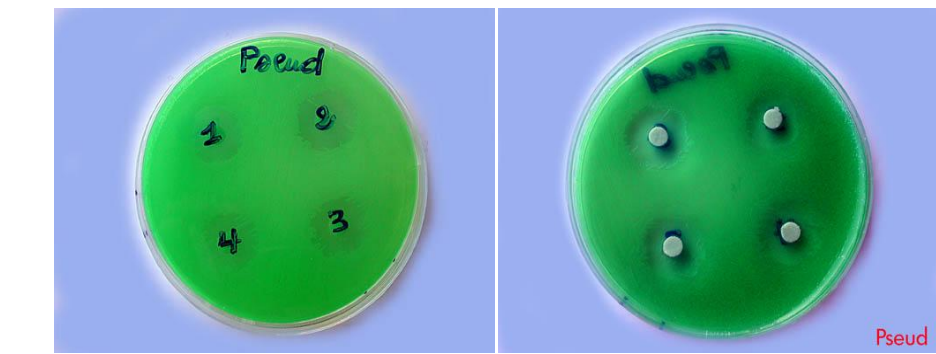
**(a) : *Escherichia coli* (témoin) , (b) : *Escherichia coli* , (c) : *Klebsiella***

**1 :** Les extraits alcaloïdiques des fleurs

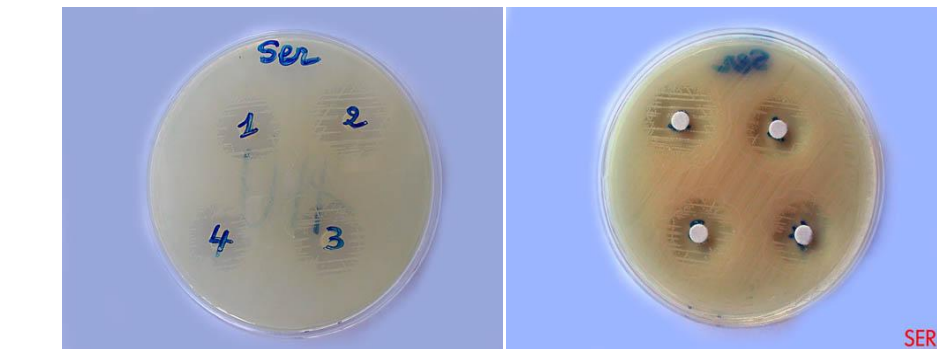
**2 :** Les extraits alcaloïdiques des rameaux

**3 :** Les extraits alcaloïdiques des téguments

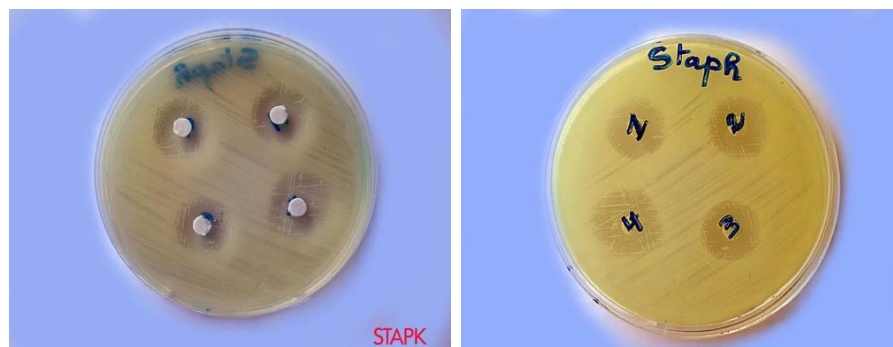
**4 :** Les extraits alcaloïdiques des graines



(d)



(e)



(f)

**Figure.** Diamètre (mm) d'inhibition des extraits alcaloïdiques de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.) .

**(d) :** *Pseudomonas aeruginosa*, **(e) :** *Serratia* , **(f) :** *Staphylococcus aureus*

1 : Les extraits alcaloïdiques des fleurs      3 : des t Les extraits alcaloïdiques égyptiens  
2 : Les extraits alcaloïdiques des rameaux      4 : Les extraits alcaloïdiques des graines

**Tableau.** Diamètre (mm) d'inhibition des extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.) ;(solution mère 1 g1/ml)

| Alcaloïdes | Espèces                       | Souches   | Diamètre de la Zone d'inhibition (mm) |
|------------|-------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| fleurs     | <i>Escherichia coli</i>       | ATCC      | 20                                    |
|            | <i>Klebsiella</i>             | Résistant | 23                                    |
|            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC      | 15                                    |
|            | <i>Serratia</i>               | Sensible  | 20                                    |
|            | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC      | 23                                    |
| Rameaux    | <i>Escherichia coli</i>       | ATCC      | 20                                    |
|            | <i>Klebsiella</i>             | Résistant | 19                                    |
|            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC      | 20                                    |
|            | <i>Serratia</i>               | Sensible  | 23                                    |
|            | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC      | 20                                    |
| Péricarpes | <i>Escherichia coli</i>       | ATCC      | 6< (0)                                |
|            | <i>Klebsiella</i>             | Résistant | 22                                    |
|            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC      | 22                                    |
|            | <i>Serratia</i>               | Sensible  | 22                                    |
|            | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC      | 20                                    |
| Graines    | <i>Escherichia coli</i>       | ATCC      | 24                                    |
|            | <i>Klebsiella</i>             | Résistant | 21                                    |
|            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC      | 24                                    |
|            | <i>Serratia</i>               | Sensible  | 22                                    |
|            | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC      | 23                                    |

**Tableau.** Résultat de l'activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques de *C .saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)) en fonction des diamètres d'inhibition.

| Les différents organes de la plante | Souches testées                                                                                                                  | Diamètre de la zone d'inhibition | Classe   |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------|
| Fleurs                              | <i>Escherichia coli</i><br><i>Klebsiella</i><br><i>Serratia</i><br><i>Staphylococcus aureus</i>                                  | $\geq 20\varnothing$             | Classe1  |
| Rameaux                             | <i>Escherichia coli</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Serratia</i><br><i>Staphylococcus aureus</i>                      |                                  |          |
| Péricarpes                          | <i>Klebsiella</i><br><i>Serratia</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Staphylococcus aureus</i>                            |                                  |          |
| Graines                             | <i>Escherichia coli</i><br><i>Klebsiella</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Serratia</i><br><i>Staphylococcus aureus</i> |                                  |          |
| Fleurs                              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                                                                    | $20 > \varnothing > 14$          | Classe 2 |
| Rameaux                             | <i>Klebsiella</i>                                                                                                                |                                  |          |
| Péricarpes                          | <i>Escherichia coli</i>                                                                                                          | $< 8\varnothing$                 | Classe 3 |

**Tableau.** La CMI des différents extrais alcaloidiques de *C. saharae* ((Coss. & Dur.) Boatwr. & B.-E. van.)).

Les trois souches de référence ATCC à différentes dilutions.

|                   |                               | Diamètre de la zone d'inhibition (mm) |       |     |     |      |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------|-----|-----|------|
| Les<br>alcaloïdes | Souches                       | 1/2                                   | 1/3   | 1/4 | 1/5 | 1/10 |
| Graine            | <i>Escherichia coli</i>       | 16 mm                                 | 13 mm | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 mm                                 | 14 mm | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>  | 13 mm                                 | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |
| Fleur             | <i>Escherichia coli</i>       | 18 mm                                 | 15 mm | 13  | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | < 6                                   | < 6   | mm  | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>  | < 6                                   | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |
| Rameaux           | <i>Escherichia coli</i>       | 18 mm                                 | 12 mm | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | < 6                                   | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>  | < 6                                   | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |
| Péricarpes        | <i>Escherichia coli</i>       | < 6                                   | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 17 mm                                 | 12 mm | < 6 | < 6 | < 6  |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>  | < 6                                   | < 6   | < 6 | < 6 | < 6  |

Article

## Rapid Identification of Antioxidant Compounds of *Genista saharae* Coss. & Dur. by Combination of DPPH Scavenging Assay and HPTLC-MS

Djamila Meriane <sup>1</sup>, Grégory Genta-Jouve <sup>2</sup>, Mohamed Kaabeche <sup>1</sup>, Sylvie Michel <sup>2</sup> and Sabrina Boutefnouchet <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques, Université Ferhat Abbas, Sétif 19000, Algeria; E-Mails: merianed@yahoo.fr (D.M.); Labo\_brpdz19@hotmail.com (M.K.)

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, U.M.R./C.N.R.S. 8638, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France; E-Mails: gregory.genta-jouve@parisdescartes.fr (G.G.-J.); sylvie.michel@parisdescartes.fr (S.M.)

\* Author to whom correspondence should be addressed;

E-Mail: sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr; Tel.: +33-1-5373-9811; Fax: +33-1-4046-9658.

Received: 12 March 2014; in revised form: 29 March 2014 / Accepted: 1 April 2014 /

Published: 9 April 2014

---

**Abstract:** *Genista* species are sources of antioxidant phenolic compounds such as *O*- and *C*-glycosylflavonoids and isoflavonoids. A combination of a DPPH scavenging assay with HPTLC-MS, a fast and efficient method for identification of bioactive compounds, has been applied for evaluation of the radical scavenging activity of metabolites from *Genista saharae* Coss. & Dur. Different organs collected at various periods have been compared. Identification of antioxidant compounds was obtained by elution of the major DPPH-inhibition zones. The resulting HPTLC-MS analysis under moderately polar conditions, coupled to the DPPH results led to the putative identification of two antioxidant isoflavone aglycones: 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone (**1**) and ficuisoflavone (**3**), whereas polar migration conditions led to the identification of the glycosides 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (**4**) and 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**5**). Evaluation of percentage of inhibition of DPPH radical by the purified isoflavone **4** from the root extract showed that it affords a moderate contribution to the total radical scavenging activity of the extract.

**Keywords:** antioxidant; HPTLC-MS; *Genista saharae*; DPPH scavenging assay

---

## 1. Introduction

Oxidative stress is implied in many inflammatory processes related to chronic inflammatory diseases such as cardiac dysfunction, neurodegenerative diseases or diabetes [1]. A large number of phenolic compounds such as flavonoids, isoflavones, and phenolic acids have shown antioxidant activity. Benefits of antioxidant phenolic compounds from dietary or food supplement sources in the prevention of chronic diseases have been reported in a large number of studies [2,3]. The *Genista* genus, from the family of Fabaceae, consists in 87 species, mainly represented in the Mediterranean area. Among them, 11 species are endemic of Algeria [4]. Phytochemicals isolated from *Genista* species consist in piperidinic alkaloids, *O*- and *C*-glycosylflavonoids and isoflavonoids [5]. *Genista* species have various uses through Mediterranean area, such as dietary or medicinal applications, animal feeding, and also tinctorial use. Antioxidant activities of several *Genista* species have been reported in the literature for crude extracts of *G. tenera*, *G. sessifolia* and *G. tinctoria*, *G. cadasonensis*, *G. sandrasica* and *G. vuralii*. [6–9]. *Genista saharae* Coss. & Dur. Section *Spartidium* Spach. (formerly *Spartidium saharae* Coss. & Dur) is a Saharian endemic shrub, localised in North Africa (Algeria, Libya, Morocco, Tunisia, Egypt) [4,10]. It is mainly used for feeding animals.

## 2. Results and Discussion

Different samples of *Genista saharae* were collected at the station of Chott el Hodna (Oued El-Maadher, Boussaâda, Wilaya of M'Sila, Algeria) in relation with different phenologic states of the plants, corresponding to the flowering phase and fructification phase. Stems, flowers and roots have been collected. Before DPPH scavenging assay and HPTLC-MS analysis, a preliminary evaluation of total phenolic and flavonoids content of the different organs of collected sample was performed (Table 1). Flavonoids content vary from 0.212% to 2.614%, and total phenolic content from 1.996% to 9.328%. Highest amounts for both were observed for roots collected in August and flowers collected in March. Regarding flowers, these results were in accordance with the ecophysiology of phenolic biosynthesis related to flower development, in which the transcription rate of biosynthetic genes is enhanced [11]. Concerning the roots, it is well documented that plants from the Fabaceae family produce flavonoids in the rhizosphere to stimulate nodulation factors (Nods) [12]. Interestingly, we observed that the flavonoids amount was 10-fold higher when roots were collected in August (2.441%) *versus* in March (0.221%), which is in favor of an important nodulation process during this period.

In order to screen our extracts for antioxidant compounds we used a DPPH scavenging assay as previously described [13,14]. The different organs of the plant were extracted following the literature protocol and 2 µg of each sample were been applied on the plate using an automated sampler. The first plate was eluted with a 95:5 v/v mixture of dichloromethane and methanol using the automated development chamber and a 5 min solvent pre-saturation. Following the elution, the plate has been dried for 5 min.

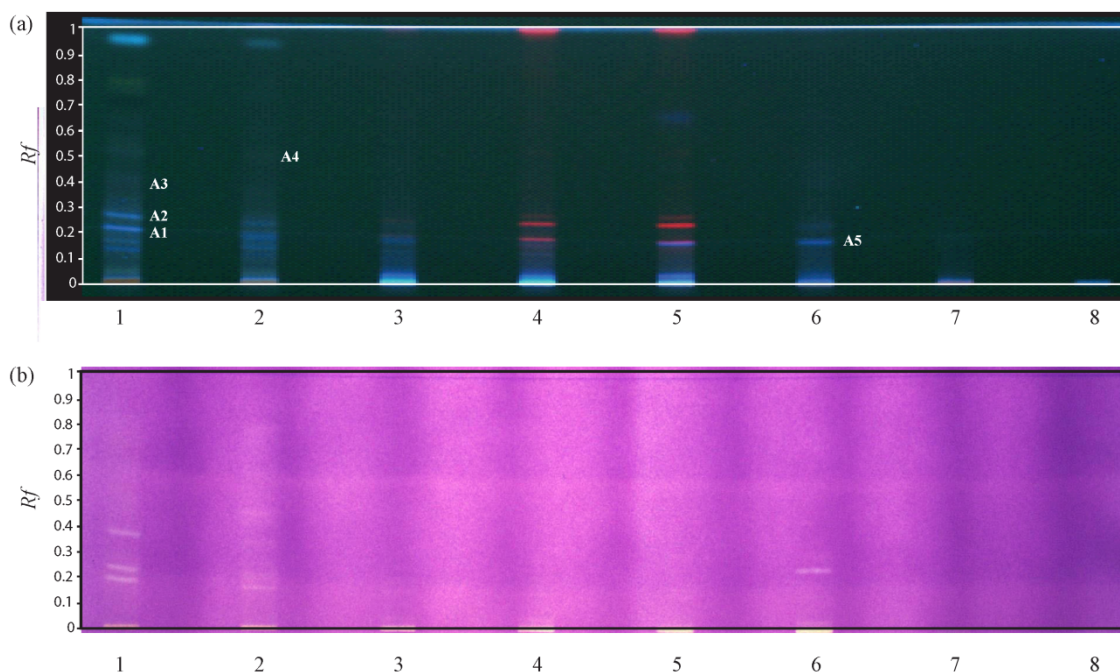


**Table 1.** Measured phenolic and flavonoid content of each extract.

| Sample | Part        | Harvesting period | Extraction Yield (%) | % Flavonoids content (SD) | % Total phenolic content (SD) |
|--------|-------------|-------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1      | Roots       | August 2009       | 16.31                | 2,441(0,012)              | 9,328(0,217)                  |
| 2      | Roots       | March 2010        | 8.78                 | 0,212(0,014)              | 5,490(0,198)                  |
| 3      | Stems       | August 2009       | 10.93                | 0,213(0,022)              | 5,799(0,148)                  |
| 4      | Stems       | March 2010        | 15.07                | 0,924(0,012)              | 6,809(0,106)                  |
| 5      | Flowers     | March 2010        | 18.00                | 2,614(0,028)              | 9,067(0,144)                  |
| 6      | Fruit pods  | August 2009       | 6.69                 | 1,273(0,012)              | 5,062(0,163)                  |
| 7      | Fruit Seeds | August 2009       | 7.70                 | 0,518(0,016)              | 1,996(0,163)                  |

A first observation of the plate under UV at 366 nm led to the conclusion that an important part of the extract was not eluted using this mobile phase leaving an important spot at  $R_f = 0$  for almost all the tracks. Nonetheless, several compounds were separated under these conditions, especially in tracks 1, 4 and 5 (Figure 1). We further proceed with the antioxidant activity assay by spraying a 0.05% solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) on the plate. Observation of the plate evidenced several yellow bands indicating the locations of antioxidant compounds (Figure 1).

**Figure 1.** HPTLC analysis, tracks 1–7: *G. saharae* methanolic extracts of samples 1–7. Track 8: purified 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (a) HPTLC detection at 366 nm; (b) Picture of the plate after reaction with DPPH.



Five spots were identified as putative moderate antioxidant compounds and in order to proceed with the identification of the compounds, the TLC-MS interface was used on a second plate (using exactly the same protocol). Acquisition of the mass spectra was realised in both positive and negative ionisation modes giving better results in the negative one. The most probable  $m/z$  values for each spot are given in Table 2. The  $m/z$  values were then compared to the data contained in the dictionary of

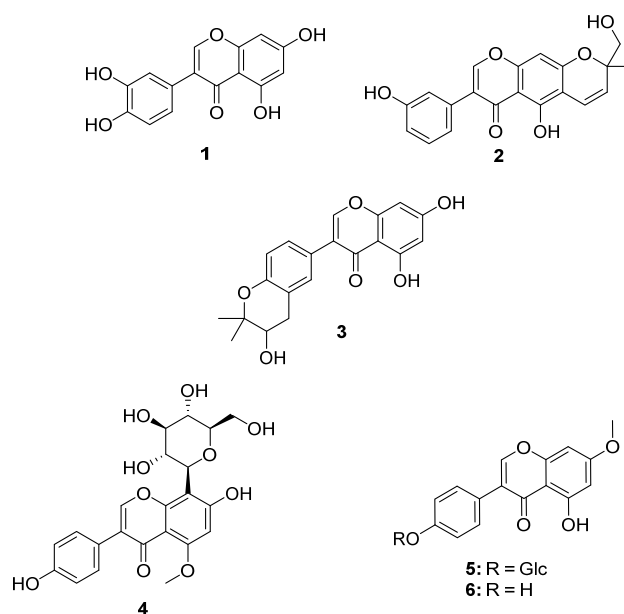
natural products (DNP) for the genus *Genista* [15]. From the several ions observed on the MS spectrum of the spot A1, the most intense corresponded to the  $m/z$  299.2  $[M-H]^-$ .

**Table 2.** Most probable  $m/z$  value and putative structure for each spot.

| Spot numbers | $m/z$ values<br>$[M-H]^-$ | Putative structures                                                                       |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| A1           | 299.2                     | -                                                                                         |
| A2           | 285.1                     | 3',4',5,7-Tetrahydroxyisoflavone ( <b>1</b> )                                             |
| A3           | 351.2                     | Hydroxyalpinumisoflavone ( <b>2</b> )                                                     |
| A4           | 465.2                     | -                                                                                         |
| A5           | 285.1/353.1               | Tetrahydroxyisoflavone ( <b>1</b> )/ficusoflavone ( <b>3</b> )                            |
| B1           | -                         | -                                                                                         |
| B2           | 445.2                     | 5-Methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosyl ( <b>4</b> )                                   |
| B3           | 445.2                     | 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside ( <b>5</b> ) |
| B4           | 283.1                     | 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone ( <b>6</b> )                                           |
| B5           | 445.2/575.6/325.2         | -                                                                                         |

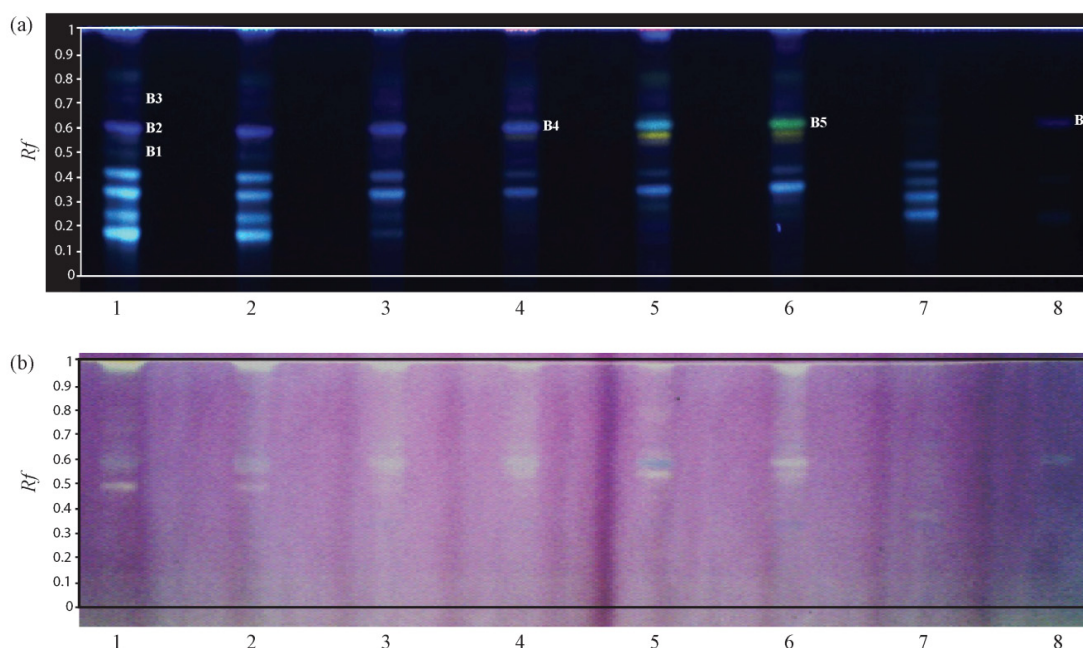
The database query for this value did not give any hits and in order to obtain some information on the compound family, a third plate was realised and further derivatised using 2-aminoethyldiphenyl borate. Unfortunately, this operation brought out a very high number of bands (implying a very large number of compounds) but did not give a clear evidence to conclude the family of the compound present in spot A1.

The analysis was followed by the analysis of spot 2. The mass spectrum obtained gave a one major ion at  $m/z$  285.1  $[M-H]^-$ . Although no compound corresponding to this molecular weight was found in the output from the DNP, based on the molecular weight and the retention factor ( $R_f$ ), this compound was proposed to be a tetrahydroxyisoflavone. Only one tetrahydroxyisoflavone has been reported from plant of the *Genista* genus, the compactin isolated from *Genista compacta* [16]. As compactin is glycosylated, the product found in spot A2 could be the corresponding aglycone, *i.e.*, 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone (**1**). The MS analysis of the third spot gave also one major ion at  $m/z$  351.2 and a database search for the genus *Genista* gave only one output: hydroxyalpinumisoflavone (**2**), previously reported from *Genista ephedroides* [17]. Despite the nice isotopic peak observed in the mass spectrum of A4 at  $m/z$  465.2, no conclusion could be made on the identity of this compound. The last spot (A5) that has been studied using the MS was located in track 6 corresponding to the seeds extract gave a mixture of two ions at  $m/z$  285.1 (80%) and 353.2 (20%). The first ion was already observed in the first extract and thus could be putatively identified as **1**. The second important ion was observed at  $m/z$  353.2  $[M-H]^-$ , and query of the DNP for this target mass in this genus gave only one output: ficusoflavone (**3**), previously isolated from *Genista corsica* [18]. The structures of these compounds are shown in Figure 2.

**Figure 2.** Putative structures of identified compounds.

Although several compounds separated using the 95:5 v/v mixture of dichloromethane and methanol exhibited antioxidant activity, an important yellow spot was observed for almost all tracks at  $R_f = 0$ . This indicated that a larger number of compounds reacting with DPPH could be separated using a more polar eluant. A mixture, typically used for flavonoids [19], namely ethyl acetate, formic acid, acetic acid, water 100:11:11:26 v/v/v/v was then used for the development of the plates. The change of eluant resulted in a nice separation of other antioxidant compounds as shown in Figure 3.

**Figure 3.** HPTLC analysis, tracks 1–7: *G. saharae* methanolic extracts of samples 1–7. Track 8: purified 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (a) HPTLC detection at 366 nm after derivatisation with 2-aminoethyldiphenyl borate; (b) Picture of the plate after reaction with DPPH.



As illustrated in Figure 3, all the different extracts had compounds reacting with DPPH. Six spots were identified and further studied by HPTLC-MS using the previously described conditions. The identification started with the first spot of the track 1 (B1). Despite a clear antioxidant activity, the acquisition of the mass spectrum of the compound did not lead to clear ions that could be identified. Better results were obtained with the elution of the spot B2 using the HPTLC-MS interface. Only one important ion at  $m/z$  445.2 was observed and looking at the DNP, two glycosylated isoflavones were consistent with this molecular weight: 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (**4**) and 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside (**5**), the first being isolated from *Genista saharae* [20]. Interestingly, the third spot of the track 1 (B3) gave the same result during the MS analysis. As already observed for B2, only one intense ion was present on the mass spectrum at  $m/z$  445.2  $[M-H]^-$ . In order to discriminate those two compounds, an evaluation of the theoretical logP values was realised using the ChemBioDraw Ultra 13.0 Suite (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). The compound eluted from spot B2 should have a logP value lower than the one present in B3 due to its reduced migration distance on the plate. The values calculated were  $-0.62$  and  $0.17$  for **4** and **5**, respectively. These results led to the attribution of the structure to each spot as follows: **4** was located in spot B2 and **5** was located in spot B3. The next spot that has been studied was located in track 4 corresponding to the methanolic extract of the stems (March). The MS analysis of spot B4 gave an intense ion at  $m/z$  283.1  $[M-H]^-$ . This molecular weight fitted well with one output from the DNP query: 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone reported in *Genista carinalis* [21]. One last spot (B5) seemed to exhibit antioxidant activity. Its  $R_f$  was slightly higher than the one measured for B4, and the colour obtained after derivatisation with 2-aminoethyldiphenyl borate was different. Unfortunately, the TLC-MS analysis did not give any good results, as several ions with comparable intensities were observed. Surprisingly, several compounds revealed by 2-aminoethyldiphenyl borate (Figure 3a,  $R_f$  0.1 to 0.4) did not react with DPPH, despite their phenolic structure.

### 2.1. Identification of Compound 4

In order to confirm the identification of compound **4**, we proceed to the purification of the crude methanolic extract. The purification yielded 340 mg of compound **4**. A  $^1\text{H-NMR}$  spectrum was acquired and the chemical shifts observed matched those previously published by Mekikio *et al.* The absolute configuration of the sugar moiety was determined by comparison of the sign of the specific rotation with the data published after total asymmetric synthesis of **4** [22]. The positive sign confirmed a D configuration of the glucose. Compound **4** was then applied to the HPTLC plates in track 8 to compare the  $R_f$  with the other extracts (B6).

### 2.2. Radical Scavenging Capacity (DPPH)

As sample 1 appeared to us as the most interesting concerning its antioxidant potential, percentage of inhibition of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical by the crude extract was evaluated. Concentrations from  $5 \times 10^{-3}$  mg mL $^{-1}$  to  $15 \times 10^{-3}$  mg mL $^{-1}$  were analysed in order to establish the IC $_{50}$  which was calculated as 8.27  $\mu$ g mL $^{-1}$  corresponding to 0.49 mg of dried plant. The percentage of inhibition of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical by the purified compound **4** varied from 15.12% (at 20  $\mu$ g mL $^{-1}$ ) to 34.43% of inhibition (80  $\mu$ g mL $^{-1}$ ), so no IC $_{50}$  was calculated.

These results show that compound **4** is a weak contributor to the total radical scavenging capacity of the root extract.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Solvents were purchased from Carlo Erba-SDS (Val de Reuil, France). Water was distilled from deionized water. The automatic TLC sampler (ATS4) and the automatic developing chamber (ADC2) from CAMAG (Muttens, Switzerland) were used for the HPTLC. Detection was realised using the TLC visualiser, the TLC scanner 3 and the TLC-MS interface also purchase from CAMAG. Derivatisation of the plates was performed using the DESAGA sprayer. For TLC-MS, a binary HPLC Agilent pump (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to a ABSciex Qtrap 2000 triple quadrupole mass spectrometer. The mass spectra acquisition was realised using electrospray ionisation in the negative mode. An ARMEN Modular 2 heads pump connected to a Varian Pursuit pre-column and column (C18, 250 × 300 mm) and a Büchi UV/Vis detector was used for preparative HPLC purification.

#### 3.2. Plant Material

Different samples of *Genista saharae* Coss. & Dur. were collected at the station of Chott el Hodna (Oued El-Maadher, Boussaâda, Wilaya of M'Sila, Algeria). Specimens were identified by Professor Mohamed Kaabeche (University Ferhat Abbas, Setif, Algeria). Voucher specimens are kept in the Museum of the Department of Pharmacognosy (University Paris-Descartes). Samples were collected in relation with phenologic state of the plant. A first collection was performed during the flowering phase in March 2010 (flowers, stems and roots). A second sampling was performed after the fructification phase in August 2010 (fruits, stems and roots). All samples were dried at room temperature, protected from light. Seeds were then separated from teguments of dried fruits. The seven samples were then crushed and submitted to extraction.

#### 3.3. Extraction

Ten g of each sample material were extracted with MeOH (100 mL) at room temperature for 60 min. The solvent was then evaporated under reduced pressure at 40 °C yielding 6.69 to 18.00 g of crude extract. Extraction yields of each sample are presented in Table 1.

#### 3.4. Total Polyphenol and Flavonoids Dosage

##### 3.4.1. Total Phenolic Content

Total phenolic content of each sample was determined by the Folin-Ciocalteu method, as described in the European Pharmacopoeia 8th edition [23]. An aliquot of each powdered samples (1.0 g) was extracted with water. Briefly, 5.0 mL of the adjusted solutions (1.0 g in 250 mL) were mixed with water to a total volume of 25.0 mL. To 5.0 mL of the obtained solutions, phosphotungstic reagent (1.0 mL) was added and completed with a calcium carbonate solution (150 g L<sup>-1</sup> in water) to a total volume of 50 mL. The absorbance at 715 nm (*A* extract) was measured exactly after 2 min after this last addition

and compared to the compensation solution. The reference solution of pyrogallol was prepared as described in [24], and the same method was applied to determine the reference absorbance ( $A_{\text{pyrogallol}}$ ), at 715 nm. The percentage of total polyphenols, expressed as pyrogallol were calculated according to the following formula:

$$\%_{\text{total polyphenol}} = \frac{13.12(A_{\text{Extract}})}{A_{\text{pyrogallol}}} \times 100$$

Experiments have been performed in triplicate. Results are shown in Table 2.

### 3.4.2. Flavonoids Content

The total flavonoids content was determined following the aluminium chloride colorimetric method described in European Pharmacopoeia 8th edition [24]. Briefly, powdered samples (0.25 g) were refluxed in methanol for 30 min. A portion (5.0 mL) of the adjusted methanolic solutions ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ) was mixed with an aluminium chloride methanolic solution ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) to a total volume of 20.0 mL. After 15 min, the absorbance was measured at 420 nm in comparison with a compensation solution. The percentages of total flavonoids, expressed as hyperoside, were calculated according to the following formula, taking the specific absorbance of hyperoside at 420 nm to be 400:

$$\%_{\text{total flavonoids}} = \frac{A_{\text{Extract}}}{0.25} \times 100$$

Experiments were performed in triplicate. Results are shown in Table 1.

### 3.5. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Assay

The DPPH assay was carried out as follows: For sample 1 methanolic extract: A stock solution of sample 1 extract was prepared (16.32 mg of extract in 10 mL, equivalent to 1 mg/mL of dried plant part). An aliquot (0.3, 0.6, 0.9, 1.2 mL, corresponding to a 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg of dried plant part) of the stock solution was mixed with a methanolic solution of DPPH (1 mM, 1 mL), and brought to 10 mL with methanol. After incubation in the dark at room temperature for 15 min, the absorbance of the solutions was measured at 517 nm. A DPPH blank sample was prepared (1 mL of 1 mM DPPH methanolic solution with 9.0 mL of methanol). The absorbance was readily measured. The decrease in absorbance was recorded for each concentration, in triplicate, and percentage inhibition was calculated according to the following formula:

$$\%_{\text{inhibition}} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extract}})}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

For compound 4: A stock solution of compound 4 was prepared (31.5 mg in 20 mL of methanol). An aliquot (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, corresponding to a 0.315 to 1.25 mg of compound 4) was mixed with a methanolic solution of DPPH (1 mM, 1 mL), and brought to 10 mL with methanol. After incubation in the dark at room temperature for 15 min, the absorbance of the solutions was measured at 517 nm. The percentage of inhibition was calculated following the above formula. The assay was realized in triplicate. Results are presented in Section 2.2. For sample 1 extract, the plots of the percentage of

inhibition in relation of amounts of dried plant parts was used to find the concentration at which 50% radical scavenging occurred ( $IC_{50}$ ).

### 3.6. HPTLC-DPPH Scavenging Assay

The separation of the compounds was carried out using HPTLC silica gel 60 F254 plates  $200 \times 100$  mm obtained from Merck (Darmstadt, Germany) using two mobile phases: ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water 100:11:11:26, v/v/v/v and dichloromethane-methanol 95:5, v/v. After development, the solvent was removed heating the plate at 40 °C for 5 min on a CAMAG TLC plate heater. The DPPH scavenging assay was performed by spraying a 0.05% solution of DPPH on the plate to reveal the zones with antioxidant activities. Quercetin ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) served as positive control. Two  $\mu\text{g}$  of each sample were applied on the plates as follow: roots August (track 1), roots March (track 2); branch August (track 3); branch March (track 4); flowers (track 5); seeds integument (track 6); seeds (track 7); compound **4** (track 8).

### 3.7. HPTLC-MS

For the HPTLC-MS analysis, the interface was connected between the binary pump and the mass spectrometer equipped with the ESI source. An oval shaped extraction head was use for the extraction of the active compounds from the HPTLC plates using a methanol with a flow rate of  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ . Acquisition of the MS spectra was performed in negative ionisation mode with a curtain gas flow rate of 40, temperature of 550 °C and a spray equal to  $-4,500 \text{ V}$ . Most probable  $m/z$  values of the respective zones are listed in the Table 2.

### 3.8. Purification of Compound 4

Two g of crude methanolic extract of sample 1 (roots, August) was dissolved in a water-methanol 8:2 v/v mixture (10 mL) and injected onto the preparative HPLC apparatus. The column was eluted with a linear gradient of methanol in water (100:0 to 75:25), at  $10 \text{ mL min}^{-1}$  to give 340 mg of compound **4** was isolated (yield: 17%) as a colorless powder;  $[\alpha]_D^{20} = +17$ ; (c 0.1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESIMS  $m/z$  445.2  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H-NMR}$  as reported in [20].

## 4. Conclusions

Whereas the DPPH scavenging assay is widely used for identification of antioxidant compounds, combination with HPTLC-MS and comparison to the DNP database represents an efficient approach. In the case of *Genista saharae* Coss. & Dur. methanolic extracts, both polar and apolar isoflavones were found to be the main contributors to antioxidant activity, whereas other phenolics did not react with DPPH at the tested concentrations. These isoflavones were putatively identified as 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone (**1**), ficuisoflavone (**3**), 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (**4**) and 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavone-4'- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside (**5**), according to the matching of MS values with *Genista* genus isolated compounds recorded in the DNP database. Confirmation of the structure of 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone (**4**) was in accordance with previous report of this isoflavone in *Genista saharae* Coss. & Dur.

## Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/4/4369/s1>.

## Acknowledgments

Vincent Cocandeau is deeply acknowledged for his help during the HPTLC-MS data acquisition.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiment: S.B. and G.G-J.; Performed the experiment: D.M., S.B. and G.G-J.; Analysed the data: S.B. and G.G-J.; Wrote the paper: S.M., S.B. and G.G-J.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Johansen, J.; Harris, A.; Rychly, D.; Ergul, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2005**, *4*, 5.
2. Sies, H.; Hollman, P.C.H.; Grune, T.; Stahl, W.; Biesalski, H.K.; Williamson, G. Protection by flavanol-rich foods against vascular dysfunction and oxidative damage: 27th hohenheim consensus conference. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 217–221.
3. Unnikrishnan, M.K.; Veerapur, V.; Nayak, Y.; Mudgal, P.P.; Mathew, G. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. In *Polyphenols in Human Health and Disease*; Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; Chapter 13, pp. 143–161.
4. Quézel, P.; Santa, S. *Nouvelle flore d'algerie et des régions désertiques méridionales*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique: Paris, France, 1963; Volume 1–2. (In French)
5. Bisby, F.A.; Buckingham, J.; Harborne, J.B.; Southon, I.W.; Zarucchi, J.L. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*; Springer: Heidelberg, Germany, 1994; Volume 2.
6. Serrilli, A.M.; Graziosi, V.; Ballero, M.; Foddìs, C.; Serafini, M.; Poli, F.; Scartezzini, P.; Bianco, A. Endemic sardinian plants: The case of *Genista cadasonensis* valsecchi. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 942–947.
7. Orhan, I.E.; Tosun, F.; Tamer, U.; Duran, A.; Alan, B.; Kok, A.F. Quantification of genistein and daidzein in two endemic genista species and their antioxidant activity. *J. Serb. Chem. Soc.* **2011**, *76*, 35–42.
8. Rigano, D.; Cardile, V.; Formisano, C.; Maldini, M.T.; Piacente, S.; Bevilacqua, J.; Russo, A.; Senatore, F. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. Inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *180*, 211–219.
9. Rauter, A.P.; Martins, A.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L.M.; Araújo, M.-E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F.V.; Goulart, M.; et al. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *J. Ethnoph.* **2009**, *122*, 384–393.



10. Maire, R. *Flore de l'Afrique du nord*; Éditions Paul Lechevalier: Paris, France, 1967; Volume 13. (In French)
11. Cheynier, V.; Comte, G.; Davies, K.M.; Lattanzio, V.; Martens, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *72*, 1–20.
12. Zhang, J.; Subramanian, S.; Stacey, G.; Yu, O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of medicago truncatula by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J.* **2009**, *57*, 171–183.
13. Sahgal, G.; Ramanathan, S.; Sasidharan, S.; Mordi, M.N.; Ismail, S.; Mansor, S.M. *In vitro* antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules* **2009**, *14*, 4476–4485.
14. Zhao, J.; Zhang, J.-S.; Yang, B.; Lv, G.-P.; Li, S.-P. Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of curcuma using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis. *Molecules* **2010**, *15*, 7547–7557.
15. Dictionary of Natural Products. Available online: <http://dnp.Chemnetbase.Com/> (accessed on 16 December 2013).
16. Ozimina, I.I.; Bandyukova, V.A. Compactin—a novel glycoside of orobol from *Genista compacta*. *Khim. Prir. Soedin.* **1985**, 507–510.
17. Pistelli, L.; Bertoli, A.; Giachi, I.; Manunta, A. Flavonoids from *Genista ephedroides*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1404–1406.
18. Pistelli, L.; Giachi, I.; Potenza, D.; Morelli, I. A new isoflavone from *Genista corsica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 504–506.
19. Reich, E.; Schibli, A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*; Thieme: Stuttgart, Germany, 2006.
20. Mekkiou, R.; Touahar, H.; Dijoux-Franca, M.G.; Mariotte, A.M.; Benayache, S.; Benayache, F. A new isoflavone from *Genista saharae* (fabaceae). *Biochem. Systemat. Ecol.* **2005**, *33*, 635–638.
21. Nakov, N.; Tolkachev, O.N.; Akhtardzhiev, K. Flavonoid content of *Genista carinalis* Grsb. *Pharmazie* **1978**, *33*, 463.
22. Sato, S.; Hiroe, K.; Kumazawa, T.; Jun-ichi, O. Total synthesis of two isoflavone C-glycosides: Genistein and orobol 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1091–1095.
23. Tannins in herbal drugs. In *European Pharmacopoeia Online 8.0 General Methods*; European Directorate for the Quality of Medicines: Brussels, Belgium, 2014.
24. Monographs: *Sophorae japonicae* flos (*Sophora japonica*, Fabaceae), *Carthami flos* (safflower, *Carthamus tinctorius* L., Asteraceae). In *European Pharmacopoeia Online 8.0*; European Directorate for the Quality of Medicines: Brussels, Belgium, 2014.

**Sample Availability:** Samples of compound **4** are available from the authors.

## ملخص

تتواجد النباتات الصحراوية الخاصة أساسا في النظم البيئية الحساسة، لا سيما في المناطق شبه الصحراوية في شمال الصحراء. تتميز هذه النباتات بتكيفها مع المناخ الجاف والتربة ذات الملوحة العالية. تركزت دراسة النوع *Calobota saharae* على جوانب مختلفة: البيئة النباتية، الشكل، التركيب الكيميائي وبعض الأنشطة البيولوجية.

أظهرت الدراسة المورفولوجية توافق مع ضم الأنواع *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. و B.E.van ضمن قبيلة Crotalariae وليس في قبيلة Genistae. كما أظهر تحليل التربة الرملية في موطن النبات بأنها فقيرة من حيث محتواها من المواد العضوية والنيتروجين. بين أيضا تحليل كمية النيتروجين بطريقة كجيلدال (Kjeldahl) بأن تركيزه متغير في مختلف أجزاء النبات وبأن المعدل الأعلى يكون في البذور (بروتين 32%). تبين أيضا من تحليل القلويدات بأنها موجودة في جميع أجزاء النبات (4.2%)، لكن يبدو أن تركزها يكون في الأجزاء الخضراء (الفروع والقصرة). تم تحديد في المجموع 3 قلويدات: ammodendrine، N-acetylhystrine و N-formylammodendrine.

تراوحت نسبة الفلافونويدات على مستوى العينات الجذرية التي تم جمعها في شهر أوت والزهور التي تم جمعها في مارس بين 0.2% إلى 2.6 % و نسبة عديدات الفينول بين 9.32 % و 1.99%. سمحت التنقية بواسطة HPLC التحضيرية من عزل 5-O-Méthoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl- génistéine (5OMeC8CG). كما تم مطابقة المركبات الفينولية التي تحوي النشاط المضاد للأوكسدة (DPPH) باستعمال البيوتوغرافيا HPTLC (bioautography) و dereplication الممزوجة مع الطيف الكتلي (HPTLC-MS) بمحاصرة المتطرف. كما تم تحديد الجزيئات الرئيسية التي تساهم في النشاط المضاد للأوكسدة وهي 3، 4، 5، 7-tétrahydroxyisoflavones، ficiisoflavone، 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone و 4',5-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone-4'-O-β-D-glucopyranoside. كما تبين أن 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl- génistéine لا يساهم إلا قليلا في النشاط المزيح للجذور.

أما فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا فإن السلالات الإشريكية، المكورات العنقودية، الكليسيلا، السراتية، تمثل حساسية للقلويدات المعزولة من *Calobota saharae* في حين أن السلالة الزائفة، التي تعرف عموما بمقاومتها للمضادات الحيوية فهي تمثل حساسية متوسطة للمواد التي تم اختبارها. **الكلمات المفتاحية:** مضاد للبكتيريا، مضاد للأوكسدة، فلافونويد، قلويدات، *Calobota saharae*, Fabaceae, Chemotaxonomy.

## Résumé

La flore saharienne, particulière se retrouve notamment dans des écosystèmes sensibles et notamment dans les zones semi-désertiques du Sahara septentrional. Elle est très remarquable par son adaptation à un climat sec et à un sol à forte salinité. L'étude de l'espèce endémique *Calobota saharae* présentée dans ce travail a porté sur différents aspects : écologie de la plante, morphologie, composition phytochimique et quelques activités biologiques.

L'étude morphologique est en accord avec la description faite de l'espèce *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, dans la tribu des Crotalariae et non plus dans la tribu des Genistae. Au niveau de l'habitat de la plante, l'analyse du sol a montré que le sol dunaire est pauvre en matière organique et en azote. Le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl dans les différents organes de la plante est variable, cependant le taux est maximal dans la graine (32% de protéines).

Les alcaloïdes sont présents dans quasiment toutes les parties de la plante (rendement moyen est de 4.2%), mais semblent se concentrer dans les parties vertes (rameaux et péricarpes). Au total, 3 alcaloïdes pipéridiniques ont été identifiés: ammodendrine, N-acétylhystrine et N-formylammodendrine.

La teneur en flavonoïdes varie de 0.212 à 2.614%, et la teneur en polyphénols totaux de 1.996 à 9.328%. Les teneurs les plus élevées sont observées pour les échantillons de racines collectées au mois d'Aout et celui de fleurs collectées au mois de mars. Une purification par HPLC préparative a permis d'isoler 5-O-Méthoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-genistein (5OMeC8CG). La bioautographie par HPTLC et la déréplication par couplage à la spectrométrie de masse (HPTLC-MS) a permis une identification putative des composés phénoliques présentant une activité antioxydante (piégeage du radical DPPH). Les molécules principales identifiées comme contributrices à l'activité antioxydante ont été identifiées putativement comme étant la 3',4', 5,7-tétrahydroxyisoflavones, la ficiisoflavone, 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone et la 4',5-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone-4'-O-β-D-glucopyranoside. La 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine ne participe que faiblement à l'activité antiradicalaire des extraits.

Concernant l'activité antibactérienne, les souches *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, présentent une sensibilité aux extraits alcaloïdiques de *Calobota saharae*. La souche *Pseudomonas*, généralement résistante aux antibiotiques présente une sensibilité intermédiaire aux produits testés.

**Mots clés :** Antibactérien, Antioxydant, Alcaloïdes, Flavonoïdes, *Calobota saharae*, Fabaceae, Chimio taxonomie.

## Abstract

The Saharan flora, found in sensitive ecosystems and particularly in the semi-desert areas of the northern Sahara, is very remarkable for its adaptation to a dry climate and a high salinity soil. The Present study of endemic species *Calobota saharae* focused on different aspects: plant ecology, morphology, phytochemical composition and biological activities.

The morphological study is consistent with the description of *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E.van Wyk, in the Crotalariae tribe and no longer in the Genistae tribe. At the level of the plant habitat, soil analysis has shown that the dune soil is poor in organic matter and nitrogen. The determination of the total nitrogen by the Kjeldahl method in the various organs of the plant is variable, however the rate is maximum in the seed (32% of proteins).

The alkaloids are present in almost all parts of the plant (4.2%), but seem to focus in the green parts (branches and pericarp). In total 3 piperidine alkaloids were identified: ammodendrine, N-acetylhystrine and N-formylammodendrine.

Flavonoid content varies between 0.2-2.6%, and total polyphenol content of 9.32% to 1.99% highest levels are observed for root samples collected in the month of August and the flowers collected in March. Purification by preparative HPLC made it possible to isolate 5-O-Methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-genistein (5OMeC8CG). HPTLC bioautography and Mass Spectrometry Coupled Dereplication (HPTLC-MS) allowed for putative identification of phenolic compounds with antioxidant activity (DPPH radical scavenging). Main molecules identified as contributing to the antioxidant activity were identified as putative 3',4', 5,7-tétrahydroxyisoflavones, the ficiisoflavone, 5-methoxy-4',7-trihydroxy-8-glucopyranosylisoflavone and 4',5-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone-4'-O-β-D-glucopyranoside. 5-O-methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-genistein only contributes slightly to the antiradical activity of the extracts.

Concerning the antibacterial activity, the strains *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, have a sensitivity to alkaloidal extracts of *Calobota saharae*. The *Pseudomonas* strain, generally resistant to antibiotics has an intermediate sensitivity to the products test.

**Keywords:** Antibactérien, Antioxydant, Alkaloids, Flavonoids, *Calobota saharae*, Fabaceae, Chemotaxonomy.