



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE
ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques d'une plante algérienne du genre *Centaurium* (Gentianacea)

Présenté et soutenu publiquement

Le : 24/07/2019

Par

Mlle BOUDRAA Amel el hayet

&

Mme BELKHAIRI Amira

Jury

Président	KITOUNI Rachid	MCB	UFM Constantine
Rapporteur	BOUANIMBA Nour	MCA	UFM Constantine
Examineur	HAROUNI Sofiane	MAA	UFM Constantine

Année universitaire

2018 – 2019

Remerciement

On tient tout d'abord à remercier en premier lieu Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour accomplir ce modeste travail.

Un grand merci à notre Encadreur Bouanímba Nour (MCA) qui a tout d'abord acceptée la conduite et la direction de notre mémoire, par son soutien, ses conseils et ses encouragements et merci de nous intégrer au centre de recherche en biotechnologie (CRBt).

Nos remerciements s'adressent également à Mr Benuíci Chawki chef laboratoire de biochimie au niveau de CRBt pour son grand aide et sa grande patience qu'il a manifestée.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr Harouni Sofiene (MAA) pour l'intérêt qu'il ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons aussi à remercier Mr Kitouni Rachid (MCB) de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie Mr Kandouli Chouaib (MCB) de son aide durant la réalisation de notre mémoire, pour son attention et ses bons conseils.

Nous remercions toute l'équipe de Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) et laboratoire de biochimie de l'université Constantine 1 pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à M^{me} Shout Sara du laboratoire de la chimie pour son soutien et sa générosité.

Merci 
A

Dédicaces



*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé
le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la
flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : **Maman**
lahbibba que j'adore.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien
moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours
sacrifié pour me voir réussir, à toi **mon père** lezzize.*

*A la personne dont j'ai bien aimé leur présence dans ce
jour : **Djihed** la personne le plus particulier pour moi Qui
m'a toujours aidé et encouragé dans les moments difficiles.*

*A mes chères sœurs Rayene et Chirine et A mon frère
Yesser pour leurs encouragements permanents.*

*A ma grande mère, mes oncles et chères tantes et leur
enfants chacun par son nom.*

*A mes chères amies proches : Laïla, Chiraz,
Romaïssa, Amira.*



Espoir de la vie

Dédicaces



Je dédie ce modeste travail à

*A Mon Cher Père **M^{ed} abdelwahab** qui m'a poussé à travailler et à réussir que dieu te garde pour moi.*

*A Ma Chère mère **Fatiha** j'aimerais toujours te remercier pour tous ce que tu as fait jusqu'à notre jours-là pour assurer l'éducation et la formation de tous tes enfant je te remercie aussi pour ton amour et ton soutien tout au long de mes études.*

*A mes chères sœurs **Cilia** et **Chahinez** et mon frère **Islam** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A Mon Mari **Chouaib** aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré, je te remercie pour ta patience.*

*A ma belle mère **Leila** et mon beau père **Khlifa***

*A mes belles sœurs **Sihem**, **Chahra** et **Ryma***

*A mon beau frère **Iskander***

*A ma chère amie **Rayene** pour son aide dans les moments difficiles.*

*A toute la famille **Belkhairi***

Merci d'être toujours là pour moi.



Amira

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERALE	1

CHAPITRE I: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ASPECTE BOTANIQUE ET ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

I.1. Plantes médicinales.....	3
I.2. Phytothérapie.....	3
I.2.1. Phytothérapie en Algérie.....	3
I.2.2. Types de phytothérapies.....	4
I.2.3. Formes de phytothérapies.....	4
I.2.4. Définition du principe actif.....	6
I.3. La famille Gentianacea.....	6
I.3.1. Généralité.....	6
I.3.2. Description botanique de Gentianacea.....	7
I.4. Présentation du genre <i>Centaurium</i>	7
I.5. Description botanique de <i>Centaurium sp.</i>	7
I.6. Nom vernaculaire.....	10
I.7. Origine et répartition géographique.....	10
I.8. Classification botanique	10
I.9. Effet biologique et les propriétés médicinales	10
I.10. Composition chimique.....	11
I.11. Recherche antérieures du genre <i>Centaurium</i>	11

II. METABOLITES SECONDAIRES

II.1. Généralités sur les métabolites secondaires.....	12
II.2. Classification des métabolites secondaires.....	12
II.2.1. Les composés phénoliques.....	12
II.2.1.1. Généralités sur les polyphénols.....	12

II.2.1.2. Biogénèse des polyphénols.....	13
II.2.1.3. Principaux groupes des polyphénols.....	13
II.2.1.3.1. Phénols simples.....	13
II.2.1.3.2. Acides phénoliques.....	14
II.2.1.3.2.a. Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.....	14
II.2.1.3.2.b. Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.....	15
II.2.1.3.3. Flavonoïdes	15
II.2.1.3.3.a. Structure chimique des Flavonoïdes.....	15
II.2.1.3.3.b. Classification des flavonoïdes.....	16
II.2.1.3.4. Anthocyanosides.....	17
II.2.1.3.5. Quinones.....	17
II.2.1.3.6. Anthraquinones.....	18
II.2.1.3.7. Tannins	18
II.2.1.3.7.a. Tannins hydrolysables.....	19
II.2.1.3.7.b. Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols.....	19
II.2.1.3.8. Lignines.....	20
II.2.1.3.9. Lignanes.....	20
II.2.1.3.10. Coumarines, Stilbènes.....	21
II.2.2. Alcaloïdes.....	22
II.2.3. Les composés terpéniques.....	23
II.2.3.1. Terpénoïdes.....	23
II.2.3.2. Stéroïdes.....	24
II.2.3.3. Saponosides.....	25
II.2.3.3.1. Saponosides à génines triterpéniques.....	25
II.2.3.3.2. Saponosides à génines stéroïdiques.....	26
II.3. Fonction et intérêt thérapeutique des métabolites secondaires.....	26

III. STRESS OXYDANT ET LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

III.1. Stress oxydant et l'activité antioxydante	28
III.1.1. Stress oxydant.....	28
III.1.2. Les radicaux libres.....	28
III.1.2.1. Les principales sources des radicaux libres.....	29
III.1.2.1.1. Les sources exogènes.....	29

III.1.2.1.2. Les sources endogènes.....	30
III.1.3. Implications pathologiques du stress oxydant.....	30
III.1.4. Mécanisme de défense contre le stress oxydant.....	30
III.1.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	31
III.1.4.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	31
III.1.4.2.1. Antioxydants naturels.....	31
III.1.4.2.2. Antioxydants synthétiques.....	32
III.1.5. Quelques tests de la capacité antioxydante et antiradicalaire.....	33
III.1.5.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH [•]	33
III.1.5.2. Capacité piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	33
III.1.5.3. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC).....	34
III.1.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur).....	35
III.1.5.5. Capacité de chélation des ions métalliques (ions ferreux).....	35
III.1.5.6. Dosage de balayage des radicaux Galvinoxyl (GOR).....	36
III.1.5.7. Activité de phénanthroline.....	36
III.2. Les activités enzymatiques.....	37
III.2.1. Activité anti-Alzheimer.....	37
III.2.1.1. Maladie d'Alzheimer.....	37
III.2.1.2. Activité anti- acétylcholinestérase (in vitro).....	37
III.2.1.3. Activité anti- acétylcholinestérase (in vitro).....	37
III.2.2. Activité anti-diabétique.....	38
III.2.2.1. Le diabète de type 2.....	38
III.2.2.2. Test d'inhibition de l' α -glucosidase (in vitro).....	39
III.3. Activité anti-fongique.....	39
III.3.1. Antifongiques.....	40
III.3.2. Description de champignon étudié.....	40

CAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I.1. Aperçu et but de travail.....	41
I.2. Matériel.....	41
I.2.1. Matériel végétale.....	41
I.2.1.1. Description de la zone de récolte.....	42
I.2.1.2. Récolte de la plante du genre <i>Centaurium</i>	42
I.2.2. Réactifs chimiques et instrumentation.....	42

I.3. Méthodes.....	44
I.3.1. Méthodes d'extraction.....	44
I.3.1.1. Broyage.....	44
I.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires par macération.....	44
I.3.1.3. Préparation des extraits via la méthode d'extraction liquide-liquide par décantation	46
I.3.2. Méthodes d'analyse phytochimique.....	50
I.3.2.1. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	50
I.3.2.1.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC).....	50
I.3.2.1.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC).....	51
I.3.2.2. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD.....	52
I.3.2.3. Analyse physico-chimique par spectrophotométrie UV-visible.....	53
I.4. Les activités biologiques.....	53
I.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	53
I.4.1.1. Test de piégeage du radical DPPH [•]	54
I.4.1.2. Test de piégeage le radical-cation ABTS ^{•+}	55
I.4.1.3. Test de piégeage le radical libre Galvinoxyl.....	56
I.4.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique.....	57
I.4.1.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion ferrique.....	58
I.4.1.6. Test de la capacité antioxydante par chélation des ions ferreux.....	58
I.4.1.7. Activité phénanthroline.....	59
I.4.2. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer.....	60
I.4.2.1. Teste anti- acétylcholinestérase et anti- butyrylcholinestérase (in vitro).....	60
I.4.3. Evaluation de l'activité anti- diabétique.....	62
I.4.3.1. Test d'inhibition de l' α -glucosidase (in vitro).....	62
I.4.4. Analyse statistique.....	63
I.4.5. Evaluation de l'activité antifongique.....	63
I.4.5.1. Stérilisation du matériel et milieu de culture.....	63
I.4.5.2. Préparation de milieu de cultures.....	63
I.4.5.3. Préparation des extraits à différentes concentrations.....	64

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUTSSION

I.1. Rendement d'extraction	66
I.2. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	68

I.2.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC).....	68
I.2.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC).....	69
I.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD.....	72
I.4. Evaluation des activités biologiques.....	76
I.4.1. Evaluation du potentiel antioxydant.....	76
I.4.1.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH*.....	77
I.4.1.2. Test de l'activité scavenger du radical ABTS•+.....	81
I.4.1.3. Test de l'activité scavenger du radical Galvinoxyl.....	84
I.4.1.4. Pouvoir chélateur du fer ferreux	88
I.4.1.5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur).....	93
I.4.1.6. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC).....	97
I.4.1.7. Test de l'activité phénanthroline.....	100
I.4.2. Evaluation de l'activité anti-enzymatique	104
I.4.2.1. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer.....	104
I.4.2.1.1. Activité anti- butyrylcholinestérase (in vitro).....	104
I.4.2.1.2. Teste anti- acétylcholinestérase (in vitro).....	108
I.4.2.2. Evaluation de l'activité anti- diabétique par le test d'inhibition de l'α-glucosidase (in vitro).....	110
I.4.3. Evaluation de l'activité antifongique.....	113
CONCLUSION GENERALE	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

(%) : Pourcentage d'inhibition

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AChE : Acétylcholinestérase

ACNH₄ : D'acétate d'ammonium

ACTI : L'acétylthiocholine iodide

ActOH/AcOH : Acétate d'éthyle

AH : Antioxydant donneur d'hydrogène

AqR : Aqueux résiduelle

BChE : Butyrylcholinestérase

BHA : Butyl-hydroxy-anisole

BHT : Butyl-hydroxy-toluène

BuOH : Butanol

C° : Degré celsius

CI₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

Cl : Chlore

cm : Centimètre

Cu⁺² : Cuivre

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant

Capacity

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH-H : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine

DPPH-H : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine

DT2 : Diabète de type 2

DTNB : L'acide 5,5'- dithiobis

(2 nitrobenzoïque)

e- : Electron

EDC : Eau distillé chaude

EDTA : Acide éthylène-Diamine-

tétra-Acétique

EP : Ether de pétrole

ERO : Espèces réactivées de l'oxygène

Fe⁺² : Fer ferreux

Fe⁺³ : Fer ferrique

FeCl₂ : Chlorure ferreux

FeCl₃ : Chlorure ferrique

g : Gramme

GOR : Radical Galvinoxyl

H : atome d'hydrogène

H : Heure

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC-DAD : Chromatographie liquide

à haute performance avec un détecteur

à barrette de diodes

m : Masse

MA : Maladie d'Alzheimer

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

mg EQ/g MS : Milligrammes équivalents de
quercetine par gramme de matière sèche

mg GAE/g MS : Milligrammes équivalents
d'acide gallique par gramme de matière sèche

min : Minute

ml : Millilitre

mM : Micromol

NADPH : Nicotinamide adénine
dinucléotide phosphate

NaHCO₃ : Le bicarbonate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NC : Néocuproïne

nm : Nanomètre

O₂ : Dioxygène

O²⁻ : Anion superoxyde

O₂[•] Radical superoxyde

O₂^{•-} : Oxygène singulet

OH[•] : Radical hydroxyle

OH : hydroxyl

ONOO⁻ : Ion peroxydinitrite

PDA : Gélose dextrosée à la pomme de terre

R_f : Facteur de rétention

RL : Radicaux libres

ROO[•] : Radical peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde

SD : Déviation standard

SM : Solution mère

SOD : Superoxyde dismutase

TFC : Quantification des flavonoïdes totaux

TNB : L'acide -5- thio 2-nitrobenzoïque

TPC : Quantification des polyphénols totaux

UV : Ultra-violet

µl : Microlitre

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure I.1 : Forme tisane.....	5
Figure I.2 : Forme gélule.....	5
Figure I.3 : Présentation des 6 genres de Basse-Normandie de la famille des Gentianacea....	6
Figure I.4 : <i>Centaurium erythraea</i> L.....	8
Figure I.5 : 5 Etamines à l'origine du pollen et un stigmate plus ou moins Courbé.....	8
Figure I.6 : <i>Centaurium erythraea</i> L.....	9
Figure I.7 : Rhizome à aspect ligneux. A partir de chaque nœud se développe des rameaux.	9
Figure I.8 : Formule chimique brut d'une fonction phénol (C ₆ H ₅ OH)	12
Figure I.9 : Structures chimiques de quelques phénols simples.....	13
Figure I.10 : Structures de l'acide benzoïque et acide cinnamique.....	14
Figure I.11 : Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure I.12 : Les principales classes des flavonoïdes.....	16
Figure I.13 : Structures de base des quinones.....	18
Figure I.14 : La formule générale des anthraquinones.....	18
Figure I.15 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	19
Figure I.16 : Structure des tanins.....	20
Figure I.17 : Structures chimiques des monolignols.....	20
Figure I.18 : Structure générale des lignanes (C ₆ -C ₃) ₂	21
Figure I.19 : Squelette de base des coumarines.....	21
Figure I.20 : Structure générale des stilbènes.....	22
Figure I.21 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes.....	23
Figure I.22 : Structure de base de l'isoprène.....	24
Figure I.23 : Squelette de base des stéroïdes.....	25
Figure I.24 : Les principales Génines triterpéniques monocycliques (1) et pentacycliques (2)	25
Figure I.25 : Génines stéroïdiques.....	26
Figure I.26 : Schéma de la balance entre les espèces réactives oxygénées et les antioxydants.....	28
Figure I.27 : Réaction de réduction du radical DPPH [•] en DPPHH.....	33
Figure I.28 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•] ..	34

Figure I.29 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante.....	34
Figure I.30 : Réaction de test FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power)	35
Figure I.31 : Le complexe Fe (II)- Ferrozine.....	35
Figure I.32 : Réaction de la réduction de radical galvinoxyl en présence d'un antioxydant (AH)	36
Figure I.33 : La 1, 10-phénanthroline et son complexe ferreux.....	36
Figure I.34 : Mécanisme chimique de l'activité anti-AChE/BChE.....	38
Figure I.35 : Mécanisme d'hydrolyse du p-nitrophényl alpha-D-glucopyranoside par l' α – glucosidase.....	39
Figure I.36 : Champignon d' <i>Alternaria sp.</i>	40

CHAPITRE II

Figure II.1 : La plante du genre <i>Centaurium</i>	41
Figure II.2 : Localisation satellite de la zone de récolte de la plante du genre <i>Centaurium</i> ...	42
Figure II.3 : Broyage des parties aériennes de la plante.....	44
Figure II.4 : Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante.....	45
Figure II.5 : Procédé de concentration de l'extrait (rotavapeur)	46
Figure II.6 : La décantation.....	47
Figure II.7 : Évaporation rotative des extraits.....	48
Figure II.8 : Protocole d'extraction de plante du genre <i>Centaurium</i>	49
Figure II.9 : Préparation milieu de culture (PDA)	64
Figure II.10 : Les différentes étapes de l'activité antifongique (Préparation des boîtes, Préparation des disques, Dépôt de souche)	65

CHAPITRE III

Figure III.1 : Photos prises lors du dosage de polyphénols totaux.....	69
Figure III.2 : Photos prises lors du dosage de flavonoïdes totaux.....	70
Figure III.3 : Chromatogrammes HPLC-DAD des composés phénoliques de <i>Centaurium sp</i> détectés à 280 nm dans divers extraits.....	73
Figure III.4 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH [•]	77
Figure III.5 : Les CI ₅₀ des extraits testés classés par ordre croissant (DPPH [•]).....	78
Figure III.6 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH [•]	79
Figure III.7 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+}	82
Figure III.8 : Les CI ₅₀ des extraits testés classés par ordre croissant (ABTS ^{•+}).....	83

Figure III.9: Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS ⁺	83
Figure III.10: Courbes des pourcentages d'inhibition du radical Galvinoxyl.....	85
Figure III.11: Les CI ₅₀ des extraits testés classées par ordre croissant (GOR)	86
Figure III.12: Photos prises lors du dosage de l'activité GOR.....	86
Figure III.13: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité métal chélate.....	89
Figure III.14: Les CI ₅₀ des extraits testés classées par ordre croissant (métal chélate)	90
Figure III.15: Photos prises lors du dosage de l'activité métal chélate.....	91
Figure III.16: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Pouvoir réducteur)94	
Figure III.17: Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donné (pouvoir réducteur)	94
Figure III.18: Photos prises lors du dosage de l'activité pouvoir réducteur.....	95
Figure III.19: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC)	98
Figure III.20: Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donné (CUPRAC).....	98
Figure III.21: Photos prises lors du dosage de l'activité CUPRAC.....	99
Figure III.22: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (phénanthroline)..	101
Figure III.23: Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donné (phénanthroline)	101
Figure III.24: Photos prises lors du dosage de l'activité phénanthroline.....	102
Figure III.25: Les pourcentages d'inhibition des échantillons testés et standard classées par ordre croissant à une concentration donné (test anti-butyrylcholinestérse)	105
Figure III.26: Photos prises lors du dosage de l'activité anti- butyrylcholinestérse.....	105
Figure III.27: Photos prises lors du dosage de l'activité anti- acétylcholinestérse.....	109
Figure III.28: Les pourcentages d'inhibition des échantillons testés et standard classées par ordre croissant à une concentration donné (test α -glucosidases)	111
Figure III.29: Photos prises lors du dosage de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidases...	111
Figure III.30: Diamètres de zone de développement (cm) de moisissure d' <i>Alternaria sp</i> en différentes concentrations.....	114
Figure III.31: Pourcentages d'inhibition des moisissures(%).....	115

Liste des tableaux

CHAPITRE I

Tableau I.1: Position systématique du <i>Centaurium sp.</i>	10
Tableau I.2: Dérivés d'acide hydroxybenzoïque.....	14
Tableau I.3: Dérivés les plus fréquents de l'acide hydroxycinnamiques.....	15
Tableau I.4: Les structures chimiques des principaux anthocyanidols connus.....	17
Tableau I.5: Principales structures chimiques des coumarines simples.....	22
Tableau I.6: Quelques exemples des différents types de terpenoïdes.....	24
Tableau I.7: Activités biologiques de quelques composés secondaires.....	26
Tableau I.8: Les principales espèces réactivées de l'oxygène (ERO).....	29

CHAPITRE III

Tableau III.1: Les rendements d'extraction par la solution méthanolique et du fractionnement par les solvants organiques.....	66
Tableau III.2: Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait brut et ses fractions dérivées.....	68
Tableau III.3: Teneurs en flavonoïdes totaux dans l'extrait brut et ses fractions dérivées.....	70
Tableau III.4: Les concentrations de composés phénoliques dans les extraits de <i>Centaurium sp</i> détectés par HPLC-DAD.....	72
Tableau III.5: La comparaison de la puissance antioxydant des extraits.....	103
Tableau III.6: Résultats inhibiteurs de l'extrait brut et ces fractions préparées par les parties aériennes de la plante du genre <i>Centaurium</i> contre l'acétylcholinestérase.....	108
Tableau III.7: Diamètres de zone développement (cm) de moisissure d' <i>Alternaria sp</i> en différentes concentrations.....	113
Tableau III.8: Pourcentages d'inhibition des moisissures (%)......	114

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les plantes ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Selon l'OMS, 80% de la population mondiale utilise les plantes pour guérir et soulager de nombreuses maladies (Segnou et al., 1993 ; Aighwi et al., 1998). Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments. Environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes telle que la morphine, artémisinine, quinine...ect (chaabi., 2008).

Il existe plus de 500000 espèces végétales mais seulement 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte., 2002).

L'Algérie, grâce à sa richesse et sa diversité florale saharienne et méditerranéenne, on compte environ 3000 espèces et sous espèces de plantes médicinales, appartenant à plusieurs familles botaniques (Ozenda., 1977).

Les plantes médicinales sont riches en métabolites qui donnent leur effet pharmacologique. La chimie et la biologie sont donc indispensables pour préciser la relation structure-activité des biomolécules, notamment celles d'intérêts thérapeutiques.

La plante *Centaurium sp* est une plante herbacée qui appartient à la famille de Gentianacées est connu sous le nom de Gosst l hayya, elle est plus abondante dans la zone méditerranéenne (Fournier., 1961). Cette plante a attiré notre attention car elle est utilisée dans la pharmacopée de 23 différents pays (Hatjimanoli et Deblmas., 1977).

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de *Centaurium sp* en molécules bioactifs et à déterminer leurs potentiels antioxydants, anti-Alzheimer, antidiabétique et antifongique. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique, l'analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes totaux suivi de l'identification et la quantification des composés phénoliques par HPLC-DAD et à évaluer les activités antioxydante, anti-Alzheimer, antidiabétique et antifongique.

Notre travail sera présenté comme suit :

- **Chapitre I** concerne la recherche bibliographique, réparti en trois parties :

- ✓ **La première partie:** présentera une simple synthèse bibliographique sur les plantes médicinales, présentation de la famille Gentianacées et du genre *Centaurium* recherche antérieure réalisé sur ce genre, les propriétés médicinales et la composition chimique du *Centaurium sp*.

- ✓ **La deuxième partie :** concerne les métabolites secondaires, leur définition, leur classification, leur structures, leur biosynthèse ainsi leur intérêt thérapeutique.

 - ✓ **La troisième partie :** s'intéresse au stress oxydant, Mécanisme de défense contre le stress oxydant et une présentation générale de quelques tests antioxydant, anti-Alzheimer, antidiabétique et antifongique ainsi leurs maladies.
-
- **Chapitre II:** Nos études expérimentales menées en deux volets.
D'abord : l'extraction des métabolites secondaires des parties aériennes de *Centaurium sp*, le fractionnement suivi de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux puis la détermination de la composition chimique des extraits par HPLC-DAD et enfin l'identification et la caractérisation des activités antioxydantes par DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, Métal chélate, pouvoir réducteur, activité phénanthroline et activité anti-Alzheimer par anti-acétylcholinestérase et anti-butyrylcholinestérase ainsi le test d'activité antidiabétique par alpha-glucosidase et antifongique par la méthode de diffusion sur milieu de culture PDA.
-
- **Enfin, Chapitre III,** La présentation, l'interprétation et la discussion des résultats personnels obtenus seront exposées dans le troisième chapitre.



Recherche

bibliographique



I. Aspecte botanique et études chimiques antérieures

I.1. Plante médicinale

Les plantes médicinales sont des végétaux supérieurs qui possèdent vertus curative grâce aux principes actifs qui sont situés dans différentes parties comme les racines, feuilles, grains rhizome et écorce (**Chevallier., 2001**).

Durant les siècles les êtres humains ont utilisés les plantes à fin de guérir certains maladies, on effet il existe plus que 500000 espèces de plante dont 80000 sont des plantes médicinales (**Quyoun., 2003**).

L'utilisation inconsidérée des plantes médicinales peut provoquer des intoxications graves parfois mortelle (**Fouché et al., 2000**).

I.2. Phytothérapie

La phytothérapie vient du grec signifie "phuton" c'est les plantes et "thérapeia" c'est le traitement ce qui veut dire "traiter avec les plantes" (**Baba Aissa., 2000**).

Les plantes connus comme élément nutritionnelle mais aussi pour vertus thérapeutiques.

C'est durant les siècles la phytothérapie a constitué la principale source pour guérir certains maladies par industrie pharmaceutique grâce à identifications des principes actifs et absence générale des effets secondaires.

I.2.1. Phytothérapie en Algérie

En Algérie l'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicales ont été faits aux IX^{ème} siècles par Isha –Ben-Amran et Abdallah-Ben-Lounés (**Benhouhou., 2015**).

L'Algérie comprenait plus de 600 de plantes médicinales et aromatiques (**Mokkadem., 1999**). Dans ces dernières années, les herboristes sont partout dans le marché et sans aucune connaissance scientifique sur la phytothérapie, la matière brute de ces plantes est vendue à des prix dérisoires par contre le produit fini est importé à des prix exorbitants. En 2009 il existe 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales d'après le Centre national du registre de commerce.

I.2.2. Types de phytothérapies

Il existe plusieurs types de phytothérapies :

- **L'aromathérapie**

Se fonde sur l'utilisation des essences des plantes ou des huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par les plantes, elles sont souvent utilisées par voie cutanée.

- **La gemmothérapie**

Elle utilise les extraits alcooliques et glycérolés des tissus jeunes comme bourgeons.

- **L'homéothérapie**

A recours aux plantes d'une façon majoritaire et minoritaire dans les sources animales et minérales.

- **La phytothérapie pharmaceutique**

Elle repose sur des produits végétaux obtenus après extraction et par dilution.

- **L'herboristerie**

C'est la phytothérapie la plus ancienne, elle sert de la plante séchée ou fraîche.

I.2.3. Formes de phytothérapies

Les remèdes en phytothérapie peuvent prendre plusieurs formes :

- **La teinture mère (TM) ou macération hydro-alcoolique**

Il s'agit d'une macération des plantes fraîches dans l'alcool qui se présente sous la forme d'un flacon muni d'un compte-gouttes, cette préparation figure aux pharmacopées française et européenne.

- **La suspension intégrale de plante fraîche (SIPF)**

C'est une forme plus récente, obtenue par broyage à très basse température (cryobroyage) ; d'une plante fraîche juste après sa récolte, puis ses principes actifs sont extraits dans l'alcool à 30°. Elle conserve l'ensemble des molécules actives de la plante et se présente en flacons de verre teintés ou en ampoules buvables.

- **Tisane**

C'est la forme la plus traditionnelle, c'est une boisson obtenue par macération infusion ou décoction donne leur effet par leur totum, elle recueille que les principes actifs solubles dans l'eau. Il est déconseillé de préparer la tisane plus d'une journée à l'avance, sans quoi elle pourrait devenir un véritable bouillon de culture par multiplication microbienne (**Loïc Bureau**).



Figure I.1 : Forme tisane

- **Les huiles essentielles**

C'est un extrait de plante aromatique obtenue par distillation de la vapeur d'eau des plantes aromatique pour en extraire l'essence, c'est le domaine de l'aromathérapie. Les utilisations des huiles essentielles sont multiples (diffusion, massage, bain, inhalation, voie orale).

- **La gélule**

C'est la forme la plus adaptée à une phytothérapie moderne, elles contiennent la plante sous forme poudre où il a le principe actif, c'est la forme finale de drogue végétale, une fois séchée et micronisée (broyée).



Figure I.2: Forme gélule

I.2.4. Définition du principe actif

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques car elles contiennent des principes actifs (Ticli., 1997).

Les principes actifs sont des composants importants de la plante qui lui confèrent son caractère médicinale (Guyfuinel., 2002), ces composants existent le plus souvent en quantité extrêmement faible dans la plante. Les substances actives se trouvent dans différents compartiments comme les fleurs l'écorce et les grains. Les principes actifs peuvent être groupés en familles tel que les tanins, les essences et les alcaloïdes.

I.3. La famille Gentianacea

I.3.1. Généralité

La famille Gentianacea est une famille des plantes dicotylédones, comprend 100 genres et 1800 espèces, La famille des gentianacea regroupe en Basse-Normandie 6 genres qui sont respectivement (Figure I.3) : *Blackstonia*, *Gentiana*, *Gentianella*, *Cicendia*, *Exaculum* et *Centaurium* (Provost., 1998).



Blackstonia : 1 espèce en Basse-Normandie (Photo : T. Bousquet)



Gentiana : 2 espèces en Basse-Normandie (Photo : T. Bousquet)



Gentianella : 4 espèces en Basse-Normandie (Photo : J. Waymel)



Cicendia : 1 espèce en Basse-Normandie (Photo : T. Bousquet)



Exaculum : 1 espèce en Basse-Normandie (Photo : T. Bousquet)



Centaurium : 7 espèces en Basse-Normandie (Photo : T. Bousquet)

Figure I.3 : Présentation des 6 genres de Basse-Normandie de la famille des Gentianacea (Waymel et al., 2015)

Les Gentianaceae réparties sur l'ensemble des continents sauf dans l'Antarctique. Les espèces membres de cette famille se développent dans des milieux divers : forêts tropicales, savanes, forêts tempérées, prairies, régions alpines et arctiques et les communautés littorales et rudérales mais aussi parfois dans les marais mais jamais dans les zones aquatiques et marines (**Pringle., 2014**).

I.3.2. Description botanique de Gentianaceae

La famille Gentianaceae est une famille herbacée annuelle ou bisannuelle produisant de juin à août atteint généralement 3 à 30 cm de hauteur, les feuilles sont étroites opposées, les tiges sont glabres, les fleurs sont régulières, pentamères, parfois tétramères, le tube de la corolle est généralement plus long que le calice, chaque fleur produit des graines (**Hitchcock et Cronquist., 1973 ; Douglas et al., 1999**).

I.4. Présentation du genre *Centaurium*

Le genre *Centaurium* est un genre cosmopolite très répandu en Europe caractérisé par ses feuilles non épineuses alternes, les fleurs sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées, les fleurs ont cinq pétales qui sont souvent de couleur rose, pourpres et le violet, mais il existe d'autres espèces à fleurs jaunes (**Quezel et Santana S-NCBI**) il est originaire du bassin méditerranéen (**Fernández Prieto et al., 2012**). Ce genre comprend 50 espèces d'après « The plant List 2010 » (**Fernández Prieto et al., 2012**).

I.5. Description botanique de *Centaurium sp*

La petite centaurée est une plante médicinale connue depuis l'antiquité, c'est une plante herbacée bisannuelle de 15 à 24 cm de haut composée de tiges ramifiées plus ou moins couchées (**Stoiko Liliya et al., 2017**), les feuilles souvent opposées rapprochées le long de la tige avec un limbe ovale spatulé à 3 nervures ; les basales plus grandes, allongées et disposées en rosette (**Baba Aissa., 2000**), inflorescence en corymbes denses ; dans certaines stations de Hage, des individus à 18 fleurs ont été observés.



Figure I.4 : *Centaurium erythraea* L. (<https://www.healthbenefitstimes.com/centaury>).

Le bouton floral est de couleur rose. Dans sa vieillesse ou après une dessiccation imparfaite se décolore en couleur jaune. Leur corolle (enveloppe intérieure des fleurs) est à 5 sépales étroits, aigus et soudés sur leur demi-longueur et à 5 pétales ovales arrondis et long de 8 à 9 mm soudés et se divisant dans leur partie supérieure. Cette plante elle est hermaphrodites ; elle est composée de 5 étamines jaunes insérées à la gorge de la corolle (Waymel et *al.*, 2015) .



Figure I.5 : 5 Etamines à l'origine du pollen et un stigmate plus ou moins Courbé (Photo : Waymel)



Figure I.6: *Centaurium erythraea* L.(<https://www.healthbenefitstimes.com/centaury>).

Le fruit est une capsule (fruit sec) allongée bivalve et renfermant de nombreuses graines, saveur amère (Baba Aissa., 2000 ; Messaoudi., 2005; Verlag., 2007; Bruneton., 2009).

La partie souterraine est formée d'un rhizome à aspect ligneux horizontale où chaque noeud développe de rameaux. Elle porte quelques racines adventives qui permet leur fixation (Waymel et *al.*, 2015).



Figure I.7 : Rhizome à aspect ligneux. A partir de chaque nœud se développe des rameaux
(Photo : Waymel)

I.6. Nom vernaculaire (<https://www.creapharma.ch/centauree.htm>)

Nom latin	<i>Centaurium sp</i>
Nom français	Herbe amère
Nom anglais	American centaury, centaury
Nom italien	Centauro
Nom allemand	Gemeines
Nom arabe	القنطريون, مرارة لحنش

I.7. Origine et répartition géographique

Centaurium est une plante qui pousse en Europe, en Afrique du Nord, dans l'Ouest de l'Asie et acclimatée en Amérique du Nord (Bruneton., 2009). Cette espèce est originaire du bassin méditerranéen (Kechat., 2011).

I.8. Classification botanique

Tableau I.1: Position systématique du *Centaurium sp* (Waymel et al., 2015)

Règne	Plante
Sous règne	Viridaeplantae
Classe	Equisetopsida
Sous classe	Magnoliidae
Ordre	Gentianales
Famille	Gentianaceae
Genre	<i>Centaurium</i>
Espèce	<i>Centaurium sp</i>

I.9. Effet biologique et les propriétés médicinales

La centaurée est largement utilisée comme remède de médecine populaire dans différents pays pour plusieurs maladies notamment aux urinaires (Narasimha Rao et Nigam., 1970) ; elle facilite évacuation de l'urine notamment dans le cas de calculs rénaux et la

constipation (mr- plante), la *Centaurium* a aussi un effet hypoglycémiant (**Webster., 2004**), cette plante joue aussi un effet stimulant sur les sécrétions gastriques et l'appétit, elle augmente le péristaltisme intestinal, chercheurs turcs en 1991 ont montrés que la *Centaurium* à un effet anti-inflammatoire et antipyrétique (**Haloui., 2000**) . En usage externe elle est anti chute de cheveux (medisite).

I.10. Composition chimique

La plante du genre *Centaurium* renferme les alcaloïdes (jusqu'à 1%) qui donne des effets pharmacologiques, les huiles essentiels, résine, gentianine (**Kechat., 2011**), et contient des hétérosides secoiridoidiques (sont des monoterpènes servant souvent d'intermédiaires dans la biosynthèse d'alcaloïdes) très amers en faible quantité : la swertiamarine, le swéroside (**Kumarasamy et al., 2003**), xanthones ; méthylxanthone, des acides phénolique, des phytostérols, coumarine (**Valentão et al., 2001; 2003**), des tannins, flavonoïdes, stérols (**Verlag., 2007**).

I.11. Recherche antérieures du genre *Centaurium*

En 2017 Dinic, Arambasic Jovanovic et autres ont réalisé des études phytochimiques et pharmacologiques sur les espèces du genre *Centaurium*. Après l'administration orale et quotidienne de l'extrait méthanolique des parties aérienne de *Centaurium* chez les rats Wistar atteints de diabète induit expérimentalement ils ont montrés que l'extrait de *Centaurium* a entraîné des effets antidiabétique par augmentation de taux d'insuline, amélioration de profil lipidique et diminution des concentrations d'hémoglobine glyquée ainsi un effet antioxydant sur les globules rouges des rats. En 2018 Kachmar, Oliveira et autres ont réalisés analyses d'HPLC couplé avec spectrophotomètre de masse, ces analyses ont révélé la présence des métabolites secondaires dans l'extrait lyophilisé de *Centaurium*, quatre sécoiridoides différents à 53%, sept glycosides flavonoïdes à 25% et sept xanthones à 22%, après l'administration de extraits lyophilisés chez les rats wistar diabétiques a entraîné une réduction de 74% de hyperglycémie et une réduction de 6% est causée par le contrôle positif le glibéclamide . L'extrait de *Centaurium* a un rôle sur le métabolisme hépatique des glucides en stimulant la synthèse directe du glycogène, en normalisant l'activité de la phosphorylase et en réduisant l'activité de glucose 6 phosphatase.

II. Métabolites secondaires

II.1. Généralités sur les métabolites secondaires

Ce sont toute molécule organique complexe présente chez les végétaux, qui est indirectement essentielle à leur vie et leur interaction avec l'environnement (**Poutrain., 2008**). Les métabolites secondaires sont synthétisés par les plantes autotrophes à partir des métabolites primaires (**Boudjouref., 2011**), on les trouve dans toutes les parties des plantes supérieures par faible concentrations différentes (**Merghem., 2009**).

II.2. Classification des métabolites secondaires

Ils sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence en trois classes: les polyphénols, les terpènes ; stéroïdes et les alcaloïdes (**Hennebelle et al., 2004**).

II.2.1. Les composés phénoliques

II.2.1.1. Généralités sur les polyphénols

Ce sont des molécules dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène (**Gee et Johnson., 2001**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés qui ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'un ou plusieurs cycles aromatiques à 6 carbones, lui-même porteur une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagés (éther ester, hétéroside...) (**Bruneton., 1999 ; Lugasi et al., 2003**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone., 1993**).

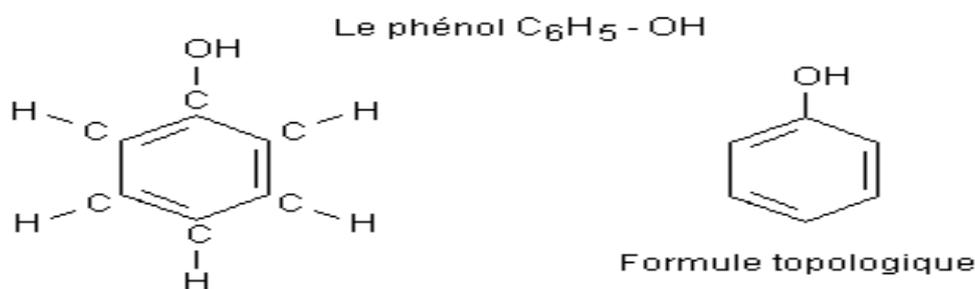


Figure I.8 : Formule chimique brut d'une fonction phénol (C_6H_5OH)

II.2.1.2. Biogénèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols végétaux se fait par deux voies principales qui sont :

- **Voie shikimate** : Elle conduit à la formation du chorismate par la phosphorylation et la condensation du shikimate avec le phosphoénol pyruvate. Le chorismate joue un rôle dans la formation des aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés : acétophénones, acides phénols, coumarines, lignines, lignanes ...etc. (Ellis., 2009 ; Roberts., 1996).
- **Voie acétate** : conduit à des poly- β -cétoesters de longueurs variables (polyacétates ou polykétides) qui menant par cyclisation à des composés polycycliques: chromones, isocoumarines, depsides, depsidones, quinones...etc. (Javillier., 1969 ; Paech., 1963).

La voie des polyacétates intervient chez les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates, conduit à l'apparition d'une diversité structurale des composés phénoliques. Les composés obtenus sont dits mixtes : flavonoïdes, stilbènes, pyrones...etc. (Hemingway., 1992 ; Geissamn., 1972).

II.2.1.3. Principaux groupes des polyphénols

Leur classification repose sur : la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux dont on peut distinguer les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les coumarines et les tannins ...etc (Boros et al., 2010).

II.2.1.3.1. Phénols simples

Les phénols sont des composés aromatiques rares dans la nature, elles portant au moins un groupe hydroxyle directement lié à un carbone du cycle aromatique, en général le benzène, parmi elles : le phénol, catéchol, guaiacol, phloroglucinol...etc (Figure I.9).

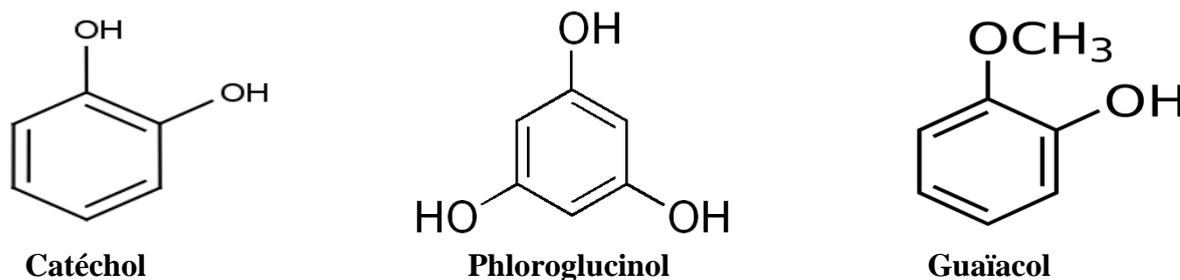


Figure I.9: structures chimiques de quelques phénols simples

II.2.1.3.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont composés d'un noyau benzénique, une fonction acide et un ou plusieurs groupes hydroxyle phénolique (Wichtl et Anton., 2009). Ces composés sont dérivés de deux sous-groupes distingués : les acides benzoïques et cinnamiques (Figure I.10).

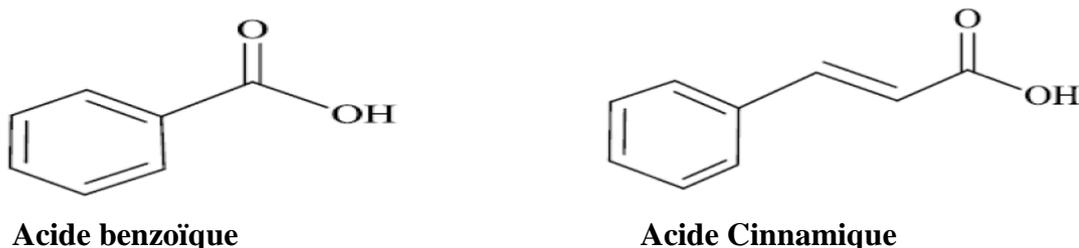
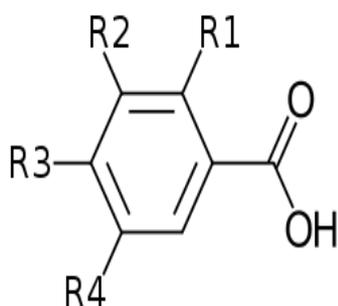


Figure I.10 : Structures de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Bruneton., 2009).

II.2.1.3.2.a. Acide phénols dérivés d'acide benzoïque (C6-C1)

Les acides hydroxybenzoïques sont très présent dans le règne végétal soit sous forme libre ou forme combinée à l'état d'ester ou de glycosides (Harrar., 2012). Ces composés sont proviennent de l'acide cinnamique dont la chaîne latérale perd 2 carbones. Les plus répandus sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton., 1999).

Tableau I.2: Dérivés d'acide hydroxybenzoïque (Macheix et al., 2005).

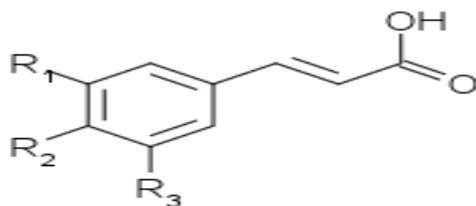


	R1	R2	R3	R4
acide benzoïque	H	H	H	H
acide p-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
acide protocatéchinique	H	OH	OH	H
acide vanillique	H	OCH3	OH	H
acide gallique	H	OH	OH	OH
acide syringique	H	OCH3	OH	OCH3
acide salicylique	OH	H	H	H
acide gentisique	OH	H	H	OH

II.2.1.3.2.b. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3)

Les acides hydroxycinnamiques sont très rarement retrouvés à l'état libre et sont généralement combinés (esters, amide, glucosides).

Tableau I.3: Dérivés les plus fréquents de l'acide hydroxycinnamiques (**Macheix et al., 2005**).



	R1	R2	R3
acide cinnalique	H	H	H
acide p-cinnamique	H	OH	H
acide caféique	OH	OH	H
acide férulique	OCH3	OH	H
acide sinapique	OCH3	OH	OCH3

II.2.1.3.3. Les flavonoïdes

Ce sont des pigments quasi universels des végétaux, responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havasteen., 2002**). Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone, existent à la fois sous forme libre (aglycone ou génines) ou liée à des oses et autres substances (hétérosides) (**Erlund., 2004**). Ils sont distribués dans les feuilles, les fleurs ou encore dans les fruits (**Bruneton., 1999**).

II.2.1.3.3.a. Structure chimique des flavonoïdes

Ils ont tous une origine biosynthétique commune (la condensation de trois groupements acétates (fournis sous forme malonyl-CoA) avec l'acide 4 hydroxy cinnamoyl-CoA) (**Merghem., 2009**) et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à C₁₅ formé par deux cycles aromatiques (A et B) à C₆, connectés par une chaîne en C₃ (structure en C₆-C₃-C₆). Ces trois carbones servant de jonction entre les deux cycles A et B est communément cyclisé pour former un hétérocycle oxygéné C, dont 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' (**Bruneton., 1999**) (Figure I.11).

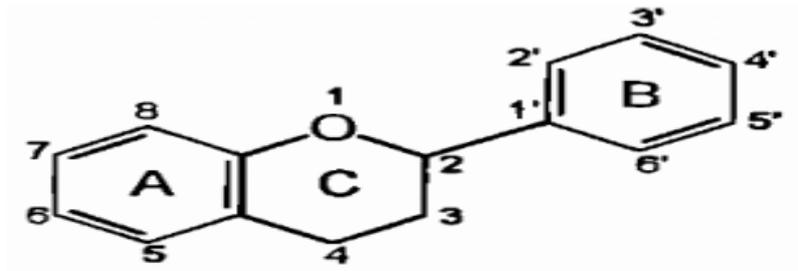
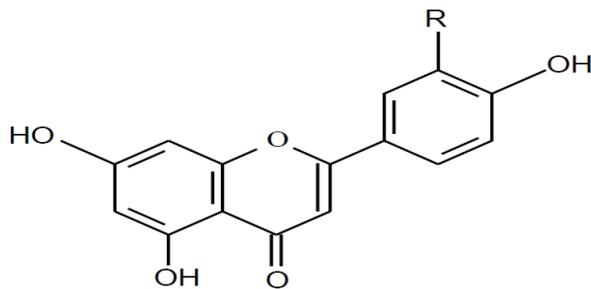


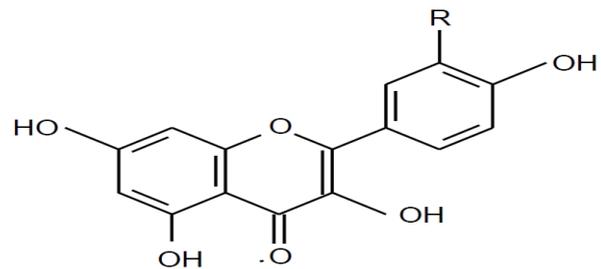
Figure I.11: Structure de base des flavonoïdes (Dacosta., 2003)

II.2.1.3.3.b. Classification des flavonoïdes

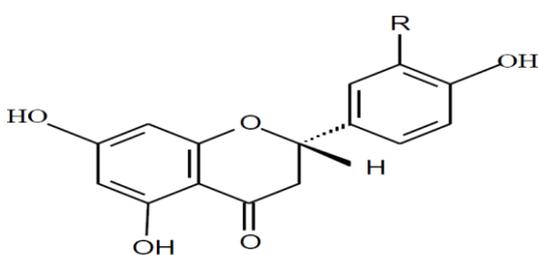
Les flavonoïdes sont divisés en différentes classes en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, alors que les composés individuels de chaque classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C. ils sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5' (Bruneton., 1993).



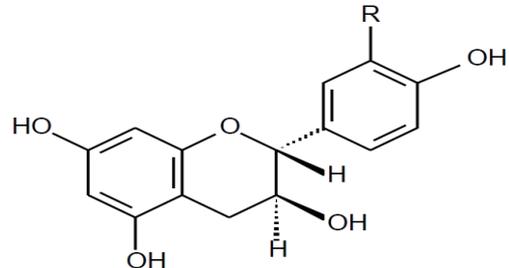
FLAVONES
R=H ; apigénine
R=OH ; lutéoline



FLAVONOLS
R=H ; kaempférol
R=H ; quercétine



DIHYDROFLAVONE
R=H ; leucopélargonidol
R=OH ; leucopéyanidol



DIHYDROFLAVANOLS
R=H ; dihydrokaempférol
R=OH ; dihydroquercétol

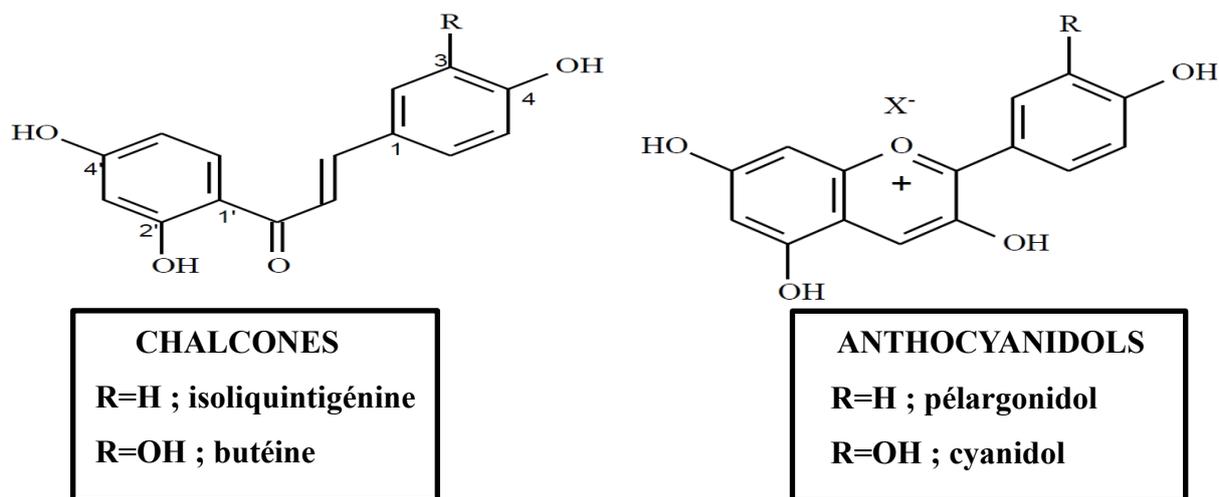
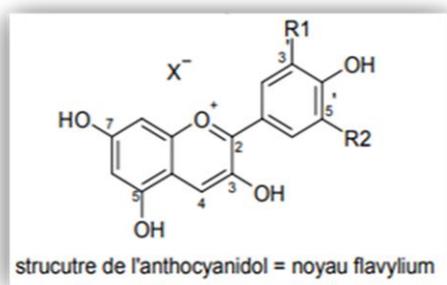


Figure I.12 : Les principales classes des flavonoïdes

II.2.1.3.4. Anthocyanosides

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles, responsables de la coloration rouge, violette ou bleue des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Bruneton., 2009**). Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (appelé génine) et d'oses, Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium ou cation flavylium. Ils sont toujours hydroxylés en C3, et le plus souvent penta ou hexasubstitués par des hydroxyles et/ou méthoxyles (**Bruneton., 2009**).

Tableau I.4: Les structures chimiques des principaux anthocyanidols connus



Génine	couleur	R1	R2
Pélargonidol	Orange-rouge	H	H
Cyanidol	rouge	OH	H
Péonidol	rose	OCH3	H
Delphinidol	Bleue-violette	OH	OH
Pétunidol	violette	OCH3	OH
Malvidol	Mauve	OCH3	OCH3

II.2.1.3.5. Les quinones

Ce sont des composés oxygénés issues de l'oxydation des composés aromatiques avec deux Fonctions cétones ($-C=O$). Elles sont caractérisés par un motif

1,4-dicétocyclohexa-2,5- diénique (para-quinones) ou bien, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Figure I.13) (Lumb et al., 2008). Ce sont des substances colorées et brillantes, on les trouve dans les végétaux, les champignons, les bactéries, les organismes animaux. Ils sont subdivisés en benzoquinones, Naphta quinones et Anthraquinones (Guignard et al., 1998).

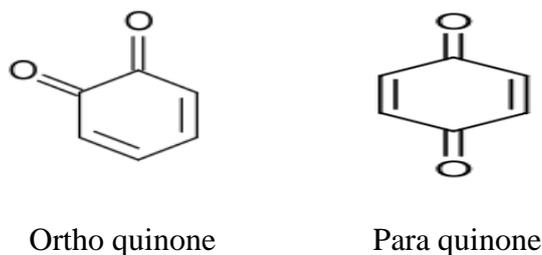


Figure I.13: structures de base des quinones (Lumb et al., 2008).

II.2.1.3.6. Les anthraquinones

L'anthraquinone ou le 9,10-dioxoanthracène est un composé organique, aromatique, polycyclique dérivé de l'anthracène. Présent dans la nature, chez un certain nombre d'animaux et de plantes telle que : le séné (cassia angustifolia) (Hans et Kothe., 2007). En médecine, On l'utilise pour ses effets laxatifs dans le traitement des troubles gastro-intestinaux et aussi dans la fabrication de teintures, de pigments et de pâte à papier.

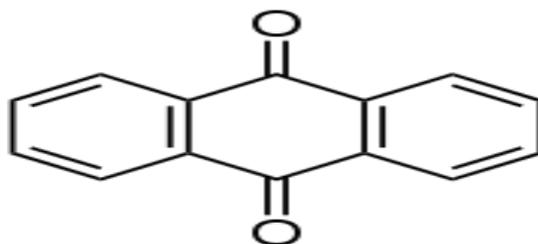


Figure I.14 : La formule générale des anthraquinones

II.2.1.3.7. Tannins

Les tanins sont des molécules hydrosolubles, de masse moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, à saveur astringente, ayant en commun la propriété de tanner la peau (Bruneton., 2008). Ils possèdent la capacité de précipiter les protéines, les alcaloïdes et d'autres polymères organiques. On les trouve dans divers organes et surtout dans les écorces âgées et les tissus

d'origine pathologiques (galles) (**Khanbabae et Ree., 2001**). On distingue deux groupes différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique (**Hagerman., 2002**)

II.2.1.3.7.a. Les tannins hydrolysables

Ce sont des oligo- ou polyesters d'un sucre associés à un nombre variable de molécules d'acide-phénol (**Mueller-Harvey., 1992 ; Jean-Blain., 1998**). Ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase), en ose (généralement le glucose) et en acides phénols. Selon la nature de celui-ci on distingue (**Paris et Hurabielle., 1981**):

- **Tanins galliques ou gallo-tanins** : par hydrolyse, ils libèrent l'ose (glucose) et l'acide gallique.
- **Tanins ellagiques ou ellagi-tanins** : par hydrolyse, ils libèrent l'ose (glucose), l'acide hexahydroxy diphenique et ses dérivés comme l'acide ellagique et l'acide chébulique.

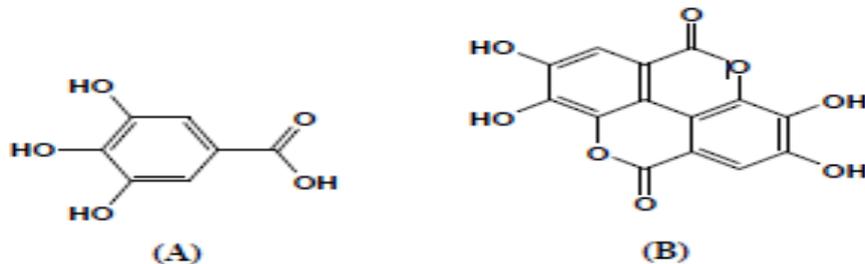
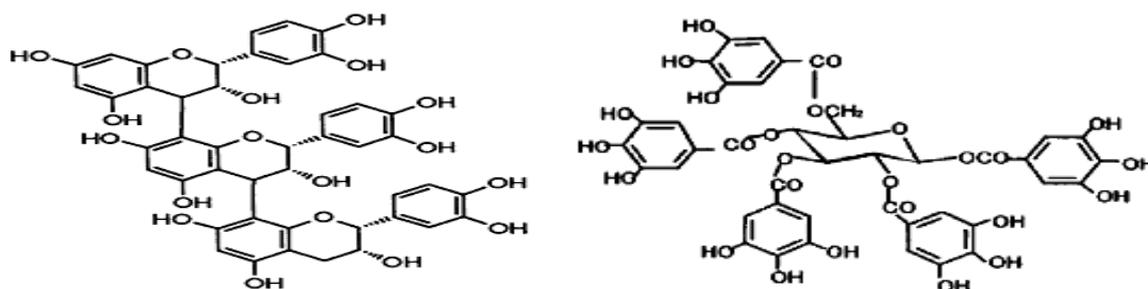


Figure I.15: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

II.2.1.3.7.b. Les tannins condensés ou tannins proanthocyanidols

Ce sont des oligomères ou des polymères d'unités de flavonoïdes, résultent de la condensation de molécules élémentaires de flavan-3-ol (catéchine) ou flavan-3,4-diols (leuco anthocyanidines) qui sont liées entre elles par des liaisons de type C-C ou C-O-C, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysable. Les tannins condensés peuvent être dépolymérisés en milieu alcool-acide à chaud en anthocyanidols tels que cyanidol et delphinidol, donc c'est la raison pour laquelle on appelle aussi « proanthocyanidines » (**Merghem., 2009**).



Tanin condensé (Yokozawa et al., 1998) Tanin hydrolysable (gallique) (Okuda., 2005)

Figure I.16: Structure des tanins (Yokozawa., 1998; Okuda., 2005)

II.2.1.3.8. Lignines

La lignine (C₆-C₃)_n est un polymère tridimensionnel résulte de la polymérisation de trois unités monomères phénoliques dérivées de l'alcool cinnamique (les monolignols) qui les principaux sont : l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool p-coumarylique (Figure I.17). C'est le polymère aromatique naturel le plus abondant dans le règne végétal (Privas., 2013). Il est déposé principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables (Hopkins., 2003).

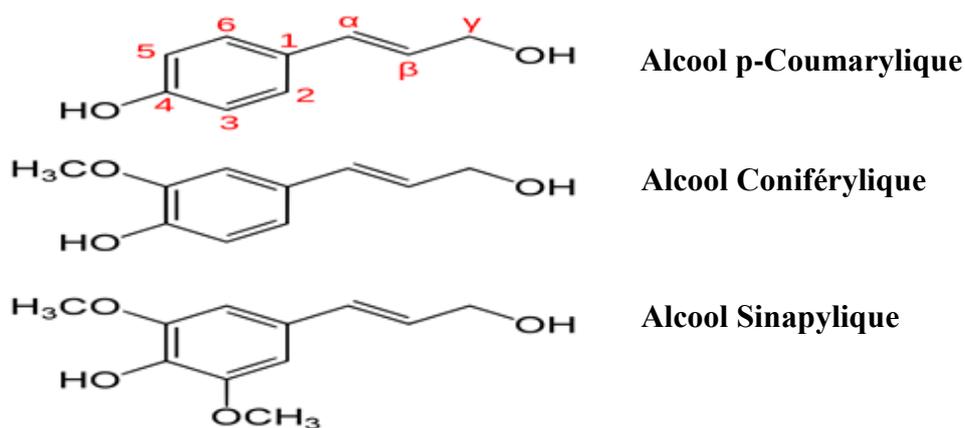


Figure I.17 : Structures chimiques des monolignols (Scalbert et Williamson., 2000)

II.2.1.3.9. Lignanes

Les lignanes sont des composés naturels dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbone β des chaînes latérales (liaison 8-8') de deux unités dérivant de 1-phénylpropane (dimérisation de deux unités de monolignol) (Figure I.18). On les retrouve dans soixante-dix familles (Ayes et Loike., 1990) et sont accumulés dans toutes les parties

des plantes (Midoun., 2011). Chez les gymnospermes sont localisés surtout dans les bois alors que chez les Angiospermes dans tous les tissus.

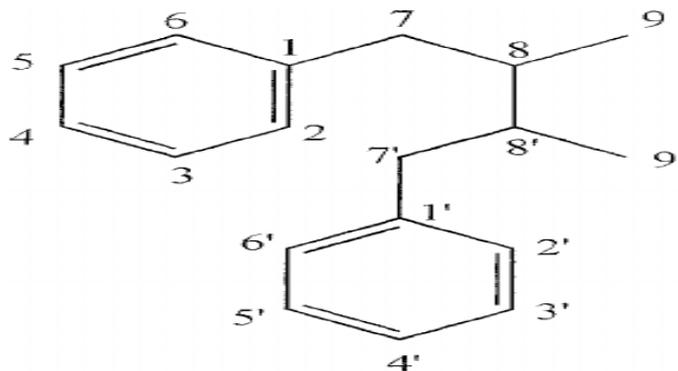


Figure I.18: Structure générale des lignanes (C6-C3)₂.

II.3.1.3.10. Coumarines, Stilbènes (les plus rares) (Nkhili., 2009)

❖ Coumarines

Ce sont des substances aromatiques à C₉ caractérisées par le noyau 2H-1-benzopyrane-2-one, lactones des acides ortho-hydroxyZ-cinnamiques (Ford et al., 2001). Les coumarines sont aussi les dérivés de C6-C3, se trouvent dans la nature soit à l'état libre soit engagé (sucres). Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard., 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004). Son odeur caractéristique semblable à celle du foin (Cowan., 1999).

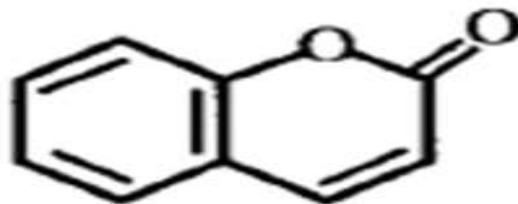
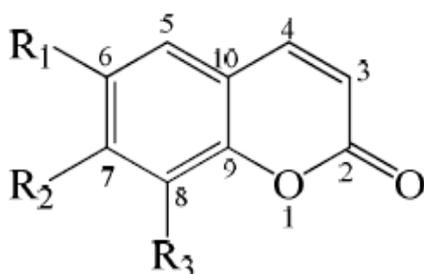


Figure I.19 : Squelette de base des coumarines (Cowan., 1999).

Tableau I.5 : Principales structures chimiques des coumarines simples (Djemoui., 2012).



	R1	R2	R3
Ombelliférone	H	OH	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH3	OH	H
Herniarine	H	OCH3	H
Fraxétol	OCH3	OH	OH
Esculine	O-Glu	OH	H
Cichorine	OH	O-Glu	H
Fraxoside	OCH3	O-Glu	OH

❖ Stilbènes

Les stilbènes possèdent deux noyaux benzéniques reliés par un pont éthène (-C=C-), ils sont membres de la famille des stilbénoides qui créent la parenté biogénétique avec les flavonoïdes, dont la structure est C6-C2-C6, il peut y avoir deux formes des stilbènes : *cis* et *trans* (Figure I.20) qui se rencontrent dans de nombreux végétaux supérieurs, sous forme libres ou hétérosides, parfois polymères. Les stilbènes sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par des micro-organismes (Crozier et al., 2006).

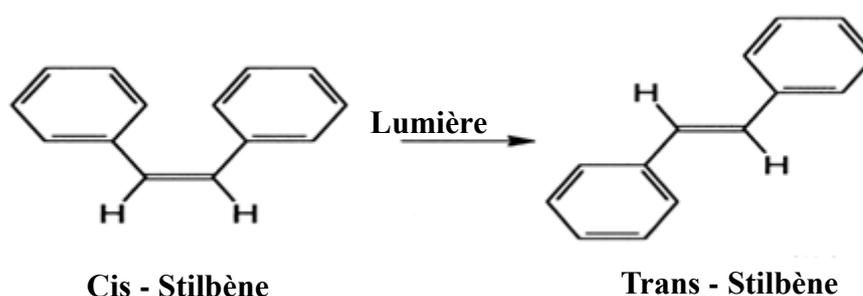


Figure I.20: Structure générale des stilbènes

II.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques, azotés et à caractère alcalin (Badiaga., 2011), ils sont composés de carbone, d'hydrogène, d'azote, et d'oxygène, quelques alcaloïdes peuvent comporter du soufre (Kalla., 2012; Kirmann et al., 1975). Ces substances existent

sous forme combinés à des acides organiques ou à des tanins et sont rarement à l'état libre (Ziegler et Facchini., 2008). On les rencontre chez de nombreux végétaux dont ils sont localisés dans les pièces florales, les fruits ou les graines (Krief., 2003) La classification des alcaloïdes dépend de leurs précurseurs biogénétiques communs et la position de l'atome d'azote (intra ou extra-cyclique) (Aniszewski., 2007) :

- **Les alcaloïdes vrais** : Représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, l'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle, dérivent d'acides aminés ayant une activité pharmacologique marquée (Merghem., 2009). Leur présence dans les plantes, est sous forme libre, de sel, ou comme N-Oxyde, ex : Nicotine, Wilforine...ect.
- **Les pseudo-alcaloïdes** : Sont des composés dont le squelette carboné de base ne dérive pas d'acides aminés : dérivés dans la majorité d'isopranoïdes et du métabolisme de l'acétate, et ils ne possèdent pas d'azote intra cyclique dont leur incorporation dans la structure se fait en phase finale, ex : la coniine,...etc (Badiaga., 2011).
- **Les proto-alcaloïdes** : Sont des amines simples soluble dans l'eau dont l'azote n'est pas inclus dans le système, ils sont élaborés à partir d'acides aminés, ex : mescaline, hordénine, colchicine...etc (Badiaga., 2011).

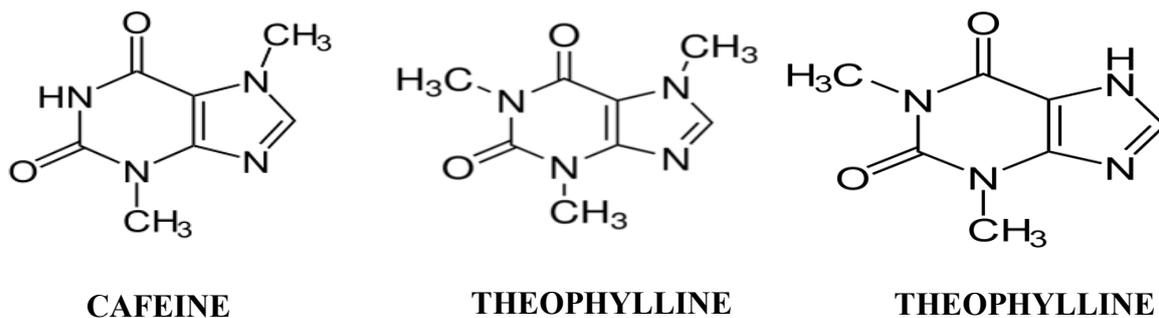


Figure I.21 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes (Bruneton, 2009).

II.2.3. Les composés terpéniques

II.2.3.1. Les terpenoïdes

Les terpènes sont les principaux composants des huiles essentielles, sont des hydrocarbures naturels à structure cyclique ou à chaîne ouverte (Hellal., 2011) : leurs formule

brute est $(C_5H_8)_n$ (Seenivasan., 2006). Ils résultent de la condensation de deux ou plusieurs unités de bases : l'isopréniques (2méthylbuta-1,3-diène) de formule C_5H_8 (Figure I.22). Les terpènes sont le plus souvent d'origine végétale (Malecky., 2005). Synthétisés par les plantes les organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaissa., 2011).

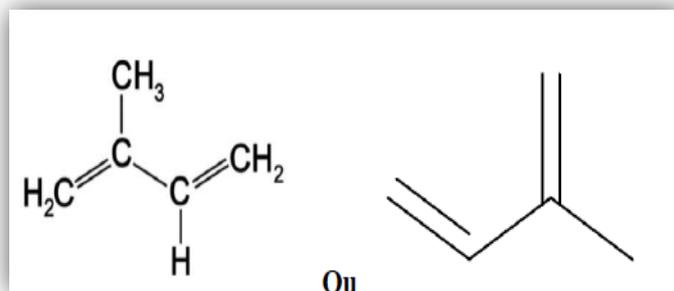


Figure I.22: Structure de base de l'isoprène (Khenaka., 2011)

Tableau I.6 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes (Belbache., 2003).

N	Squelette carboné	Type de terpenoïdes	Exemple de molécule
1	C5	Hemiterpene	Isoprène
2	C10	Monoterpène	Nérol, citronnelle
3	C15	Sesquiterpène	β -Cadinène
4	C20	Diterpène	Sclaréol, phytol
6	C30	Triterpène	Lanostérol
8	C40	Tetraterpène	Caroténoïdes
> 8	>40	Polyterpène	Caoutchouc

II.2.3.2. Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles, ils sont synthétisés à partir d'un triterpène acyclique (le squalène) et possèdent moins de 30 atomes de carbones (Bruneton., 1993 ; Hopkins., 2003). Ces composés se caractérisent par un noyau stérane (constitué des 4 cycles de A à D) (Figure I.23). Ils sont trouvés chez les végétaux aussi bien que chez les animaux. On distingue quatre sous classe des stéroïdes : les stérols et dérivés, les hormones stéroïdes, les sécostéroïdes, les stéroïdes conjugués (Benaissa., 2011).

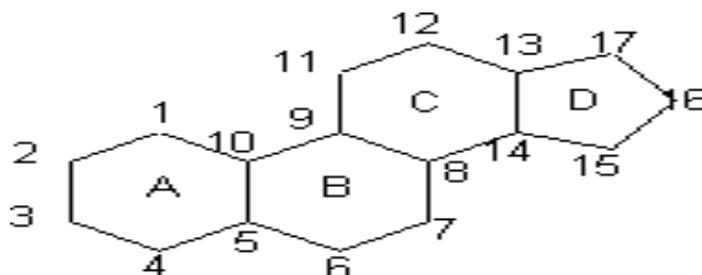


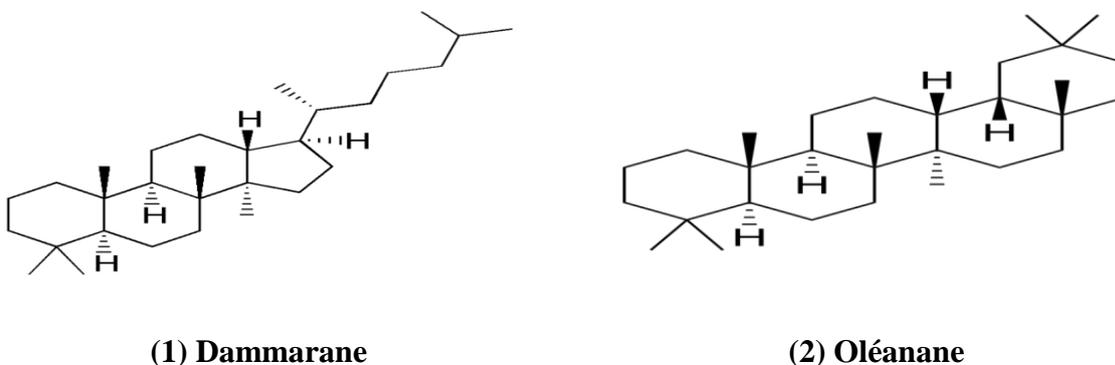
Figure I.23: squelette de base des stéroïdes (Ling et Jones., 1995).

II.2.3.3. Les saponosides

Ce sont des hétérosides à poids moléculaire élevé, ont des propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant une mousse semblable à celle du savon (Hart *et al.*, 2008 ; Bruneton., 2009). Cette propriété est dû au caractère amphiphile: Elles se composent d'une fraction lipophile appelée génine ou aglycone (un noyau stéroïdique ou triterpénique) et d'une partie hydrophile osidique (ex : D- glucose, D-galactose) (Wallace., 2004). Les saponines sont très fréquentes chez les végétaux mais aussi produits par les organismes marins et se classent en deux groupes selon la nature de leur génine : (Ekoumou., 2003).

II.2.3.3.1. Saponosides à Génines triterpéniques

Elles possèdent un squelette à C₃₀ (5 cycles) et sont issus de la cyclisation de l'époxy-2,3-squalène. Cette cyclisation conduit en premier lieu aux molécules tétracycliques puis aux molécules pentacycliques qui sont les plus nombreuses. Ils sont Retrouvés principalement chez Angiospermes Dicotylédones et chez certains animaux marins.



(1) Dammarane

(2) Oléanane

Figure I.24: Les principales Géninestriterpéniques monocycliques (1) et pentacycliques (2).

II.2.3.3.2. Sapoosides à Génines stéroïdiques

Elles possèdent un squelette hexacyclique à C₂₇ à noyau Spirostane (Noyau stéroïdique et 2 Cycles : furanique et pyranique) ou pentacyclique (furostane) qui est n'existant qu'à l'état hétérosidique dans la plante fraîche et résultant de l'engagement de l'hydroxyle en 26 dans une liaison osidique. Ces sapogénines possèdent toujours une fonction alcool secondaire en position 3. Ils sont retrouvés exclusivement chez les Angiospermes Monocotylédones.

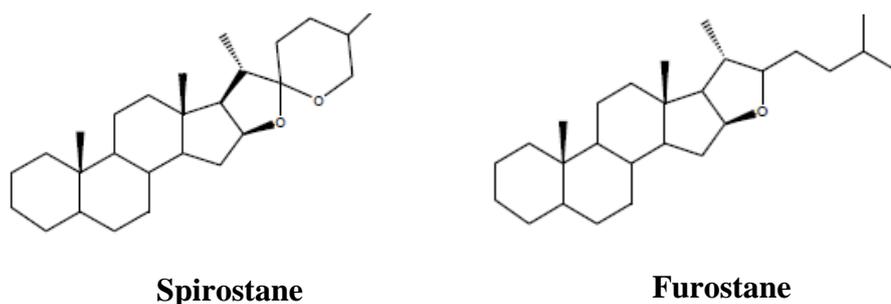


Figure I.25: Génines stéroïdiques

II.3. Fonction et intérêt thérapeutique des métabolites secondaires

Selon « Macheix et al. 2005 », le rôle de ces composés est reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans leurs utilisations par l'homme. Ils peuvent en effet intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante, dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique et dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies.

Tableau I.7 : Activités biologiques de quelques composés secondaires

Composés	Activité biologiques	Références
Phénols simples et acides phénoliques	Antibactériennes, Antifongiques, antioxydants, anti inflammatoires, antiseptiques et analgésiques, antipyrétiques, antiradicalaires, antitumorales, antivirales, cholagogues, hépato protecteurs, immunostimulants, effet anticancéreux chez les souris (acide caféique et ferulique)	(Bruneton, 1999) (Cunha, et al ; 2004) (Laraoui., 2007)
Flavonoïdes	Anti tumorales, anti carcinogènes, anti -inflammatoires, antioxydants, antiallergiques, antiulcéreuse, antivirales,	(Hennebelle et al., 2004)

	antimicrobiennes, anti-estrogénique, antispasmodique, hépato protectrices, antiseptiques urinaires, inhibiteurs enzymatiques, hypocholestérolémiantes, anti parasitaires	(Narayana et al., 2001) (Ramos., 2007)
Coumarines	antioxydantes, anti tumorale, analgésique, antiinflammatoires, antimicrobiennes, anti-adhérences, vasculoprotecteurs, neurosédatives, hypotensives, antivirale, stomachiques et carminatives, anti-agrégation plaquettaire, anticoagulante, diurétiques, immunostimulante	(Bruneton 1999) (Thati et al., 2007) (Taguchi., 2000)
Lignanes	Antivirales, anticancéreux, antimicrobiennes, antioxydants, anti tumorales, antiagrégants plaquettaires, antagoniste calcique, anti hypertensive, anti protozoaire, antimitotiques, Inhibiteurs enzymatiques, anti hypertenseurs, hépato protectrices, antiallergiques et antirhumatismales	(Donaldson., 2004) (Ayres et Loike., 1990) (Gertschet al., 2003)
Tanins	Astringente, anti diarrhéique, vasculoprotectrices, antivirale antiseptique. Antioxydantes, anti-nutriments, anti-microbes, antiinflammatoires, anti hypertensives, anti mutagènes, immunostimulante, anti tumorales, inductrices de l'apoptose	(Biaye., 2002)
Saponosides	Antioedémateux, Antileshmanien, Insecticide, Antivirale, Antiulcéreux, Immuno-modulateur, Antivieillessement, Hypoglycémique, anti-inflammatoires, anti-hémorroïdaires et anti-appétantes, chimiopréventive, analgésique, Sédative, hépatoprotecteurs, neuroprotecteurs, antituberculeux, Réduction du cholestérol, Diurétique	(Hostettmann, et Marston., 1995) (Francis et al., 2002) (Lacaille-Dubois., 1999)
Alcaloïdes	anesthésiques locaux, antipaludiques, analgésiques, sédatifs anticholinergiques, anti-malaria, anti-hypertensive, stimulant centrale, dépressant cardiaque, diurétique narcotique, anti-tumeur, antiallergiques, vasodilatatrice, hypnotiques, antiinflammatoires, antimicrobiennes, rôle dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, effet sur les troubles nerveux	(Hopkins., 2003) (Badiaga., 2011) (Bruneton., 2009)
Terpénoïdes et Stéroïdes	anti HIV, Insecticides, fongicides, antiappétants pour les insectes, Anti tumoraux, Cytotoxiques, antibactériens, anti-inflammatoires, antibiotiques, contraceptives, anabolisantes	(Bisoli et al., 2008) (Bruneton., 2009)

III. Stress oxydant et les activités biologiques

III.1. stress oxydant et l'activité antioxydant

III.1.1. Stress Oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des radicaux libres en faveur des dernières, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. Cette situation peut être due à une diminution des défenses antioxydants ou à une augmentation de production des radicaux libres (Favier., 2003).



Figure I.26 : Schéma de la balance entre les espèces réactives oxygénées et les antioxydants.

III.1.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Extrêmement instable (Asmus et Bonifacic., 2000). Il apparaît soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) durant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox. En raison de leur haute réactivité, ce composé peut réagir avec des molécules plus stables pour appairer son électron en cédant un (réducteur) ou en donnant un électron (oxydant), ces derniers peuvent être classés selon la position de l'électron célibataire en espèces réactivées de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN) (Vamecq *et al.*, 2004). L'appellation ERO inclut les radicaux radicalaires comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($\cdot OH$) et non radicalaires telles que l'oxygène singulet (O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), se forment par la réaction de ces radicaux radicalaires sur les composés biochimiques de la cellule (Halliwell et Gutteridge., 1989).

Tableau I.8: Les principales espèces réactivées de l'oxygène (ERO)

Espèces réactives	Réaction de formation	principales réactions	Références
Radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène : addition d'un électron $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$	Catalyseur de la réaction de Haber-WeiB par recyclage de Fe^{2+} et Cu^+ ; formation du H_2O_2 et $ONOO^-$	(Stief., 2003)
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	Formé à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysé par la superoxy de dismutase $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD, 2H^+} H_2O_2 + O_2$	Formation du radical hydroxyle ; inactivation d'enzymes ; oxydation de biomolécules	(Karp.,2010)
Oxygène singulet $\bullet O_2$	Formé par des réactions chimiques privilégiées, comme par exemple : $H_2O_2 + ClO^- \longrightarrow H_2O + Cl^- + O_2$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides	(Kruidenier et Verspaget., 2002)
Radical hydroxyle $\bullet OH$	formé par la réaction de <i>Fenton</i> à partir d' H_2O_2 en présence de métaux de transition $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \bullet OH + Fe^{3+} + OH^-$	Abstraction de l'hydrogène production de radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols	(Hennebelle., 2006) (Delattre et al., 2005)

III.1.2.1. Les principales sources des radicaux libres

III.1.2.1.1. Les Sources exogènes

Les facteurs environnementaux et le mode de vie également responsables à la création et l'accumulation de RL dans l'organisme comme par exemple : toxiques environnementaux, les radiations UV, tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, cytokines pro-inflammatoire, xénobiotiques pro-oxydants, médicaments, les aliments riches en protéines et/ou en lipides (Tamer Fouad., 2003).

III.1.2.1.2. Les Sources endogènes

Toute réaction biochimique faisant intervenir l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de RL, ces derniers sont naturellement présents dans l'organisme, et sont générés essentiellement par des mécanismes physiologiques parmi eux nous citons :

- Les NAD(P)H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCL) en utilisant NADH ou NADPH comme substrat (**Vignais 2002**).
- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion (**Yokoyama et al., 1990**).
- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique qui peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases, pour former entre autre des hydroperoxydes (R-O-OH) qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.
- La réduction monoélectronique au niveau de la mitochondrie qui conduit à la formation de l'anion superoxyde, ce dernier donne naissance à diverse ERO.

III.1.3. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant : la maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, vieillissement accéléré ou associé à des complications de l'évolution tels que le diabète, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'asthme l'arthrite, la cataractogénèse, l'hépatite (**Packer et Weber., 2001**). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Favier., 2003**).

III.1.4. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif

L'antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, elle est présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable (**Cano et al., 2007**). Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres pour former d'autres radicaux plus stables (**Anonyme 1., 2007**) et protègent certaines vitamines (**Moure et**

al., 2001), les antioxydants existent aussi comme additifs alimentaires qui augmentent la durée de vie de ces produits en les protégeant contre la détérioration (Anonyme 2., 2006).

III.1.4.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, système thiorédoxine) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les espèces oxygénées réactives (Garait., 2006).

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme de nature métalloprotéines intervient dans l'explosion oxydative et piéger des radicaux libres, cette enzyme est chargée de réduire l'anion superoxyde. Son centre actif est un atome de manganèse ou une association de cuivre et de zinc en fonction du lieu où œuvrent ces enzymes (Cardey., 2007).

Le superoxyde dismutase inactive l'ion superoxyde (O_2^-) (point de départ de la chaîne de production des radicaux libres) en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celle-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O) (Menvielle-Bourg., 2005).

Les glutathions peroxydase (GPxs) réduisent les peroxydes lipidiques formés par l'oxydation des acides gras insaturée (Delattre et al., 2005)

Système thiorédoxine dégrade des peroxydes lipidiques et le peroxyde d'hydrogène. Elle permet la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Hattori et al., 2003).

III.1.4.2. Antioxydants non enzymatiques

III.1.4.2.1. Les antioxydants naturels

Ils incluent des espèces chimiques différentes (composés phénoliques, vitamines...etc.) qui sont d'origine végétale pour la plupart (Berger., 2005).

- **Acide ascorbique** (Vitamine C) est connu pour son rôle protecteur contre l'oxydation membranaire. Les propriétés antioxydantes de la vitamine C sont liées à sa capacité à donner des électrons (Pincemail et al., 1998).
- **Tocophérols** (Vitamine E) un antioxydant liposoluble joue également une action protectrice contre structures membranaires et des lipoprotéines. Les propriétés

antioxydantes de la vitamine E sont liées à sa capacité à donner des protons (**Rose et Bode., 1993**).

- **Les caroténoïdes** sont des pigments orangés ou jaunes de nature liposolubles, ils appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de neutraliser les radicaux ROO•, HO•, O₂•- (**Valko et al., 2006**).
- **Les composés phénoliques : essentiellement**

-**Les flavonoïdes** sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous (**Amić et al., 2003**)



Leur capacité antioxydante réside aussi dans leur faculté à terminer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (**Leopoldini et al., 2011 ; Schroeter et al., 2002**).

-**Les Coumarines** sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Igor., 2002**).

III.1.4.2.2. Les antioxydants synthétiques

Antioxydants synthétiques le butylhydroxyanisole (BHA) (E320) et le butylhydroxytoluène (BHT) (E 321) sont les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire, ces deux additifs sont insolubles dans l'eau mais présentent une bonne solubilité dans les milieux lipidiques (**Manel., 2013**). Sont fréquemment utilisés en tant que additifs pour prévenir le rancissement oxydatif des aliments, des produits pharmaceutiques et commerciaux (**Heloizy et al., 2010**). Les tests de cancérogénicité ont montrés que l'ajout de l'antioxydant BHA au régime alimentaire des rats induit une incidence élevée de papillome et de carcinome épidermoïde de l'estomac chez les deux sexes. Alors que le BHT provoque le cancer de la thyroïde (**Ito et al., 185**).

III.1.5. Quelques tests de l'évaluation des capacités antioxydantes

Il existe plusieurs méthodes qui ont été mises au point pour une quantification rapide simple et fiable de la capacité antioxydante des extraits naturels in vitro et in vivo. En général la majorité des tests d'évaluation de capacité antioxydante se basent sur les mécanismes de transfert d'hydrogène ou d'électron (Huang et al., 2005 ; Prior et al., 2005).

III.1.5.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH'

Le test du DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'un des premiers tests pour étudier la relation structure - activité antioxydante des composés phénoliques (Osman., 2011 ; Floegel et al., 2011). Il consiste en une mesure de la capacité d'un composé antioxydant à piéger le radical libre DPPH• d'une coloration violette, due à la présence d'un électron non apparié sur l'atome d'azote, il possédant une forte absorption dans le visible à 517 nm en solution alcoolique (Kandouli., 2018). En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le DPPH• est réduit pour donner une forme non radicalaire DPPH-H (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm, ce qui nous permet de mesurer le pouvoir anti-radicalaires de l'échantillon testé (Brand-William et al., 1995).

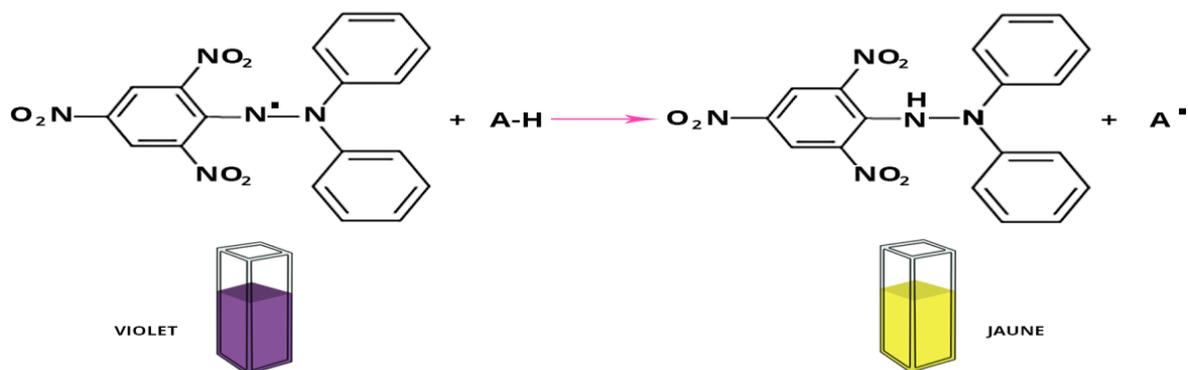


Figure I.27: Réaction de réduction du radical DPPH' en DPPHH

III.1.5.2. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS^{•+} (effet scavenger)

Elle consiste à mesurer l'effet inhibiteur des antioxydants sur le cation radicalaire libre l'ABTS^{•+}, l'acide 2,2'-azinobis(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), obtenu par oxydation de l'ABTS par un oxydant « persulfate de potassium » pour donner une solution colorée en

bleu vert (Prouillac., 2006). Le contact de ce radical avec un composé donneur d'hydrogène (Rice-Evans et al., 1995) conduit leur réduction en ABTSH^{•+} incolore, en suivant la décroissance de l'absorbance à 734 nm (Re et al., 1999).

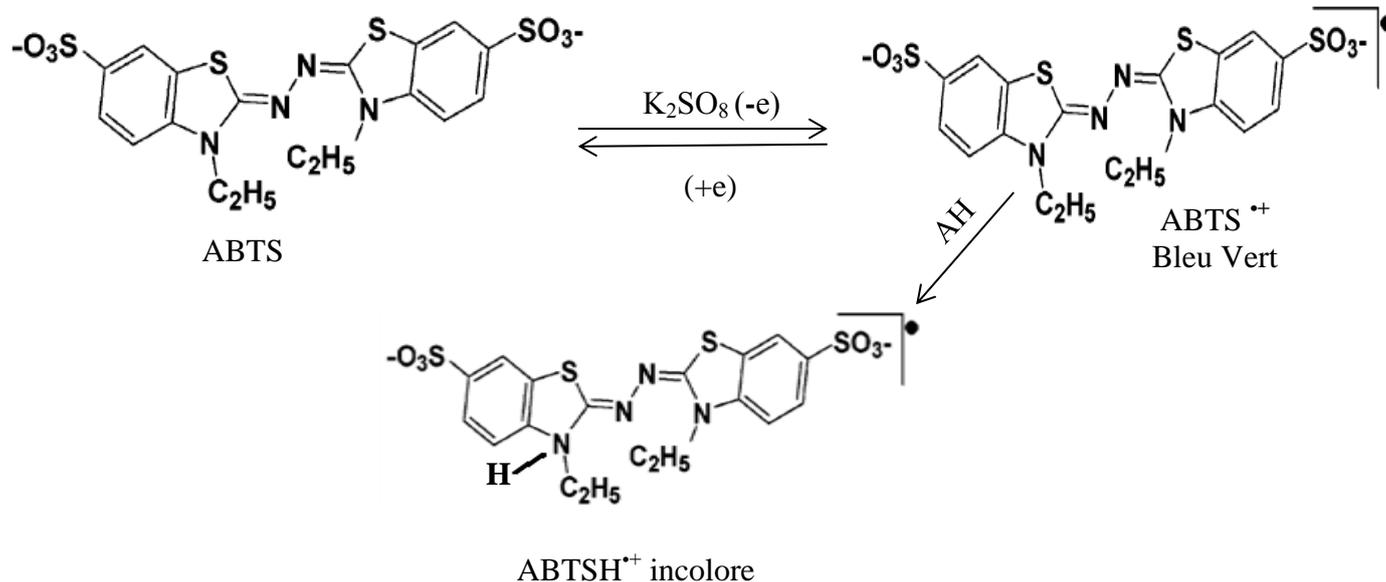


Figure I.28 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•]

III.1.5.3. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC)

La méthode de CUPRAC est basé sur le suivie de la diminution d'absorbance résulte à la réduction du réactif oxydant CUPRAC [néocuproïne (NC)-cuivre (II)] de couleur bleu par agent antioxydant donneur d'électrons en néocuproïne (NC)-cuivre (I) de couleur jaune-orangé. Cette réaction est quantifié par spectrophotomètre à $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Apak et al., 2011).

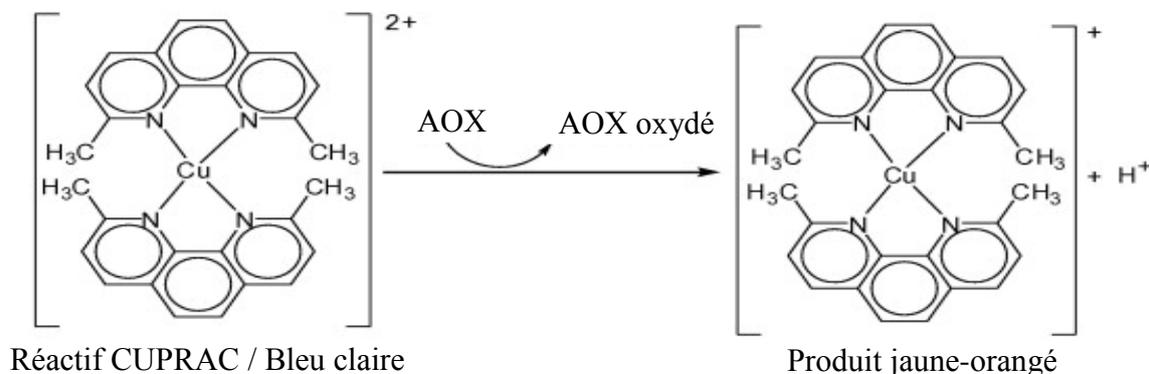


Figure I.29 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante

III.1.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

Cette méthode est appelée FRAP, elle est basée sur la capacité des phénols donneur d'électron à réduire le fer ferrique Fe^{3+} de ferricyanure de potassium en fer ferreux Fe^{2+} (Oyaizu., 1986). Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert apparaître dans le milieu réactionnel à 700 nm (Jayaprakash et al., 2001).

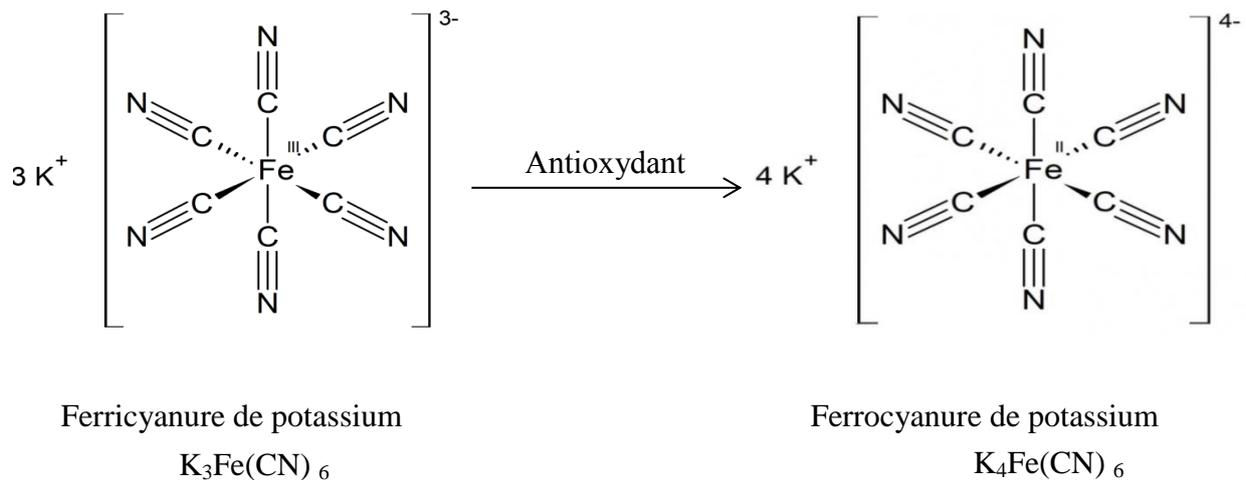


Figure I.30: Réaction de test FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power)

III.1.5.5. Capacité de chélation des ions métalliques (ions ferreux)

L'efficacité des ions ferreux en tant que cofacteur de SOD permis la protection contre les dégâts oxydatifs par l'élimination du fer, ce dernier participe autrement à la génération du $\text{HO}\cdot$ lors de la réaction de Fenton. Cette méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe $[\text{Fe}(\text{II})\text{-Ferrozine}]$ qui donne une couleur violette intense absorbe à $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$ après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} (FeCl_2). La mesure de la réduction de la couleur permet donc l'estimation de l'activité métal-chélateur (Dinis et al., 1999).

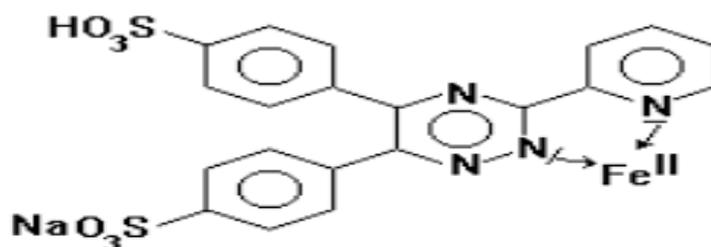


Figure I.31 : Le complexe Fe (II)- Ferrozine

III.1.5.6. Dosage de balayage des radicaux Galvinoxyl (GOR)

Le Galvinoxyl [2,6-Di-*tert*-butyl- α -(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-tolyl-oxyl] est un autre radical phénoxy libre et stable de couleur jaune foncée, il possède un électron non apparié sur l'atome d'oxygène et une maximum absorption dans le visible à $\lambda_{\max} = 428$ nm en solution alcoolique. En présence des capteurs de RL donneurs d'hydrogène, le galvinoxyl est réduit pour donner une forme non radicalaire de couleur jaune pâle. Une diminution de l'absorbance mesurée à 428 nm correspond à une augmentation de pouvoir anti-radicalaire des extraits testés (Shi *et al.*, 2001).

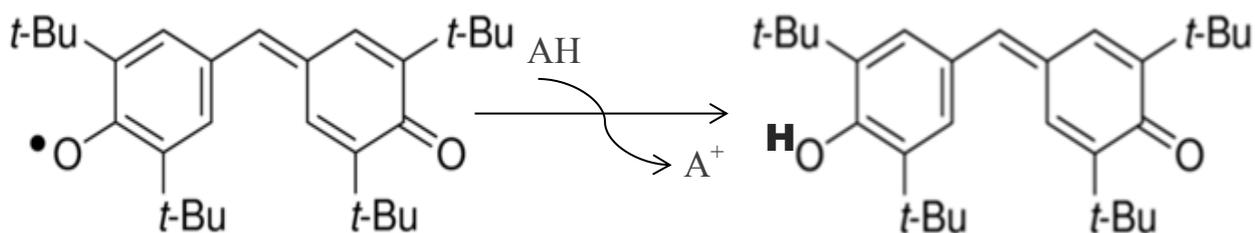


Figure I.32 : Réaction de la réduction de radical galvinoxyl en présence d'un antioxydant (AH)

III.1.5.7. Activité de phénanthroline

Ce test est basé sur la réduction de Fe^{+3} (FeCl_3) en Fe^{+2} en présence d'un composé antioxydant donneur d'électrons, le fer ferreux Fe^{+2} résulte forme avec la 1, 10-phénanthroline un complexe très stable intensément coloré en rouge-orangé appelé ferroïne. L'augmentation de l'absorbance de ferroïne est mesurée à $\lambda_{\max} = 510$ nm (Szydłowska-Czerniaka., 2008).

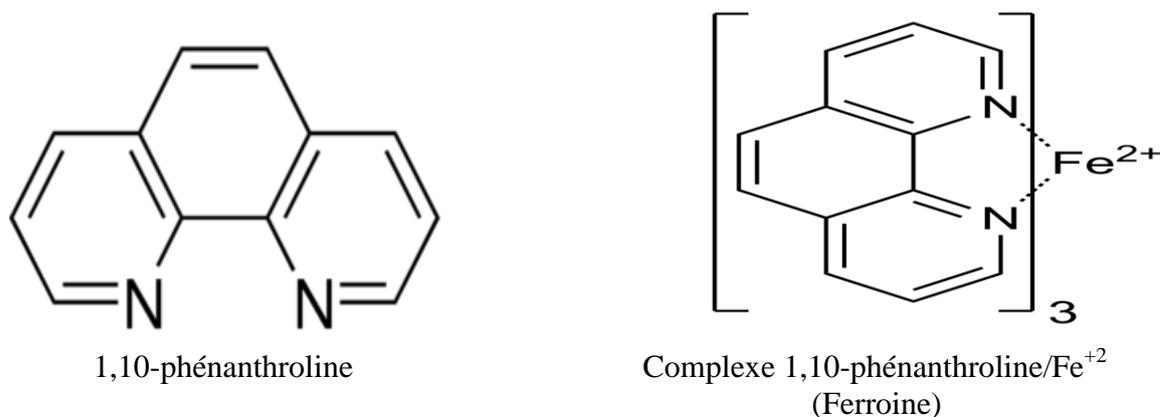


Figure I.33 : La 1, 10-phénanthroline et son complexe ferreux

III.2. Les activités enzymatiques

III.2.1. Activité anti-Alzheimer

III.2.1.1. La maladie d'Alzheimer

C'est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. Des faibles concentrations d'acétylcholine spécifiquement et de butyrylcholine dans l'hippocampe et le cortex du cerveau sont généralement considérées comme la cause de cette maladie dont l'inhibition de deux enzymes cholinestérases, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) par des inhibiteurs provenant de sources naturelles a été utilisée avec succès comme une cible thérapeutique pour la MA (Terry et Buccafusco., 2003).

III.2.1.2. Activité anti- acétylcholinestérase (in vitro)

Dans cette méthode l'activité anti- Alzheimer d'un échantillon est déduite de sa capacité à inhiber l'activité de l'enzyme AChE, ce qui entraîne une diminution de la dégradation de l'acétylcholine. On utilise un analogue de substrat naturel de l'AChE, l'acétylthiocholine iodide (ACTI) qui est hydrolysé en acide acétique et thiocholine, ce dernier forme avec l'acide 5,5'- dithiobis (2 nitrobenzoïque) (DTNB) présent dans le milieu réactionnel un dérivé de coloration jaune l'acide -5- thio 2-nitrobenzoïque (TNB) qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 412 nm. A partir de la variation de cette absorbance on peut déterminer si il y'a ou non une activité anti- AChE, dont la diminution d'absorbance en présence des agents ayant une complémentarité avec le site actif d'AChE dans l'extrait (les alcaloïdes) qui provoque l'inhibition de la dégradation de substrat (ACTI), indique un accroissement de cette activité (Ellman et al., 1961; Rhee et al., 2001).

III.2.1.3. Activité anti- butyrylcholinestérase (in vitro)

C'est une méthode consiste à inhiber l'activité de l'enzyme BChE responsable de l'hydrolyse de la butyrylcholine. Elle repose sur le même principe de l'activité inhibitrice d'acétylcholinestérase sachant qu'on utilise comme substrat la Butyrylthiocholine iodide (BuCI), le catabolisme de ce dernier par la BChE donne le produit thiocholine qui réagit avec le réactif d'Ellman (DTNB) pour produire l'acide -5- thio 2-nitrobenzoïque (TNB) coloré

délectable à 412 nm. La mesure de la réduction de la couleur jaune en présence des inhibiteurs (les alcaloïdes) dans l'extrait (complémentarité avec le site actif d'AChE donc blocage de l'hydrolyse) permet l'estimation de l'activité inhibitrice de BChE (Elman et al., 1961; Rhee, Meent, Ingkaninan et al., 2001).

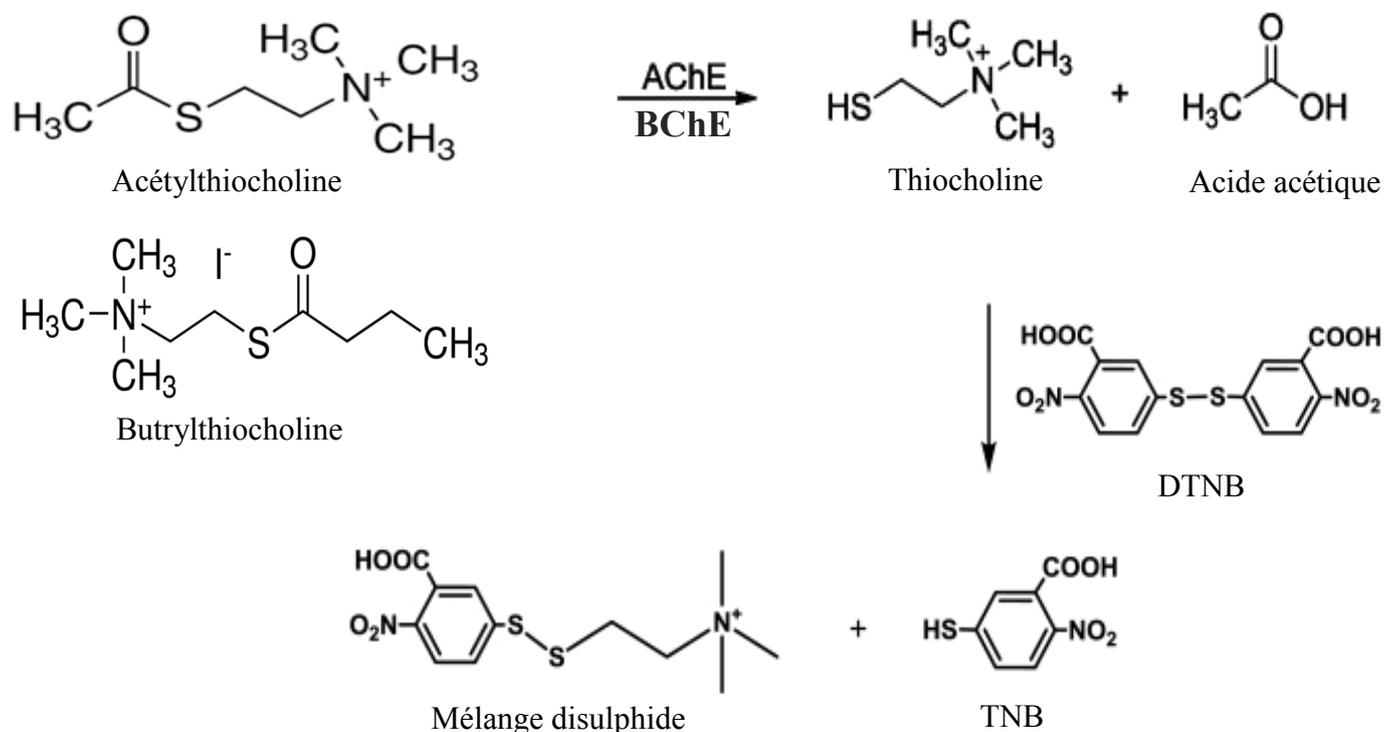


Figure I.34: Mécanisme chimique de l'activité anti-AChE/BChE selon la méthode d'Ellman et al (1961)

III.2.2. Activité anti- diabétique

III.2.2.1. Le diabète de type 2

C'est une affection métabolique glucidique, protéique et lipidique, caractérisée par une hyperglycémie chronique causé par un déséquilibre entre l'absorption de sucre dans le sang et la résistance anormal à l'insuline. L'hyperglycémie postprandiale joue un rôle important dans le développement du DT2 (Baron., 1998), donc la régulation de la glycémie est essentielle pour retarder ou prévenir le DT2. L'aptitude d'un médicament à base de plantes à retarder la production ou l'absorption intestinale du glucose en inhibant les enzymes hydrolysant les glucides, telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, est l'une des approches thérapeutiques permettant de réduire l'hyperglycémie postprandiale (Tiwari et Rao., 2002).

III.2.2.2. Test d'inhibition de l' α -glucosidase (in vitro)

Les α -glucosidases, sont des enzymes qui se retrouvent au niveau de la surface des villosités de l'intestin grêle. Ils sont responsables de l'hydrolyse des glucides complexes en glucose et autres monosaccharides absorbables (Chiba., 1997). Cette méthode consiste à mesurer l'effet inhibiteur des métabolites secondaires (polyphénols...) présent dans les extraits sur l'enzyme α -glucosidase. Dans ce test on utilise comme substrat le p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside incolore, qui est hydrolysé sous l'action de l' α -glucosidase en glucose et p-nitrophenol de couleur jaune, cette réaction a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 400 nm. La présence des inhibiteurs de cette enzyme provoque l'inhibition de façon compétitive l'hydrolyse de substrat. La mesure de la réduction de la couleur jaune permet donc l'estimation de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase (Behvar Asghari et al., 2018).

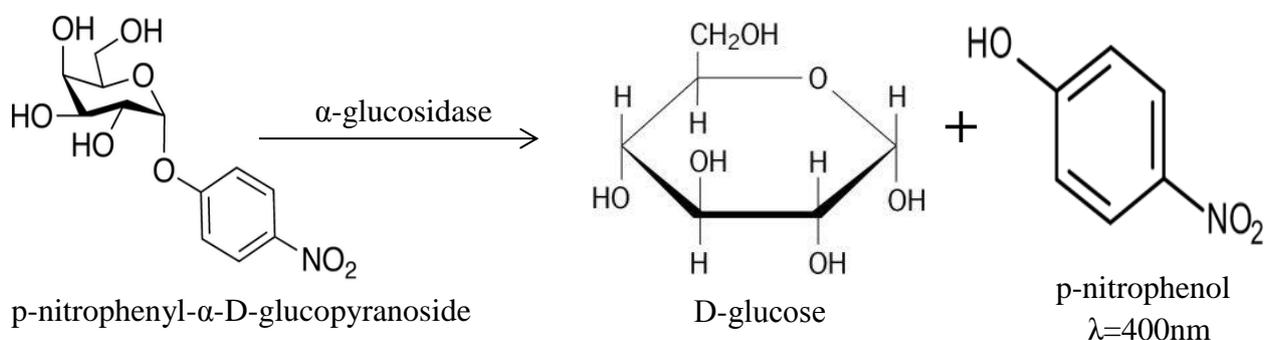


Figure I.35: Mécanisme d'hydrolyse du p-nitrophényl alpha-D-glucopyranoside par l' α - glucosidase selon la méthode de Behvar Asghari et al (2018).

III.3. L'activité antifongique

Les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus.

Le test de l'activité antifongique est basé sur la mesure de l'effet inhibitrice des antifongiques sur la croissance mycélienne d'agents phytopathogènes.

III.3.1. Les antifongiques

Ce sont substances capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

- Comment agissent les antifongiques ?

Un antifongique agira soit en s'attaquant directement à la paroi fongique, provoquant ainsi la mort de la cellule (action fongicide), soit en bloquant la division cellulaire, arrêtant ainsi la reproduction des champignons (action fongistatique).

III.3.2. Description de champignon étudié

Alternaria sp

Alternaria est un genre de champignons phytopatogène de la famille des Pleosporaceae communs qui se développe sous forme de filaments dans les sols, et sur différents organes de la plantes (**Laurence Dutron., 2012**). Elle produit des spores asexuées (reproduction Deutéromycètes). Ce genre comprend près de 275 espèces (**Simmons., 2007**) saprophytes ou parasites sur de nombreuses plantes (tomate, carotte...). Plusieurs espèces d'*Alternaria* sont capables de provoquer chez l'homme des affections épidermiques, des allergies respiratoires...etc et chez les végétaux des maladies regroupées sous le terme d'alternariose.



Figure I.36 : Champignon d'*Alternaria sp*



Matériels et Méthodes



Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Algérie Ainsi que le laboratoire de Biochimie et laboratoire de science fongique au sein du Centre de recherche en biotechnologie (CRBt).

I.1. Aperçu et but de travail

Le but de notre étude est de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans cette plante en vue de valoriser la flore algérienne qui reste jusqu'à présent très mystérieuse.

Après l'extraction des parties aériennes, l'extrait brut de *Centaurium sp* a été fractionné en utilisant la méthode d'extraction liquide-liquide par décantation, Ce fractionnement, suivie de plusieurs méthodes d'analyse phytochimiques ; la quantification totale des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les différents extraits et la détermination de la composition chimique des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD).

Notre étude a porté aussi sur l'identification et la caractérisation de la capacité antioxydante, l'évaluation in vitro de l'activité anti-diabétique et l'activité anti-Alzheimer de l'extrait méthanolique ainsi que des fractions provenant de cet extrait et enfin l'étude de l'effet inhibitrice des extraits sur le champignon phytopathogène *Alternaria sp*.

I.2. Matériel:

I.2.1. Matériel végétale

Notre étude est portée sur la plante du genre *Centaurium* : *Centaurium sp*



Figure II.1: la plante du genre *Centaurium*

I.2.1.1. Description de la zone de la récolte

El Ménéea est une commune de la wilaya de Ghardaïa en Algérie, située à 267 km au sud-ouest de Ghardaïa (Figure II.2). Cette région constitue une unité géographique importante grâce à ses fortes potentialités hydriques souterraines et l'étendue des superficies arables.



Figure II.2 : Localisation satellite de la zone de récolte de la plante du genre *Centaurium* (Google Maps., 2018).

I.2.1.2. Récolte de la plante du genre *Centaurium*

La plante étudiée a été soigneusement récoltée au mois de juillet 2018 de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de la plante : tiges, feuilles, fleurs.

I.2.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits:

Produit	formule brute
Acétate d'ammonium	ACNH ₄
Ethanol	C ₂ H ₆ O
Méthanol	CH ₃ OH
Ether de pétrole	CH ₃ -(CH ₂) _n -CH ₃
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂
Butanol	C ₄ H ₁₀ O
FCR (Folin-Ciocalteu réactif)	/
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃
1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)	/
Potassium acétate	(CH ₃ COOK)
Galvinoxyl	/
Ferric chloride	FeCl ₃
potassium ferricyanide	K ₃ Fe(CN) ₆
nitrate d'aluminium	Al(NO ₃) ₃
diméthyle sulfoxyde (DMSO)	C ₂ H ₆ OS
DTNB	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂

Appareillage

- Rotavapeur sous pression
- Bain ultrasonique
- Agitateur magnétique
- Micro pipette
- Balance de précision
- Vortex
- HPLC-DAD
- Lecteur de microplaque (Perkin Elmer, Enspire)
- Etuve
- Agitateur magnétique chauffant
- Autoclave
- Hotte

- Bec benzène

I.3. Méthode

I.3.1. méthodes d'extraction

I.3.1.1. Broyage

Les organes de plante sélectionnée, ont été broyés, à l'aide d'un mortier, pour obtenir une poudre fine qui a servi pour la préparation des extraits. Après broyage, la poudre de plante a été conservée dans des flacons en verre afin de garder leur couleur et principalement leur effet thérapeutique, elle a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu'à leur analyse.



Figure II.3 : Broyage des parties aériennes de la plante

I.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires par macération

1. Objectif

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules chimiques contenant dans la partie aérienne de plante *Centaurium sp*, en utilisant des solvants organiques sélectifs qui accélèrent et augmenter le rendement d'extraction.

2. Principe

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple, qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant sans ou avec agitation pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules. (Lagnika., 2005 ; Djabou., 2006).

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode suivante:

3. Protocol

Une quantité de 135 g de matériel végétal broyé est macérée dans 1050 mL de méthanol pure, sous agitation magnétique pendant 24 h à température ambiante. Le mélange n° 01 est récupéré après filtration sur tissu et papier filtre Whatman n°1 dans erlenmeyer. La macération est renouvelée deux fois sur le résidu récupéré pendant deux jours successifs avec renouvellement du solvant de même mesure chaque 24h, pour permettre la solubilisation maximum des métabolites secondaires. Les trois macéras filtrés sont réunis pour donner l'extrait méthanolique brut.

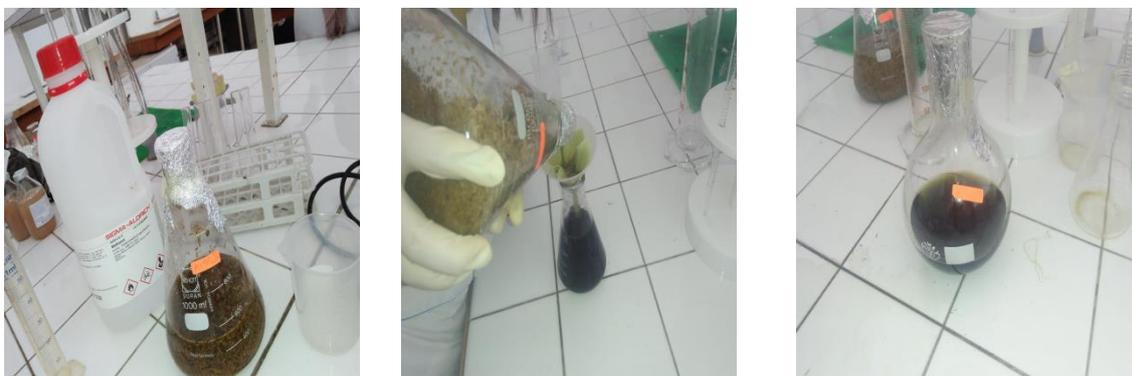


Figure II.4: Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante.

4. Évaporation

L'extrait méthanolique brut obtenu est évaporé à sec (concentré) sous pression réduite à 37°C par un évaporateur rotatif (Rotavapor) pour donner 64,17 g d'extrait brut sec.



Figure II.5 : Procédé de concentration de l'extrait (rotavapeur)

Une quantité de 2,35 g de l'extrait brut sec est récupérée dans une boîte de pétri puis conservé jusqu'à l'utilisation.

I.3.1.3. Préparation des extraits via la méthode d'extraction liquide-liquide par décantation

1. Objective

Cette étape permet d'extraire par des solvants d'extraction sélectives, de polarité croissante les différents composés présents dans l'extrait brut méthanolique.

2. Principe (Feknous et *al.*, 2014)

L'extraction liquide-liquide est parmi les méthodes les plus utilisées en analyse pour séparer par décantation deux phases liquides non-miscibles, elle repose sur le transfert d'un soluté en fonction de leur solubilité d'une phase liquide à une autre phase liquide non-miscible à la première. Les deux phases sont en général l'une aqueuse et l'autre organique dont les solvants organiques ont, en général, une densité inférieure à 1 et constituent alors la phase supérieure.

Le protocole de décantation a été effectué selon la méthode suivante :

3. Protocol

La quantité reste de résidu sec 61,82 g est traité par 300 mL d'eau distillée bouillante et laissée pendant 24 heures pour la solubilisation proportionnellement des composés phénoliques. Après filtration sur tissu et papier filtre whatmen n° 1 pour éliminer les substances non phénoliques (impuretés, graisses...etc) on obtient un extrait aqueux. Celui-ci est soumis à une série d'extraction sélective liquide-liquide dans l'ampoule à décanter par les solvants organiques suivants:

- La première extraction est réalisée avec l'éther de pétrole (3X100 mL) qui permet d'entraîner la chlorophylle, les graisses et les substances lipophiles.
- La deuxième extraction est réalisée avec l'acétate d'éthyle (3X100 mL) qui permet d'entraîner différentes composés moyennement polaires permis elles : les terpenoïdes, les acides phénoliques et la majorité des hétérosides flavoniques (les mono-glycosides et partiellement les di-glycosides).
- La troisième extraction est réalisée avec le butanol (3X100 mL) qui permet d'entraîner les flavonoïdes (le reste de di-glycoside et le tri-glycoside) et d'autre métabolites secondaires (les dérivés de l'acide benzoïque...etc) polaires.

Le fractionnement est réalisé pendant 30 minutes et l'opération est répétée trois fois. Les trois phases organiques de chaque extraction ont été réunies et à la fin on récupère la phase aqueuse qui contenait alors les composés phénoliques non soutirés et d'autres métabolites.



Figure II.6 : La décantation

4. Évaporation

Les trois extraits organiques obtenus de l'extraction liquide-liquide ainsi la phase aqueuse sont soumis à une évaporation à sec (concentré) sous pression réduite à 37 C° pour l'extrait d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle et à 55C° pour l'extrait butanolique et l'extrait aqueux résiduel.



Figure II.7 : Évaporation rotative des extraits

Donc quatre fractions sont à la fin récupérées : Fraction éther de pétrole (0,09g), fractions acétate d'éthyle (0,66g), fraction n-butanolique (9,51g) et fraction aqueuse résiduelle (8,58g). Les fractions ont été conservées à température ambiante jusqu'à utilisation.

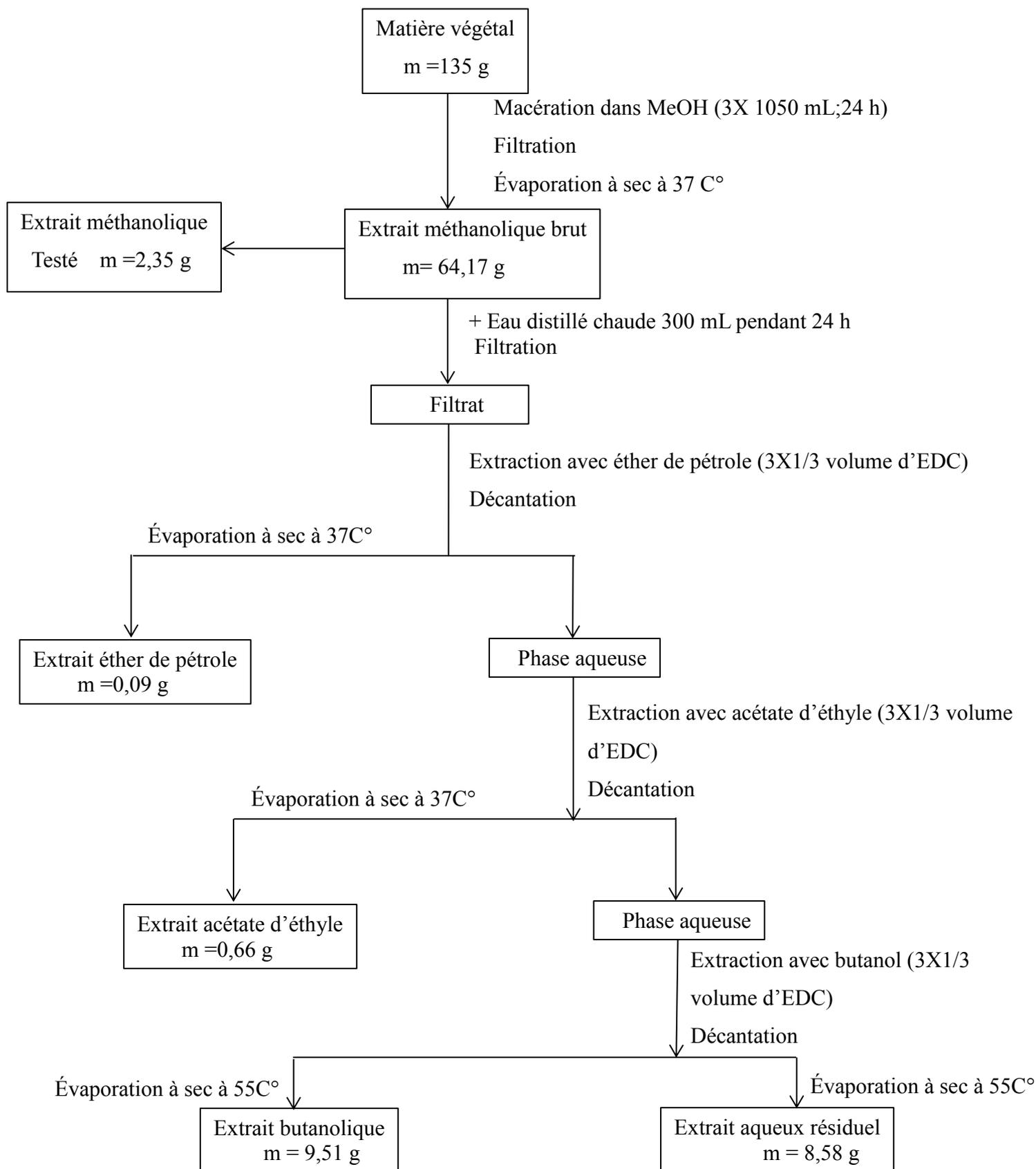


Figure II.8 : Protocole d'extraction de plante du genre *Centaurium*

I.3.2. Méthodes d'analyse phytochimique

I.3.2.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

I.3.2.1.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC)

1. Principe de la réaction :

L'estimation de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits de la plante *Centaurium sp* est déterminée selon une méthode de dosage colorimétrique sur microplaque décrite par (Muller et al., 2010).

Le réactif utilisé est Folin-Ciocalteu (FCR) (Singleton et Rossi., 1965), qui est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Ce dosage est basé sur la réduction de ce réactif dans un milieu alcalin lors de l'oxydation de l'ensemble des composés phénoliques en un mélange ayant une couleur bleu constitué d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède un maximum d'absorption aux environs de 750 -765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en polyphénols totaux présents dans l'échantillon.

2. Mode opératoire :

- **Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :**

Une quantité de 7,5 g de Na_2CO_3 est dissoute dans 100 mL d'eau distillée sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant.

- **Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1 mg de chaque extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de Méthanol puis met dans le bain à ultrason pour la dissolution complète.

- **Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois**

1mL de la solution FCR concentrée (2M) est complété à 10 mL avec l'eau distillée (9mL).

Dans les plaques de 96puits, 20 μ l de chaque extrait de la plante est mélangé avec 100 μ l de FCR dilué (1 /10) puis 75 μ l de la solution de carbonate de sodium sont additionnés au mélange. Un blanc est parallèlement préparé suivant les mêmes volumes tout en

remplaçant les 20 µl d'échantillon testé par le méthanol. Après 120 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 765 nm.

La détermination de la concentration des composés phénoliques totaux pour chaque extrait est faite à partir de l'équation de régression d'une courbe d'étalonnage standard dont une gamme d'étalonnage est déjà réalisée dans les mêmes conditions expérimentales et le même protocole que les extraits, en effet, par l'utilisation de l'acide gallique de différentes concentrations finales allant de 25 à 200 µg/mL à partir d'une solution mère 200 µg/mL. La teneur des composés phénoliques totaux des extraits est alors exprimée en équivalent de milligramme d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g MS).

Il faut noter que chaque dépôt est triplé aussi bien pour chaque extrait que pour le standard.

I.3.2.1.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC)

1- Principe de la réaction :

La détermination quantitative des flavonoïdes contenus dans les extraits de la plante *Centaurium sp* est effectuée suivant une méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Ordenez et al., 2006). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe très stable jaunâtre entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

2- Mode opératoire :

- **Préparation des solutions:**

Une masse de 9,80 g de Potassium acétate (CH_3COOK) (1M) est dissolvée dans 100 mL d'eau distillée sous agitation par un agitateur magnétique chauffant pour obtenir la solution S_1 .

Une quantité de 10 g de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3$) (10%) est dissoute dans 100 mL d'eau distillée sous agitation par un agitateur magnétique chauffant pour obtenir la solution S_2 .

- **Préparation de l'extrait de plante :**

Une masse de 1 mg de chaque extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol.

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Topçu et al., 2007) avec quelques modifications. Brièvement, un volume de 50 µl de chaque extrait ou de méthanol pour le témoin négative a été ajouté en triplicata dans des puits d'une microplaque à 96 unités, par la suite chaque puit reçoit 130 µl de méthanol, 10 µl de S₁ et 10 µl de S₂. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière l'absorbance est mesurée par un lecteur de microplaque à 415nm.

Les taux des flavonoïdes totaux pour chaque échantillon sont calculés à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage déjà réalisée dans les mêmes conditions opératoires et le même protocole que les extraits par l'utilisation d'un flavonoïde standard : la Quercetin à différentes concentrations finales comprises entre 25 et 200 µg/mL à partir d'une solution mère 200 µg/mL. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent de quercetine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

I.3.2.2. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD

L'analyse par la méthode de chromatographie liquide à haute performance avec un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) a pour but l'identification et la quantification du profil phénolique dans les cinq extraits du *Centaurium sp.*

Le protocole de HPLC –DAD a été effectué selon la méthode suivante :

Les analyses chromatographiques des composés phénoliques ont été effectuées avec un système Agilent Technologies 1260 Infinity constitué d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) G4212B, contrôlé par le logiciel de gestion des chromatographies Agilent Open Lab Control Panel. Les spectres UV ont été enregistrés dans la gamme 190-600 nm pour identifier les différentes classes de composés phénoliques. Les quantités des polyphénols dans les extraits ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage standard au maximum UV : les flavonoïdes, les composés hydroxycinnamiques et les hydroxybenzoïques, et ont été quantifiés comme suit; dérivés d'acide benzoïque en tant qu'équivalents d'acide gallique/ g de poids

d'extrait à 280 nm; hydroxycinnamates en équivalents acide caféique/ g de poids d'extrait à 325 nm; flavonols en équivalents de rutine/ g de poids d'extrait à 365 nm.

La colonne utilisée pour la séparation est Zorbax Eclipse Plus C18 en phase inverse (250mm*4.6 mm, 5 µm). La phase mobile se compose de solvant A (eau acidifié, pH 2,6) et solvant B (méthanol), elle est effectuée avec un gradient à un débit de 0,8 mL / min durant 60 min. Le volume d'injection est 20 µl pour chaque extrait (2 mg/ mL dans le méthanol) préalablement filtrés sur une membrane de 0,2µm à température ambiante.

I.3.2.3. Analyse physico-chimique par spectrophotométrie UV-visible

Un lecteur de microplaque à plusieurs mode de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader), des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique, anti-Alzheimer pour la lecture des absorbances.

I.4. Les activités biologiques

I.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans une partie de notre travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la teneur en composés phénoliques dans chaque extrait de *Centaurium sp* (HPLC). En tant que ces composés sont connus comme de bons composés antioxydants, il nous a paru intéressant d'estimer le potentiel antioxydant de l'extrait brut méthanolique ainsi que des quatre fractions issues de celui-ci.

La mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro des cinq extraits a été testée par sept essais qui diffèrent par leurs paramètres, c'est-à-dire, les mécanismes impliqués et / ou les cibles.

- L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH•
- L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS+•
- L'activité antiradicalaire pour le radicale libre Galvinoxyl
- Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC
- Le pouvoir réducteur de fer (Reducing Power)
- Métal chélate

- Activité de phénanthroline

Les résultats, ont été déterminée à partir de la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) qui est définit comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour piéger 50% de radicaux DPPH[•]/ ABTS^{•+}/ Galvinoxyl, sauf pour le dosage CUPRAC, Pouvoir réducteur et phénanthroline, ils ont été enregistrés à la concentration de l'échantillon testé pour laquelle l'absorbance est maximum. La valeur de CI_{50} valeurs exprimé en mg/mL de milieu réactionnel, est calculée graphiquement par la régression non linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits utilisées et elle est comparées à celles des standards.

CI_{50} est inversement proportionnel avec l'activité antioxydante de l'extrait testé dont le pouvoir antioxydant de chaque extrait est d'autant plus élevé que son CI_{50} est petit.

I.4.1.1. Test de piégeage du radical DPPH[•]

1- Principe de la réaction (rappel) :

Ce dosage consiste à mesurer la capacité d'un composé antioxydant à donner un atome d'hydrogène pour réduire le radical DPPH[•] en DPPH-H de couleur jaune.

2- Mode opératoire :

- **Préparation de la DPPH[•]** : Une masse de 6 mg de DPPH est dissoute dans 100 mL et laissée sous agitation durant 2 h à l'abri de la lumière pour obtenir le radical DPPH[•].
- **Préparation de l'extrait** : Une masse de 4mg de chaque extrait est dissoute dans 1 mL de méthanol à l'aide d'un bain à ultrason pour obtenir la solution mère (SM).

L'activité de piégeage radical des extraits par DPPH[•] à partir des parties aériennes de *Centaurium sp* a été mesurée selon la procédure décrit par (Blois., 1958). Brièvement, 40µl de chaque extrait à des concentrations décroissantes préparés à partir des dilutions en cascade (de 1/2 jusqu'à 1/64) de la SM est déposé en triplicata dans une microplaque à 96 puits, puis 160µl d'une solution méthanolique de DPPH[•] sont ajoutés de manière simultanée dans chaque

puit. En parallèle, un témoin négatif est préparé en mélangeant 40µL du méthanol avec 160µl d'une solution méthanolique de DPPH[•]. Suite à une incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min, la lecture des absorbances a été effectuée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Comme standard on a utilisé le BHA, BHT et α-Tocopherol.

L'activité anti-radicalaire des extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH[•] selon cette équation :

$$I (\%) = [(ADPPH^{\bullet} - A_{\text{Extrait}}) / ADPPH] \times 100$$

ADPPH: absorbance de la solution de DPPH[•] en absence de l'extrait (blanc)

AExtrait : absorbance de la solution de DPPH[•] en présence de l'extrait

I.4.1.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

1- Principe de la réaction (rappel) :

Ce dosage est basé sur la mesure de l'effet inhibiteur des agents présentes dans l'extrait sur le radical ABTS^{•+}, en lui donnant un atome d'hydrogène.

2- Mode opératoire :

- **Préparation de l'ABTS^{•+} :** Les deux solutions aqueuses l'ABTS (19,2 mg dans 5 mL H₂O) et le persulfate de potassium K₂S₂O₈ (3,3 mg dans 5 mL H₂O) sont mélangées et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H pour générer le radical ABTS^{•+}.
- **Préparation de l'extrait :** une quantité de 2 mg de chaque échantillon est dissolvée dans 1mL de méthanol à l'aide d'un bain à ultrason pour la dissolution complète.

Le protocole suivi pour cette activité est celui décrit par **(Re et al., 1999)** avec une manipulation réalisé dans microplaque de 96 puits. Pour cela, 160µl de solution ABTS^{•+} fraîchement préparée sont ajoutés à 40µl de différentes concentrations de chaque extrait (concentrations finales 6,25 à 400 µg/mL) préparé à partir des dilutions en cascade de la SM (pour chaque concentration le dépôt est répété 3 fois). Un blanc est parallèlement préparé, en mélangeant 40µL de méthanol avec 160µL de la solution ABTS^{•+}. L'absorbance est ensuite

lue par un lecteur de microplaque à 734 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Le BHA et le BHT ont utilisés comme standard.

Le pourcentage de réduction ou d'inhibition de ce radical est calculé suivant cette formule :

$$AA (\%) = [1 - (A_{\text{Extrait}} / A_{\text{blanc}})] \times 100$$

Où A_{Extrait} est l'absorbance de la solution $ABTS^{*+}$ en présence de l'extrait à une concentration donnée.

I.4.1.3. Test de piégeage du radical libre Galvinoxyl

1- Principe de la réaction (rappel) :

Le test de GOR consiste à mesurer la capacité d'un extrait contient des capteurs de RL donneurs d'hydrogène à réduire le radical Galvinoxyl en forme non radicalaire.

2- Mode opératoire :

- **Préparation de Galvinoxyl :** On dissolvé 4mg de ce radical dans 100mL de méthanol sous agitation par un agitateur magnétique.
- **Préparation de l'extrait :** les solutions mères des extraits à tester sont préparées dans le méthanol à une concentration initiale de 2mg/mL, puis diluées en cascade dans le méthanol pour obtenir une gamme de concentrations finales de 6,25 à 400 µg/mL.

Le protocole expérimental suivi pour cette activité est celui établie par (Shi *et al.*, 2001). Brièvement, 40µl de chaque concentration d'extraits est déposée dans 3 puits alignés de la microplaque, après cela un volume de 160µl de la solution galvinoxyl est ajouté. En même temps, un blanc est préparé, en remplaçant les 40µl de l'extrait par le méthanol. La plaque est incubée pendant 120 min à température ambiante et à l'obscurité, la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 428 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standard.

Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est déterminé par la formule suivante :

$$AA (\%) = [(A_{Galvinoxyl} - A_{Extrait}) / A_{Galvinoxyl}] \times 100$$

A_{Extrait} : l'absorbance de la solution Galvinoxyl en présence de l'extrait.

I.4.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique

1- Principe de la réaction (rappel) :

Cette méthode consiste à mesurer la capacité d'un composé présent dans l'extrait à donner un électron pour réduire le cuivre (II) de réactif oxydant CUPRAC en cuivre (I).

2- Mode opératoire :

- **Préparation des solutions:** On pèse une masse de 1,927 g d'acétate d'ammonium (ACNH₄), 0,04262g de dihydrate de chlorure cuivrique et 0.039g de Neocupronine, par la suite chaque une de ces masses est dissoute dans 25mL H₂O (pour ACNH₄ et (Cu Cl₂, 2H₂O)) et dans 25mL de méthanol pour Neocupronine.
- **Préparation de l'extrait:** Pour la préparation de la solution mère (1mg/mL), on prend 1 mg de chaque extrait et on le dissout dans 1 mL de Méthanol. Les dilutions sont préparées dans des eppendorf dans le but d'obtenir une gamme de concentrations finales allant de 3,125 à 200µg/mL.

L'activité antioxydante par réduction du cuivre a été examinée in vitro selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Apak *et al.*, 2004). Dans les plaques de 96puits, des solutions ont été ajoutées : 60µl de tampon AcNH₄ (pH =7), 50µl de Cu(II) de couleur bleu et 50µl de néocuproïne, à 40µl de chaque extrait à différentes concentrations ou de méthanol pour le témoin négatif. Les microplaques ont été placées à l'abri de la lumière et après une heure de temps, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm dont toutes les mesures pour chaque concentration d'extrait sont effectuées en triplicata.

La variation de l'activité réductrice étudiée en fonction de la concentration des extraits est comparée à celle des standards BHA et BHT.

I.4.1.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion ferrique

1- Principe de la réaction (rappel) :

Cette analyse est basée sur la mesure de la capacité d'un extrait à donner un électron pour réduire le fer ferrique Fe^{3+} en sels de fer ferreux.

2- Mode opératoire :

- **Préparation des solutions :** par la dissolution sous agitation de 1 g de potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) dans 100 mL H_2O , 1 g de acide tri-chloroacétique (TCA) dans 10 mL H_2O et 0,1 g de chlorure ferrique $FeCl_3$ dans 100 mL.
- **Préparation de l'extrait :** on obtient la solution mère de chaque extrait de la plante par la désagrégation de 4 mg dans 1 mL de méthanol sous agitation par vortex.

La réduction de l'ion ferrique est déterminée par la méthode de (**Oyaizu., 1986**) avec une légère modification. Le test s'effectue dans des microplaques UV 96 puits dont 10 μ l de chaque extrait à concentrations décroissantes (0.0625 à 4 mg/mL) est mélangé avec 40 μ l de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 μ l de $K_3Fe(CN)_6$. Le mélange obtenu est destiné à une incubation à l'étuve à 50°C. Après 20 minutes d'incubation, chaque puit reçoit 50 μ l de TCA, 40 μ l de H_2O , 10 μ l de $FeCl_3$ respectivement. La lecture des absorbances est faite à 700 nm, une lecture du blanc est effectuée avec tous les réactifs en absence du composé à tester.

L'activité réductrice des extraits est comparée à celle de témoins positifs qui sont l'acide ascorbique, l' α -Tocophérol et l'acide tannique.

I.4.1.6. Test de la capacité antioxydante par chélation des ions ferreux

1- Principe de la réaction (rappel) :

Dans ce test les extraits ont été évalués pour leur capacité à concurrencer avec la ferrozine pour les ions de fer (II) en solution libre.

2- Mode opératoire

- **Préparations des solutions :**

4 mg de FeCl₂ est dissoute dans 100 mL d'eau distillée sous agitation.

0, 5 mL de la solution de Ferrozine est complété à 10 mL avec l'eau distillée (9 mL).

- **Préparation de l'extrait :**

Chaque échantillon est fondu directement dans le méthanol, à une concentration de 4mg/mL puis diluées à différentes concentrations dans le méthanol (une gamme de concentrations finales de 12,5 à 800 µg/mL).

La capacité chélatrice des ions Fe⁺² par les extraits de la plante est estimée en utilisant la Ferrozine (**Dinis et al., 1999**). Brièvement, un volume de 40 µl des solutions méthanolique des extraits à différentes concentrations est additionné à 40 µL MeOH, 40 µl Fe⁺² et 80µl ferrozine. Dans ce dosage le blanc est le mélange de 80 µl MeOH, 40 µl Fe⁺² et 80µl ferrozine. Après 10 min d'incubation à l'obscurité pour permettre la complexation du fer résiduel, l'absorbance du complexe [Fe²⁺- ferrozine] de couleur violette est mesurée à 562nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. On utilise EDTA comme chélateur standard.

Il faut noter que pour chaque concentration d'extrait le dépôt est répété 3 fois.

L'effet de l'alkylation des ions de fer est évalué par l'équation suivante :

$$\text{Fe}^{2+} \text{ effet chélatant (\%)} = [(A_S - A_C) / A_S] \times 100$$

Dont A_S est l'absorbance du contrôle négatif, A_C absorbance des solutions d'extrait

I.4.1.7. Activité phénanthroline

1- Principe de la réaction (rappel) :

Cette méthode est basée sur la formation de ferroïne par la réduction de Fe⁺³ (FeCl₃) en Fe⁺² en présence d'un composé donneur d'électrons dans l'échantillon.

b- Mode opératoire :

- **Préparation des solutions :**

Phénanthroline : Une masse de 0.05g de 1,10-Phénanthroline est dissoute sous agitation dans 10mL de MeOH.

Chlorure ferrique (FeCl₃): Une masse de 0.02g de FeCl₃ est dissoute sous agitation dans 10mL de H₂O.

- **Préparation de l'extrait :**

Pour obtenir les solutions filles finales à partir de la solution mère, on pèse une quantité de 4g de chaque échantillon et on le dissout dans 1mL de méthanol. Par la suite, on fait six dilutions dans des eppendorf pour chaque échantillon.

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode (**Szydłowska-Czerniaka., 2008**). Dans des microplaques 96 puits, 10µl des différentes concentrations en extrait méthanolique, éther de pétrole, acétate d'éthyle, *n*-Butanolique et aqueux résiduelle sont ajoutés au mélange réactionnel qui contient : 50 µl de FeCl₃, 30 µl de Phénanthroline suivi par 110µl de MeOH. Un témoin négatif sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. L'enregistrement des absorbances est effectué à une longueur d'onde de 510 nm après une incubation dans l'étuve à 30°C pendant 20 min. Le BHT et BHA sont utilisés comme contrôle positif pour la comparaison avec l'activité de phénanthroline des extraits obtenus.

I.4.2. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer

I.4.2.1. Test anti- acétylcholinestérase et anti- butyrylcholinestérase (in vitro)

1- Principe de la réaction (rappel) :

Dans cette étude, l'activité anti- Alzheimer d'un échantillon réside dans sa capacité à inhiber pour l'activité anti-acétylcholinestérase la dégradation de l'acétylthiocholine iodide par l'inhibition de la fonction de l'enzyme acétylcholinestérase et pour l'activité anti-butyrylcholinestérase l'hydrolyse de la butrylcholine par l'inhibition de l'activité de l'enzyme butyrylcholinestérase.

2- Mode opératoire :

- **Préparation de la solution tampon :**

On mélange un volume V1 de (Na₂HPO₄, 2H₂O) (8,890 g dans 500 mL de H₂O) avec un volume V2 de (NaH₂PO₄, 2H₂O) (1,56 g dans 100 mL H₂O) et on ajoute le NaOH pour augmenter la valeur de PH (PH= 5.8 à 8).

- **Préparation de la solution DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)):**

On ajoute à 16 mg DTNB: 1 mL de tampon (PH=7), 7,5 mg de NaHCO₃, 3 mL de tampon (PH=7) et 4 mL (PH=8).

- **Préparation des solutions de substrates:** par la dissolution de 16 mg de l'acétylthiocholine iodide (ACI)/ 4 mg de butyrylthiocholine iodide (BuCI) dans 4 mL d'eau distillée puis on ajoute 4 mL de solution tampon (PH =8).

- **Préparation des solutions d'enzymes:** une masse de 0,2 mg AChE/BChE est dissolvée dans 4 mL de solution tampon pour AChE et 1 mL pour BChE (PH=8) pour donner la solution A, puis on prend 20 µl de cette solution et on ajoute 3 mL de tampon (PH = 8) pour AChE et 2 mL pour BChE.

- **Préparation de l'extrait :** 4 mg de chaque échantillon est fondu dans 1 mL MeOH.

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) des extraits de *Centaureum sp* a été déterminée par une méthode spectrophotométrique décrite par (Ellman et al., 1961) avec une légère modification. Brièvement, 150 µl de la solution tampon phosphate de sodium (pH=8,0), 10 µl d'une solution d'échantillon à différentes concentrations (0.0625 à 4 mg/mL) et un volume de 20 µl de la solution enzymatique l'AChE ou BChE ont été mélangés et incubés pendant 15 min dans l'étuve à 25C° puis 10 µl de DTNB ont été ajoutés. La réaction est commencée par l'addition de 10 µl d'acétylthiocholine iodide ou le chlorure de butyrylthiocholine. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 412 nm avec un lecteur de microplaque 96 puits à 0 mn et à 15 mn. L'expérience a été réalisée en triple. La galantamine a été utilisé comme composé de référence.

Le pourcentage d'inhibition d'AChE ou BChE a été déterminé par rapport au blanc (le mélange réactionnel sans échantillon) par la formule suivante :

$$I (\%) = (E - S)/E * 100$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait d'essai / **S** : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

I.4.3. Evaluation de l'activité anti- diabétique

I.4.3.1. Test d'inhibition de l' α -glucosidase (in vitro)

1- Principe de la réaction (rappel) :

Dans ce test l'activité antidiabétique d'un extrait consiste à avoir une indication sur sa capacité à inhiber l'hydrolyse de p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) par l'inhibition de l'activité de l'enzyme l' α -glucosidase.

2- Mode opératoire :

Préparation de Tampon et des réactifs :

- Tampon sodium phosphate 100 mM (pH 6,9).
- Solution d'enzyme (0.1U/mL) : 1 mg d'enzyme alpha-glucosidase est mise en suspension dans 10 mL de tampon phosphate et aliquoter chaque 1 mL dans un Eppendorf.
- Solution de substrat (5 mM) : 15.06 mg est dissoute dans 10 mL de tampon phosphate.

Le test a été effectué dans des microplaques en utilisant le pNPG comme substrat selon (**Behvar Asghari et al., 2018**) avec une légère modification. La solution enzymatique (100 μ l/ puits) est ajoutée à la solution de l'extrait (50 μ l/puits) dissout dans le méthanol (12,5-800 μ g /mL, concentration finales). Après 15 min d'incubation dans l'étuve à 37 ° C, on a ajouté 50 μ L / puits de la solution de substrat pNPG et la plaque est incubée par la suite à 37 ° C pendant 30 min. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 405 nm par un lecteur de microplaque. On utilise l'acarbose comme un témoin positif.

Le pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs de l'extrait} - \text{Abs de Blanc}) / \text{Abs de Blanc}] \times 100$$

AExtrait : Enzyme + Substrat + Extrait.

ABlanc : Substrat + Enzyme.

I.4.4. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm déviation standard (SD). Les valeurs de CI_{50} , les représentations graphiques ont été réalisées par Excel. Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante/antidiabétique/anti-Alzheimer des extraits est grande.

I.4.5. Evaluation de l'activité antifongique

Le protocole suivi pour cette activité est celui décrit par **(Dennis et webstert., 1971)**.

I.4.5.1. Stérilisation du matériel et milieu de culture

Le matériel utilisé erlenmeyer et le milieu de culture ont été stérilisés à autoclave à 121°C pendant 20min

I.4.5.2. Préparation de milieu de cultures

Le milieu préparé est PDA (gélose dextrosée à la pomme de terre).

L'infusion de pomme de terre se prépare à partir de bouillage 140g de pommes de terre pelées, lavées et tranchées dans l'eau distillée pendant 20 min à 400°C. L'infusion est filtrée par tissu, puis en ajoutant 14g de glucose et 14g d'agar en poudre et en agitant avec agitateur magnétique à 400 tours/min, ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final de 700 mL (pour chaque préparation).

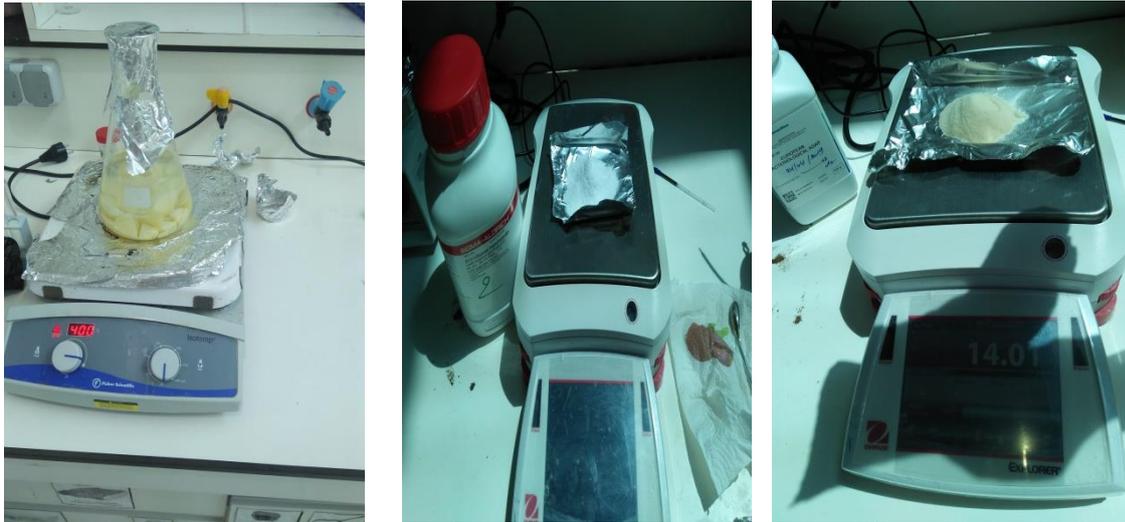


Figure II.9 : Préparation milieu de culture (PDA)

I.4.5.3. Préparation des extraits à différentes concentration

Utilisation de quatre extraits (méthanolique, acétate d'éthyle, n-butanolique, aqueux résiduelle).

Une quantité de 1, 2, 4, 8,16 mg de chaque extrait est fondu dans 1mL de DMSO. Les extraits sont préparés dans des tubes Eppendorf de 1 mL.

Un volume de 1mL de solution de DMSO a été ajouté à 100mL de milieu PDA à 60°C, préalablement stérilisé puis distribué dans 4 boites de pétri.

Le contrôle positif contient 100mL de milieu PDA et 1mL de DMSO. Le contrôle négatif ne contient que le milieu PDA (Song et al., 2004) et le milieu de culture contient le PDA et 1 mL de chaque extrait testé à différentes concentrations. L'expérience est répliquée 4 fois pour chaque traitement. La mise en culture d'*Alternaria sp* fait par repiquage d'un fragment d'*Alternaria sp* au centre des boites de pétri. Les boites ont été laissés à incuber à 28°C pendant 6j. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque moisissure, par rapport au contrôle selon la formule (Leroux et credet., 1978).

$$\text{PI (\%)} = (\text{D-d}) / \text{D} * 100$$

D : diamètre de contrôle positif

d: diamètre de la colonne traité



Figure II.10 : Les différentes étapes de l'activité antifongique
(Préparation des boites, Préparation des disques, Dépôt de souche)



Résultats et Discussion



I.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des métabolites secondaires dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est calculé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre (Abe *et al.*, 2010). Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la masse de matière sèche selon la formule suivante :

$$R (\%) = [M1/ M0] \times 100$$

R % : Rendement des extraits exprimée en g /100g de matière sèche

M1 : la masse de l'extrait récupérée exprimée en g

M0 : la masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g

Dans cette étude, le rendement a été déterminé par rapport à une masse de 135 g (M0) des parties aériennes de la plante du genre *Centaurium*.

Tableau III.1 : Les rendements d'extraction par la solution méthanolique et du fractionnement par les solvants organiques

Type d'extraction	Les extraits	Rendements (%)	Couleur/Aspects
Solide –liquide	Extrait brut MeOH	47,53	Vert foncé/ visqueux
Liquide-liquide	Ether de pétrole	0,06	Vert claire/ poudre
	Acétate d'éthyle	0,48	Marron foncée Visqueux
	n-butanolique	7,04	
	Aqueux résiduel	6,35	

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut résultent de l'extraction liquide–liquide par décantation, la fraction n-butanolique représente le rendement le plus élevé 7,04%, suivi par la fraction aqueuse résiduelle 6,35%, puis la fraction acétate d'éthyle avec un rendement de 0,48 %, alors que la phase organique éther de pétrole a entraîné de faible quantité de molécules végétales et cela pour un rendement de 0,06 %. Pour le procédé de macération avec le méthanol pure ; il nous a permis d'extraire le maximum de composés naturelles à partir de 135 g (M0) ce qui donne un rendement plus important à l'ordre de 47,53%.

Cette différence des valeurs de rendement peut être liée à le type (la polarité) du solvant utilisé dans l'extraction, puisque la polarité des solvants utilisés est influencée la solubilité différentielle des différents composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires contenus dans l'extrait méthanolique et ses fractions (**Garciasalas et al., 2010**). Mais il y a également d'autres paramètres peuvent attribuer cette différence telle que : le pH et la température du milieu, le temps d'extraction (qui est dans notre cas très longue dans la méthode de macération (72h) para rapport à la méthode de décantation)...etc (**Quy Diem Do et al., 2014**).

D'après ces résultats, On observe que les meilleures rendements d'extraction ont été obtenus avec l'utilisation des solvants polaires donc on peut conclure que notre plante d'étude contient beaucoup plus des métabolites secondaires (les polyphénols, les flavonoïdes...ect) polaires qu'apolaires, ceci peut être confirmé par des dosages ultérieurs.

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont significativement supérieure à ceux rapporté par (**Ferhat et al., 2009**), qui ont trouvé à partir de la méthode d'extraction solide-liquide réalisée par macération des parties aériennes de *Centaurea microcarpa* Coss et Dur avec le méthanol (50%) et le méthanol pur (99%) un rendement d'extraction faible de l'ordre de 14.33% et 9.804%, respectivement. Egalement notre fraction d'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse résiduelle a donné un rendement d'extraction presque 2 et 2.5 fois supérieure à celle trouvé pour la fraction acétate et aqueuse résiduelle des parties aériennes de cette espèce, donc notre plante est riche en métabolites secondaires justifiés par les rendements d'extraction obtenus.

De même, (**Olennikov et al., 2015**) ont trouvé à partir de la méthode d'extraction décoction réalisée par dissolution des parties aériennes de quatre espèces de la famille Gentianacea, qu'elles ont dans l'eau bouillant un rendement d'extraction différent à notre extrait brut *algalida*.G 27,2% ,*decumbens* G.22,4%, *macrophylla* G26,3%., *G. triflora* 34,5%. Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec celle de (**Olennikov et al., 2015**) car la méthode, les solvants et les conditions d'extraction sont différents.

I.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

I.2.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC)

L'étude quantitative de l'extrait brut et ainsi que des quatre fractions, préparés à partir des parties aériennes de *Centaurium sp*, au moyen du dosage spectrophotométrique avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus employées conçues pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les nourritures (**Abdel-Hameed., 2009**). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (**Maisuthisakul et al., 2008**).

Le contenu phénolique total des extraits est déterminé à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 3,8477x$) (Annexe1). Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g MS) (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait brut et ses fractions dérivées

Extraits	Polyphénols totaux (mg GAE/ g MS)
Extrait brut méthanolique	68,14±1,33
Ether de pétrole	47,04±0,15
Acétate d'éthyle	81,51±0,30
n-butanol	78,65±0,45
Aqueux résiduel	40,36±1,77

Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions ± SD.

Le changement de la couleur observé de jaune en bleu est proportionnel à la teneur en polyphénols totaux présents dans les extraits végétaux.

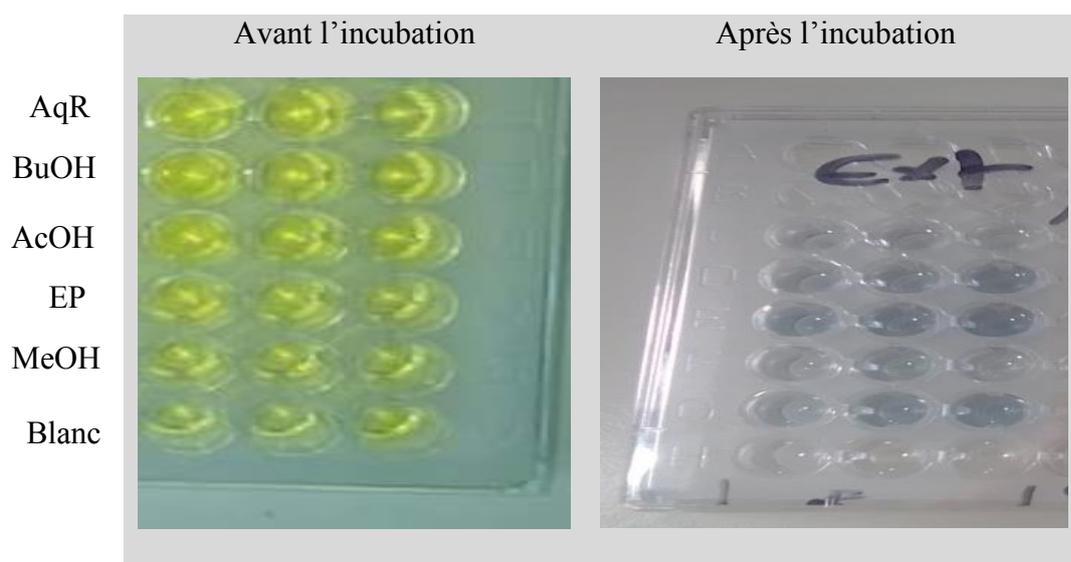


Figure III.1: Photos prises lors du dosage de polyphénols totaux

D'après les résultats obtenus (Tableau III.2), nous avons remarqués qu'il y a une variabilité dans la teneur des polyphénols totaux dans nos différents extraits des parties aériennes de la plante étudiée dont cette variabilité est montrée clairement que une grande partie des composés phénoliques présents dans l'extrait brut est épuisée par les solvants organiques au cours du fractionnement et réparties dans la fraction acétate d'éthyle qui présente la teneur de polyphénols la plus élevée de $81,51 \pm 0,30$ mg EAG/g MS et dans la fraction n- butanolique avec un taux important de $78,65 \pm 0,45$ mg EAG/g MS. Des teneurs aussi appréciables sont révélés dans les fractions éther de pétrole et aqueuse résiduelle $47,04 \pm 0,15$ mg EAG/g MS et $40,36 \pm 1,77$ mg EAG/g MS, respectivement.

I.2.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC)

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 2000 publications annuelles contenant « flavonoïdes » comme mot clé (Havsteen., 2002 ; Middleton., 2000).

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits a été déterminée par la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), en utilisant comme standard la quercétine.

Chapitre III: Résultats et Discussion

Le contenu en flavonoïdes est calculé à partir de l'équation de régression linéaire obtenue par une courbe d'étalonnage tracée de quercétine ($y = 4,5336 x$) (Annexe2). Les résultats obtenus sont rapportés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) (Tableau III.3).

Tableau III.3 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans l'extrait brut et ses fractions dérivées

Extraits	Flavonoïdes totaux (mg EQ/ g MS)
Extrait brut méthanolique	37,71±1,33
Ether de pétrole	30,99±1,34
Acétate d'éthyle	58,01±1,55
n-butanol	49,88±0,46
Aqueux résiduel	17,64±0,38

Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions \pm SD.

La coloration jaunâtre produite est proportionnelle à la quantité totale des flavonoïdes présentes dans les extraits de la plante étudiée.

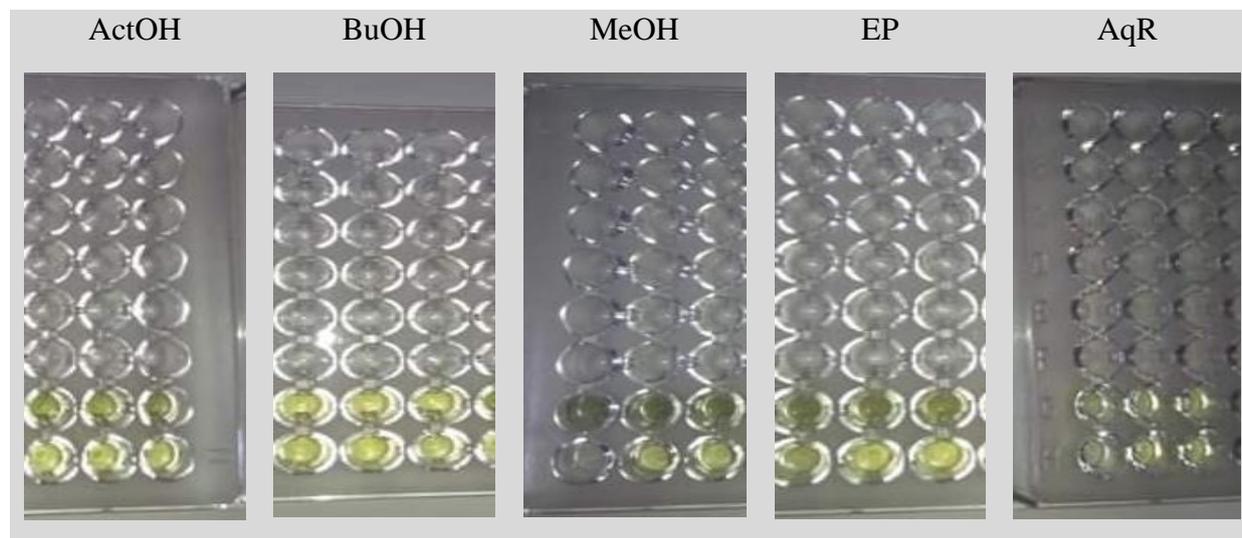


Figure III.2: Photos prises lors du dosage de flavonoïdes totaux.

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes révèlent que la teneur la plus élevée est enregistrée pour l'extrait acétate d'éthyle ($58,01 \pm 1,55$ mg EQ/ g MS), suivit par l'extrait

Chapitre III: Résultats et Discussion

n-butanolique ($49,88 \pm 0,46$ mg EQ/ g MS). Des teneurs considérables des flavonoïdes totaux sont observés dans les deux extraits méthanol et éther de pétrole ($37,71 \pm 1,33$ mg EQ/g MS et $30,99 \pm 1,34$ mg EQ/g MS, respectivement). L'exception est soulevée uniquement avec la fraction aqueuse résiduelle qui enregistre une faible teneur en flavonoïdes ne dépassant pas $17,64 \pm 0,38$ mg EQ/g de matière sèche.

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, dont certaines classes sont solubles dans les solvants polaires tandis que d'autres (les flavonoïdes aglycones) sont solubles dans des solvants apolaires (Makris *et al.*, 2006).

En tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement on peut dire que *Centaurium sp* est riche en flavonoïdes polaires qu'apolaires.

D'après nos résultats (Tableau III.2 et 3), le classement de TPC et TFC dans ces extraits est comme suit : acétate d'éthyle > n-butanol > méthanol > éther de pétrole > aqueux résiduel.

Dû au plus faible TPC et TFC récupérés dans les fractions PE et AqR par rapport aux autres extraits, les résultats ont indiqué que les composés phénoliques des parties aériennes de *Centaurium sp* pourraient être enrichis dans les fractions n-butanolique et acétate d'éthyle donc ces extraits peuvent être également considérés comme les plus antioxydants (Beddou., 2015).

Les teneurs en polyphénols totaux rapportés par (Bentahar., 2017), pour l'espèce *Centaurium erythraea L* (*Centaurium*) testée sous forme d'extrait aqueux (décoction et infusion), sont inférieures à ceux obtenus avec les extraits méthanol, butanol et acétate d'éthyle ($49,62 \pm 0,27$ mg EAG/g MS et $60,04 \pm 0,26$ mg EAG/g MS, respectivement), tandis que l'extrait aqueux (décoction) de cette espèce reste le plus riche en polyphénols totaux que notre fractions éther de pétrole et aqueuse résiduelle. Pour les résultats des teneurs en flavonoïdes totaux de *Centaurium erythraea L*. réalisés dans la même étude, ils ont montré que les extraits aqueux des parties aériennes de cette espèce sont pauvres en flavonoïdes ($0,2086 \pm 0,0025$ mg EQ/g MS et $0,1599 \pm 0,0010$ mg EQ/g MS, respectivement).

Nos valeurs pour le dosage phénoliques et flavonoïdes totaux sont beaucoup plus élevées que celles trouvées par (Carbonel Villanueva., 2017) pour l'extrait aqueux de l'espèce

Chapitre III: Résultats et Discussion

Gentianella nitida (Gentianaceae), qui sont de l'ordre de 65,8 µg EAG/g MS et 11,7µg EQ/g MS, respectivement.

En effet la teneur en polyphénols n'est pas stable, elle diffère d'une plante à une autre et entre les organes de la même plante. Des études ont montré que la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (les facteurs climatiques et environnementaux), la période de récolte et les conditions de stockage. Ainsi, la méthode d'extraction et de quantification des composés d'intérêt biologiques, et aussi la sélectivité du solvant utilisé (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsedek., 2007).

I.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC-DAD

Pour la quantification du profil phénolique dans les cinq extraits du *Centaurium sp* une analyse par HPLC a été réalisée, en utilisant un détecteur à matrice de diodes (DAD). Les chromatogrammes représentatifs sont représentés sur la Figure III.3 et l'analyse qualitative et quantitative de chaque extrait est présentée dans le tableau III.4

Tableau III.4 : Les concentrations de composés phénoliques des extraits de *Centaurium sp* détectés par HPLC-DAD

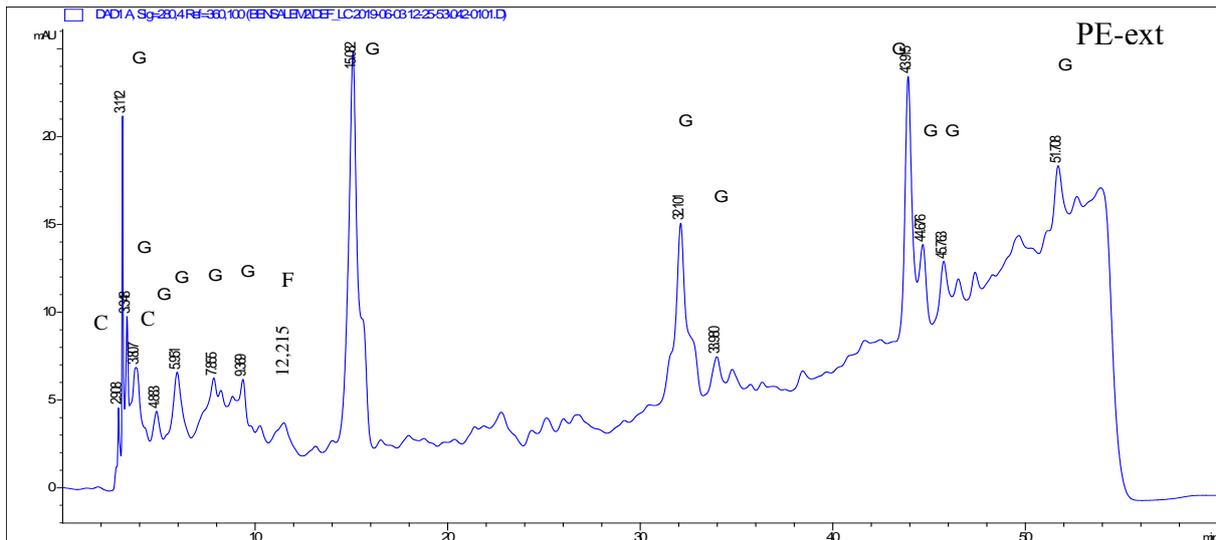
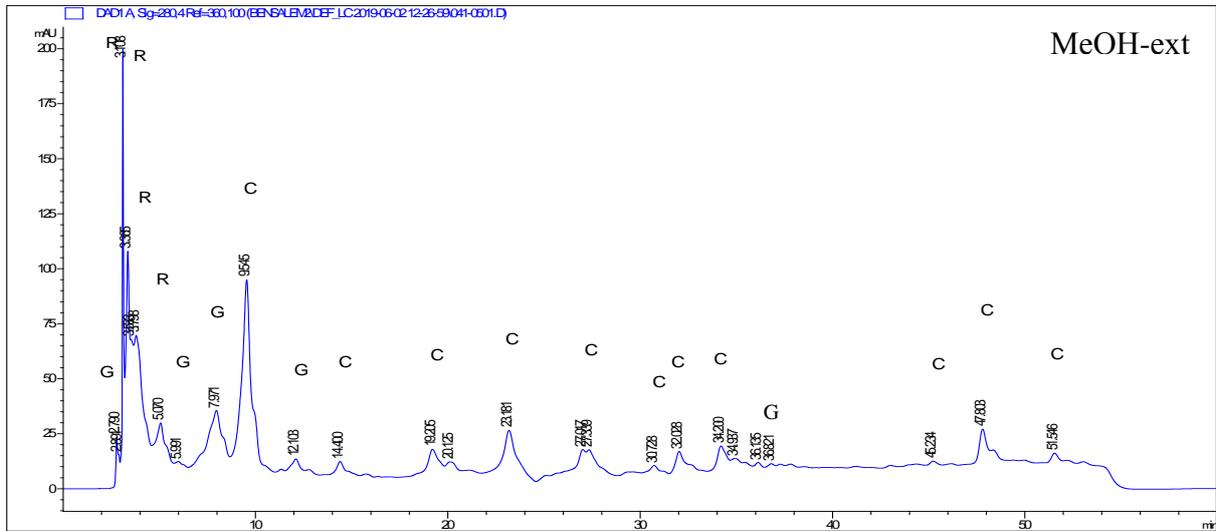
Extraits	Principaux composés phénoliques		
	Dérivés hydroxycinnamique (mg CAE/g)	flavonoïdes (mg RUE/g)	Dérivés hydroxybenzoïque (mg GAE / g)
Méthanolique	19,81	42,73	0,17
Ether de pétrole	Nd	Nd	3,40
Acétate d'éthyle	59,45	482,31	42,53
n-butanolique	39,63	109,05	115,68
Aqueux résiduel	Nd	88,89	3,23

Les valeurs sont exprimées par gramme d'extrait.

GAE : équivalents d'acide gallique, RUE : équivalents de rutine, CAE : équivalents d'acide caféique.

Chapitre III: Résultats et Discussion

nd: non-déecté.



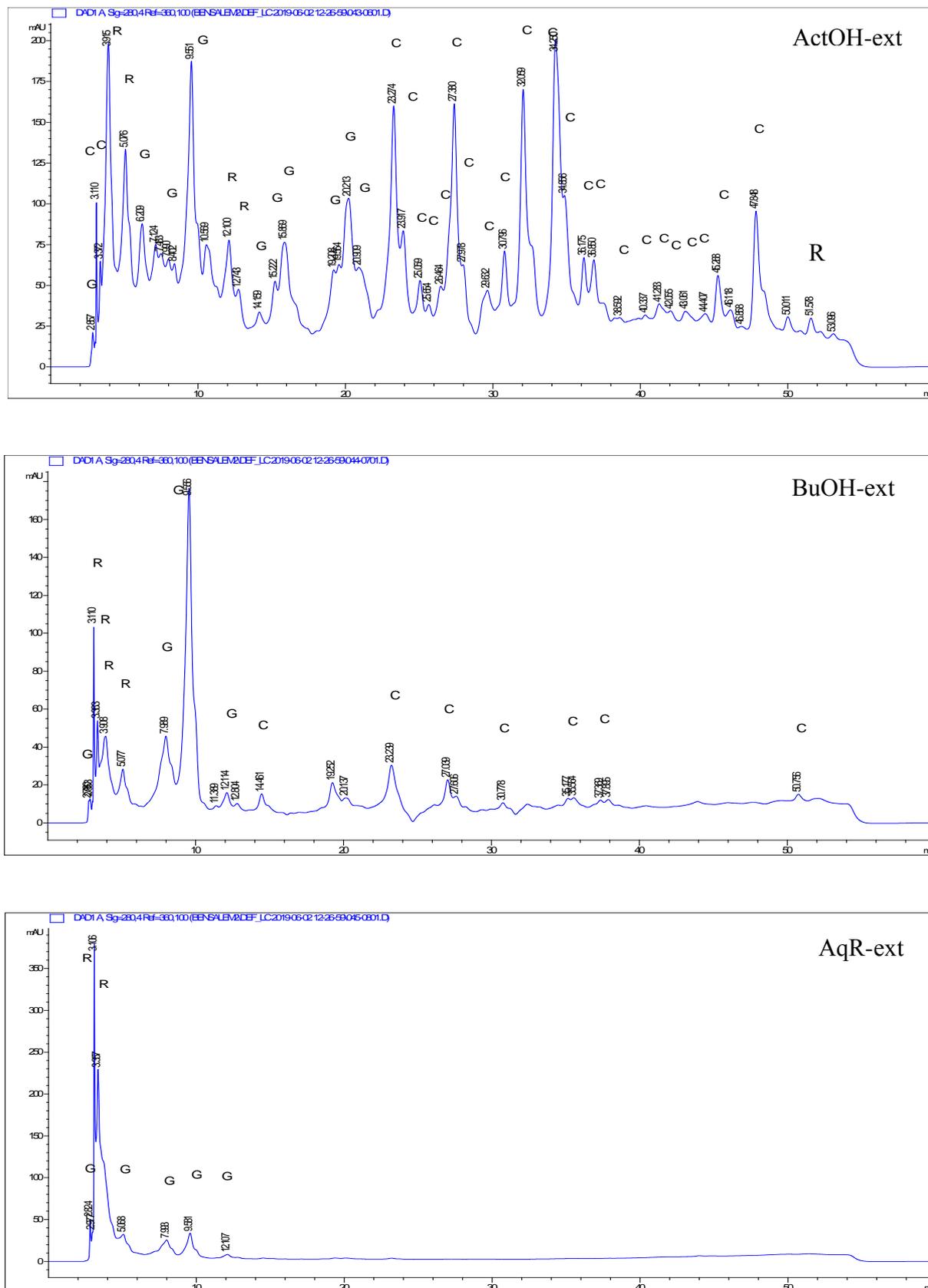


Figure III.3: Chromatogrammes HPLC-DAD des composés phénoliques de *Centaurium sp* détectés à 280 nm dans divers extraits.

Chapitre III: Résultats et Discussion

MeOH-ext, extrait méthanolique ; PE-ext, extrait éther de pétrole; ActOH-ext, extrait acétate d'éthyle ; *n*-BuOH-ext, extrait *n*-butanolique ; AqR-ext, extrait aqueux résiduel; G, dérivés de l'acide hydroxybenzoïque; C, dérivés de l'acide hydroxycinnamique ; R, dérivés de flavonoïdes.

L'observation des profils chromatographiques de l'extrait méthanolique brut et les quatre fractions de l'espèce du genre *Centaurium* par HPLC-DAD, montre la richesse des parties aériennes de cette espèce en composés phénoliques qui ont une bonne absorption à 280 nm. La comparaison des chromatogrammes des deux extraits *n*-butanol et méthanolique montrée que ces deux extraits présentent des profils HPLC-DAD identiques qualitativement mais différents quantitativement.

Les chromatogrammes montrent également 2 séries de composés :

- Les composés polaires qui arrivent en premier lieu de 1 à 24 min.
- Les composés apolaires qui sortent en dernier de 32 à 58 min.

Les dérivés hydroxycinnamiques et flavonoïdes, qui sont présents en quantités significatives dans les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol avec une gamme de composés tout à fait différents (figure III.3), ont encore été trouvés avec des rendements appréciables dans l'extrait méthanolique, alors qu'ils ont été non mesurés dans l'extrait d'éther de pétrole dont ils sont récupérés en faibles quantités. Pour l'extrait d'aqueux résiduel, il contient une grande quantité des flavonoïdes de type flavonol tandis que, les dérivés hydroxycinnamiques ont été non détectés. Selon leur polarité plus élevée, les dérivés hydroxybenzoïques sont apparus en tant que constituants mineurs dans les extraits d'éther de pétrole, aqueux résiduel et méthanolique respectivement. Cependant, ils ont présents en quantités intéressantes dans l'extrait acétate d'éthyle et surtout dans l'extrait *n*-butanol.

Les trois classes de composés phénoliques ont été facilement identifiées par comparaison avec les temps de rétention (*t*R) de chaque pic et les spectres UV des standards d'acides gallique (*t*R = 4,316min) et caféique (*t*R = 11,151min), et de rutine (*t*R = 25,606) aux longueurs d'onde d'absorption maximales de 280, 325 et 360 nm, respectivement. Ces composés sont connus par leurs multiples activités biologiques et sont donc responsables dans la plupart des cas de toutes les propriétés médicinales de cette espèce.

En interrogeant les différentes bases de données bibliographiques, nous n'avons pas trouvé des articles qui ont étudié les parties aériennes des plantes de la famille Gentinacea à l'exception de l'analyse par la méthode HPLC-DAD, en plus nous n'avons pas trouvé des articles qui ont fait une identification et quantification des composés phénoliques comme notre étude, dont la plus part des articles trouvés, les auteurs ont réalisé une analyse par HPLC-UV/MS...etc, des métabolites secondaires (xanthones, secoiridoides...), sauf une étude phytochimique sur la *Centaurium erythraea* par HPLC-DAD qui révéla la présence des composés phénoliques, comme les acides phénoliques et leurs dérivés, en tant que constituants principaux, mais sans quantification (Valentao et al., 2001).

I.4. Evaluation des activités biologiques

I.4.1. Evaluation du potentiel antioxydant

Dans le présent travail, sept méthodes colorimétriques ont été mises au point pour déterminer in vitro l'activité antioxydante des extraits de la plante du genre *Centaurium*, dont la combinaison de ces techniques complémentaires basées sur trois mécanismes d'action ; un effet scavenger : c'est-à-dire les tests mesurant le transfert d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter (DPPH[•], ABTS^{•+}, Galvinoxyl), une activité réductrice du fer (pouvoir réducteur, activité phénanthroline), du cuivre (CUPRAC) et une capacité de formation des complexes avec les métaux (métal chélate) , serait idéale pour une évaluation efficace, global et complète du pouvoir antioxydant de chaque extrait car le résultat d'une seule méthode ne suffit pas pour évaluer cette activité (Huang et al., 2005 ; Prior et al., 2005).

La complexité chimique de l'extrait, la nature, le type des composants phytochimiques et la polarité du solvant d'extraction est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi dépendantes de la teneur de la molécule ou l'ensemble des molécules biologiquement actives.

Nous présentons ci-dessous, les résultats des différentes activités antioxydantes de l'extrait brut ainsi que des quatre fractions provenant de celui-ci.

III.4.1.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH'

Ce test a pour but d'estimer le potentiel antioxydant des extraits vis-à-vis du radical libre, stable DPPH' dissous dans une solution méthanolique, en suivant la réduction de ce radical à l'aide d'un lecteur des microplaques à 517 nm. Les résultats de l'absorbances obtenus pour les cinq extraits testés ont permis de tracer les courbes de pourcentage d'inhibition de chaque extrait en fonction de leurs concentrations (Figure III.4).

Les pourcentages d'inhibition sont calculés en utilisant la formule donnée auparavant.

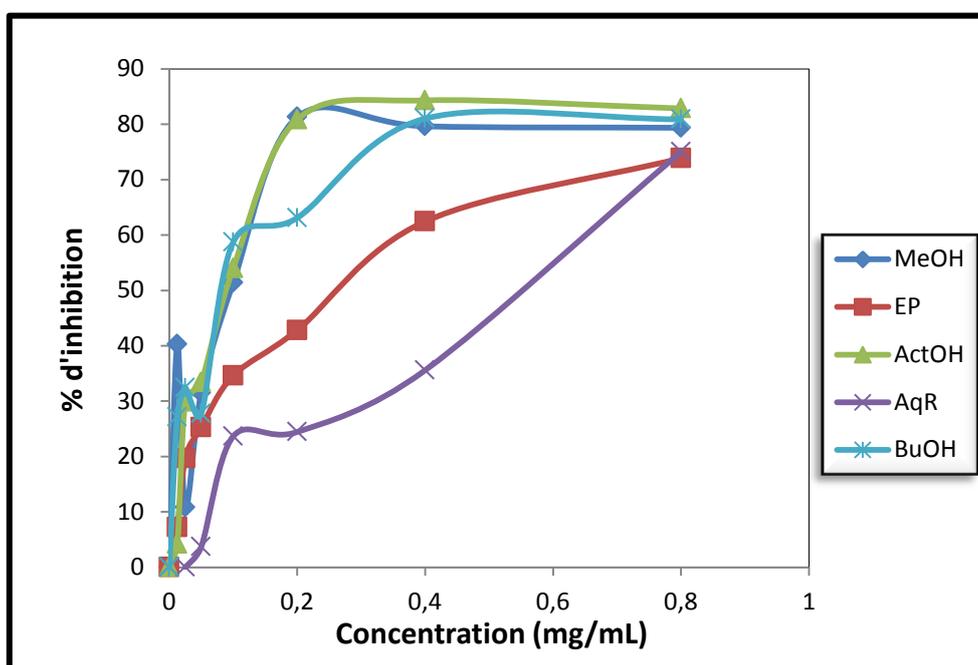


Figure III.4 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH'

Cette figure montre que tous les extraits testés possèdent une activité antiradicalaire excellente dose dépendante vis-à-vis du DPPH' c'est à dire que pour un extrait, l'activité augmente au fur et à mesure que leur concentration augmente. Dans la plage des concentrations de 0.025-0.8 mg/mL, ces extraits montrent des niveaux différents d'activité de réduction des radicaux DPPH' dont à une concentration de 0,4mg/mL, le meilleur pourcentage d'inhibition est obtenu avec l'extrait d'acétate d'éthyle (84,32%), suivi de l'extrait n-butanolique, méthanolique et éther de pétrole (81,02%, 79,64%, 62,44%) respectivement. L'exception est faite pour l'extrait aqueux résiduel qui se manifeste par un

faible pourcentage d'inhibition (35,58%) par rapport à celle obtenu avec l'ensemble des extraits.

Les résultats des absorbances obtenus ont permis également la détermination de la valeur de CI_{50} (la concentration de l'extrait antioxydant nécessaire pour inhiber et réduit 50% du radical DPPH') afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.

Détermination des CI_{50}

Les valeurs des CI_{50} exprimées en mg/mL sont déterminées graphiquement à partir de la droite de régression non linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations pour chaque extrait testé (figure III.5) en utilisant le logiciel statistique. Une valeur plus faible de CI_{50} indique une activité antioxydante de l'extrait plus élevée.

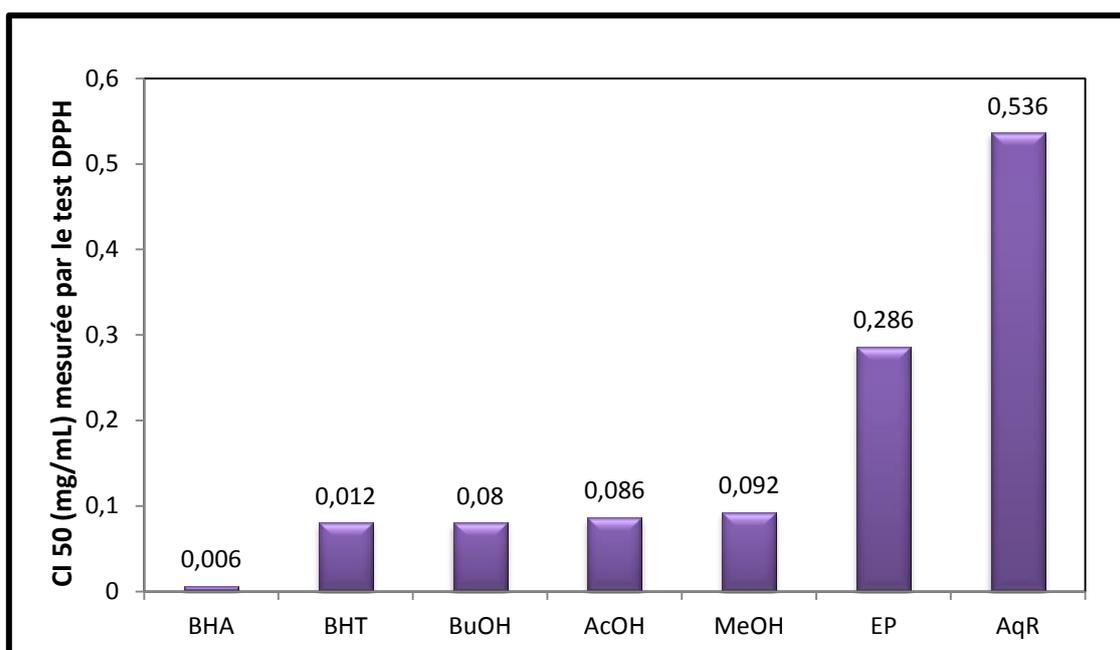


Figure III.5: Les CI_{50} des extraits testés classés par ordre croissant (DPPH').

La figure ci-dessous montre qu'il y a une réduction de la couleur de ce radical par rapport au blanc ce qui confirme ainsi les résultats obtenus du test.

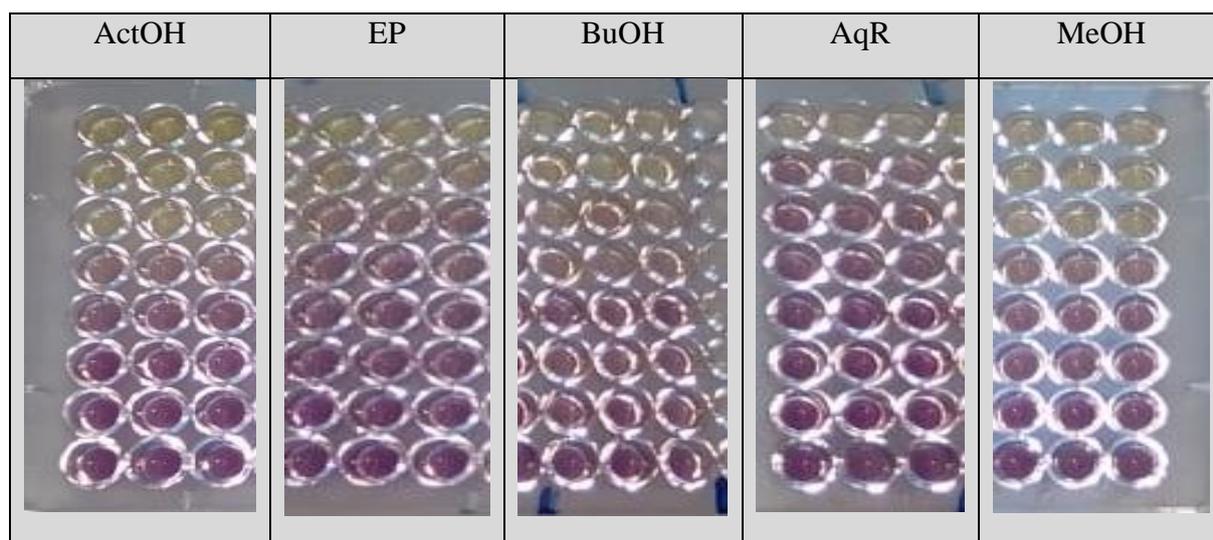


Figure III.6: Photos prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH'

A partir des valeurs des CI_{50} , on constate que parmi les fractions testés, la fraction n-butanolique présentait l'activité la plus élevée avec une valeur de CI_{50} de l'ordre de $0,08 \pm 0,007$ mg/mL, suivi par la fraction acétate d'éthyle qui a une concentration d'inhibition de l'ordre de $0,086 \pm 0,005$ mg/mL. Cependant la fraction d'éther de pétrole ainsi que la fraction aqueuse résiduelle ont présenté des CI_{50} plus faible de l'ordre de $0,286 \pm 0,103$ et $0,536 \pm 0,094$ mg/mL, respectivement. Par comparaison avec les valeurs des CI_{50} de deux standards BHA et BHT, on trouve que tous les extraits testés ont montré une activité antiradicalaire faible, c'est le cas par exemple de la fraction n-butanolique qui est 12 fois moins faible à celle du BHA qui présente une CI_{50} égale à $0,006$ mg/mL et 6 fois moins puissante à celle du BHT ($0,012$ mg/mL). Concernant la fraction d'acétate d'éthyle, son potentiel antioxydant s'est révélé 15 fois moins important à celle du standard BHA et 7 fois supérieure à celle du BHT. Néanmoins, la fraction d'éther de pétrole et d'aqueuse résiduelle sont 46 et 90 fois respectivement moins intéressants à celle du BHA.

D'autre part, l'extrait brut méthanolique s'est avéré moins actif par rapport aux deux fractions n-butanolique et acétate d'éthyle avec une $CI_{50} = 0,092 \pm 0,008$ mg/mL, 14 fois moins importante à celle du BHA et 6 fois élevée par rapport à BHT.

L'activité de piégeage radicalaire des extraits était efficace dans l'ordre : n-butanolique > acétate d'éthyle > méthanolique > éther de pétrole > aqueux résiduel.

Chapitre III: Résultats et Discussion

En comparant ces résultats du test DPPH^{*} à ceux de **(Bentahar., 2017)**, qui donnent des valeurs des CI₅₀ égale à 0.4 et 0.25 mg/mL pour l'espèce *Centaurium erythraea* L. (*Centaurium*) testé sous forme d'extrait aqueux (décoction et infusion), il est bien évident que notre espèce possède une forte activité antioxydante attribuable à sa richesse en polyphénols, plus particulièrement en acides phénoliques et flavonoïdes.

Par ailleurs, le pouvoir antioxydant de notre fraction acétate d'éthyle est significativement similaire à celles de l'extrait aqueux et éthanolique des parties aériennes de l'espèces du genre *Centaurium* ; *Centarium umbellatum* obtenues par les travaux de **(Neagu et al., 2016)** avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 70,29 - 84,9%.

Notre résultat pour la fraction d'acétate d'éthyle et n-butanolique s'avère plus intéressant que celui obtenu pour l'extrait aqueux de l'espèce *Gentianella nitida* (Gentianaceae) (CI₅₀= 145 ± 2,5µg/mL) **(Carbonel Villanueva., 2017)**.

Il est à signaler que l'activité d'élimination des radicaux libres de l'extrait méthanolique de racines de *Centaurea centaurium* L. (*Centaurium*) s'est manifestée très active comparativement à l'extrait méthanolique brut de notre espèce avec une valeur de CI₅₀ égale à 0.057 mg/mL **(Conforti et al., 2008)**.

De même, notre extrait brut méthanolique a montré une propriété antiradicalaire presque similaire à celle de l'extrait aqueux des parties aériennes de l'espèce *Gentiana algalida*.G (Gentianaceae) avec une valeur de CI₅₀ égale à 89,22±3,83 µg/mL **(Olennikov et al., 2015)** Dans la même étude ces auteurs ont enregistré des CI₅₀ pour les extraits aqueux de trois espèces de *Gentiane* ; *decumbens* G. 287.91± 10.36 µg/mL, *macrophylla* G. 278.82 ±9.87 µg/mL, *G. triflora* 104.86 ± 3.56 µg/mL, nettement supérieures à celle de l'extrait butanol, acétate d'éthyle et méthanol de notre plante.

L'étude réalisé par **(Senol et al., 2012)** sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol des fleurs, feuilles et racines des cinq espèces du genre *Gentiana* et une espèce du genre *Gentianella* montre que les extraits méthanolique et acétate d'éthyle des fleurs, feuilles et racines des espèces du genre *Gentiana* sont moins intéressantes à nos extraits méthanolique et acétate d'éthyle avec des pourcentage d'inhibition allant de 8,82% jusqu'à 69,16% pour les extraits méthanolique et de 12,44% à 53,09% pour les extrait acétate

d'éthyle. Cependant ces mêmes extraits pour l'espèce du genre *Gentianella* ont donné une activité antiradicalaires supérieure à nos extraits, avec des pourcentages d'inhibition 73,05% et 82,44% pour les fleurs et les feuilles de l'extrait méthanolique respectivement et 84% pour l'acétate d'éthyle.

Un tel effet scavenger de DPPH^{*} plus élevé pour l'extrait d'acétate d'éthyle et de n-butanolique contre les extraits de méthanol, éther de pétrole et aqueux résiduel ont déjà été observés (**Kandouli., 2018**).

I.4.1.2. Test de l'activité scavenger du radical ABTS^{•+}

Pour l'estimation de l'effet scavenger des extraits de la plante du genre *Centaurium*, nous avons également utilisé le test de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}. Après avoir additionné les extraits, nous avons constaté une diminution des absorbances à 734 nm due à la réduction de ce radical et donc la présence d'une activité antioxydante des extraits testé vis-à-vis ABTS^{•+}.

Les concentrations inhibitrices de chaque extrait sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des courbes tracés [% d'inhibition =f (concentrations)] (figure III.7;8).

Dans ce test nous avons réalisé une gamme de dilution beaucoup plus étendue que celle du test précédent. Grace à la forte sensibilité du radical ABTS^{•+} avec les extraits.

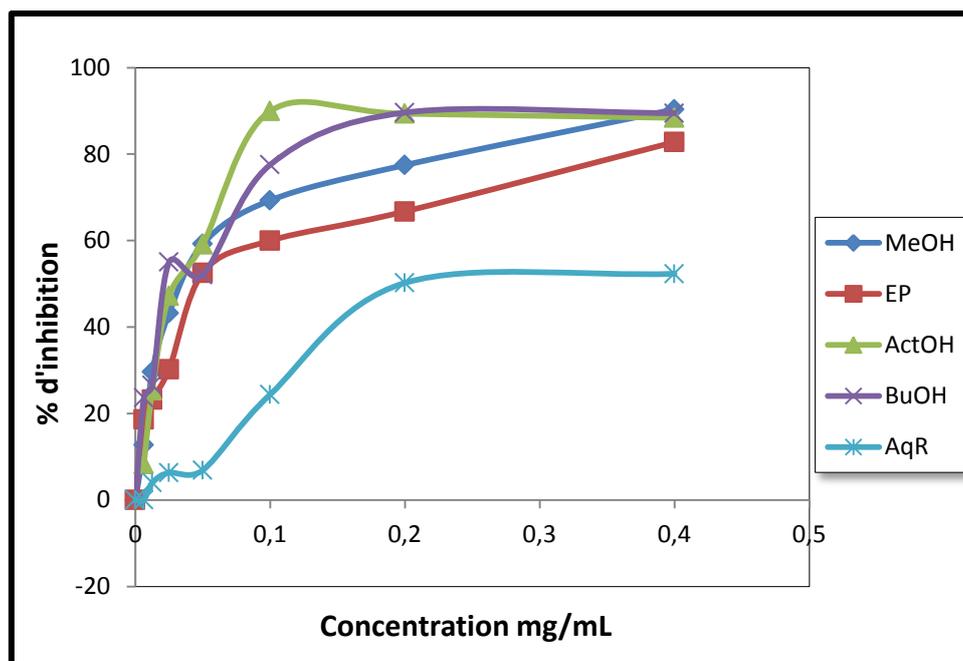


Figure III.7 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical $ABTS^{++}$

Les résultats éminents montrent que tous les fractions étudiés sont dotés d'une activité antioxydante qui varie d'une fraction à une autre dont l'intensité de cette activité dépend de différentes concentrations des extrais. A une concentration de 0,1 mg/mL, on constate que la fraction d'acétate d'éthyle représente une forte activité antiradicalaire par un pourcentage d'inhibition de 89,94% supérieur à celle de la fraction n-butanolique et la fraction méthanolique qui possèdent un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 77.53% et 69.30% respectivement. La fraction d'éther de pétrole a révélé une capacité modérée d'inhiber le radical $ABTS^{++}$ 59.99%. Concernant la fraction résiduelle aqueuse, son potentiel antioxydant s'est traduit par un pourcentage d'inhibition 24.42% relativement faible qu'autres fractions.

A partir de la concentration 0,2 mg/ml, les trois extraits n-butanolique, acétate d'éthyle et aqueux résiduel atteignent la région asymptotique de la courbe qui se caractérise par une inhibition presque totale des radicaux $ABTS^{++}$.

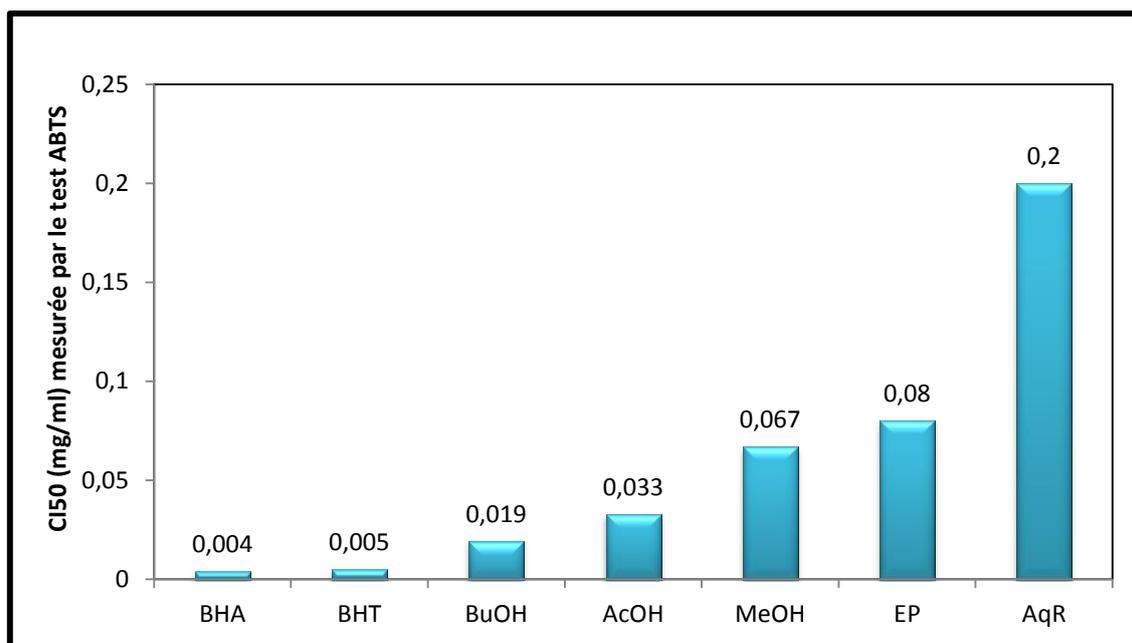


Figure III.8 : Les CI₅₀ des extraits testés classées par ordre croissant (ABTS^{•+}).

Les CI₅₀ obtenus sont proportionnelles à la décoloration de la solution ABTS^{•+} observé au moment où l'on avait déposé les extraits (figure III.9).

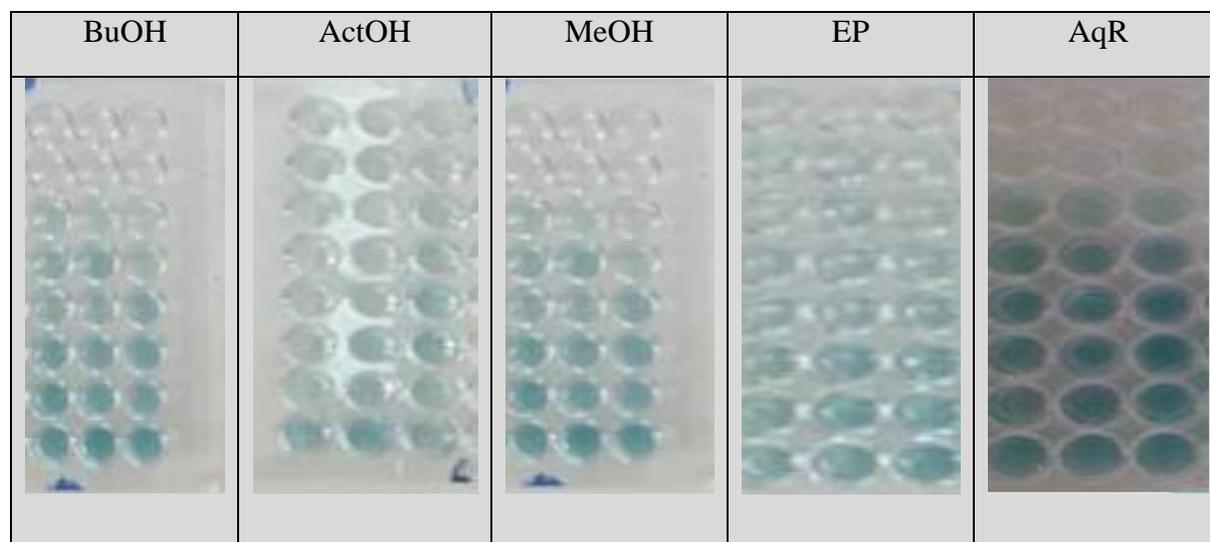


Figure III.9 : Photos prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS^{•+}

Il ressort de ces résultats, que la Fraction n-butanolique soit l'échantillon le plus actif avec une CI₅₀= 0,019±0,009 mg/mL supérieure à celle du BHA (4,5 fois) et du BHT (3,5 fois), suivie par la fraction d'acétate d'éthyle qui montre une activité de piégeage radicalaire avec l'ABTS^{•+} (CI₅₀=0,033 ±0,231 mg/mL) huit fois et six fois moins faible que celle des

deux standards le BHA et le BHT respectivement, puis l'extrait brut et la fraction éther de pétrole qui exhibent des CI_{50} presque proche de l'ordre de $0,067 \pm 0,002$ et $0,08 \pm 0,007$ mg/mL donc sont 16 et 20 fois moins puissantes à celle de BHA. Concernant, la fraction aqueuse résiduelle, elle manifeste une capacité très faible sur ce radical comparativement aux standards et aux extraits précédents, justifiée par la valeur CI_{50} le plus élevé obtenu expérimentalement par cette méthode ($0,2 \pm 0,14$ mg/mL).

Statistiquement, l'analyse comparative entre les différentes extraits aboutit aux résultats suivants : n-butanolique > acétate d'éthyle > méthanolique > éther de pétrole > aqueux résiduel.

Dans une étude réalisée par **(Bayliak et al., 2016)**, sur l'extrait aqueux des rhizomes de *Gentiana lutea L.* appartenant à la famille des Gentinacea, la valeur de CI_{50} est de $190 \mu\text{g/mL}$ donc une activité antioxydante vis-à-vis $ABTS^{*+}$ moins importante que celle de notre plante.

Dans une autre étude faite par **(Carbonel Villanueva., 2017)**, sur l'extrait aqueux de la plante *Gentianella nitida* (Gentinacea) révèle une efficacité antiradicalaire très faible par rapport à celle de notre plante avec une concentration inhibitrice CI_{50} de l'ordre de $1,49 \pm 0,05$ mg/mL.

Notre extrait brut méthanolique a révélé un pouvoir antioxydant presque 2 à 3,5 fois plus puissant à celui trouvé pour les extraits bruts aqueux (préparé par décoction) obtenues par **(Olennikov et al., 2015)** pour leur étude portant sur les parties aériennes de 4 espèces du genre *Gentiane* (Gentianacea) ; *G. algida* , *G. decumbens* , *G. macrophylla* , *G. triflora* avec des CI_{50} oscillant entre 101, 67 et $217,03 \mu\text{g/mL}$.

I.4.1.3. Test de l'activité scavenger du radical Galvinoxyl

La capacité des extraits issus de la plante du genre *Centaurium* à donner des atomes d'hydrogènes a été également étudiée par un troisième test qui est en tout point complémentaire aux deux tests DPPH \cdot et $ABTS^{*+}$; Dosage de balayage des radicaux Galvinoxyl. Une telle diminution de l'absorbance de ce radical chromogène à 428 nm correspond à une augmentation de pouvoir anti-radicalaires des extraits testés.

Le calcul du pourcentage d'inhibition de radical Galvinoxyl, permet de tracer les courbes présentées dans la figure III.10. De cette figure nous avons pu déduire graphiquement les valeurs des CI_{50} de nos extraits.

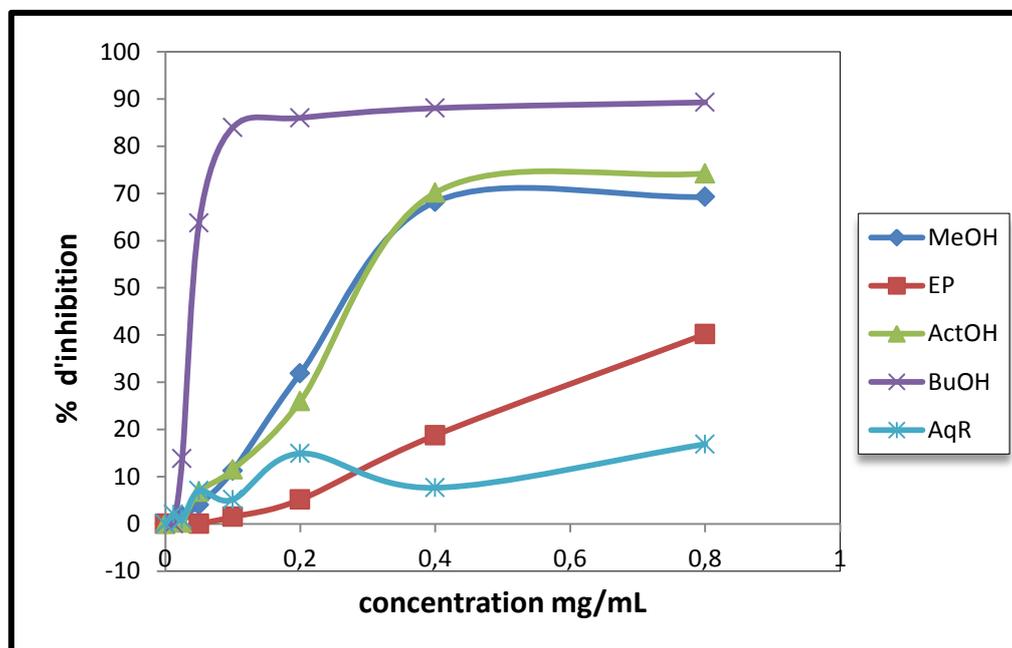


Figure III.10 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical Galvinoxyl

Les résultats du calcul des pourcentages d'inhibition indiquent que tous les extraits possèdent clairement une activité antiradicalaire excellente sauf les deux fractions aqueuse résiduelle et éther de pétrole, cette activité est proportionnelle à l'augmentation des concentrations. A partir de la représentation graphique et à une concentration de 0,4 mg/mL (Figure III.10) nous a permis de déduire le classement des extraits avec leurs pourcentages d'inhibition, qui est de l'ordre de 88,04% pour l'extrait n-butanolique qui présente hautement pouvoir antioxydant à de très faibles concentrations par rapport aux deux autres fractions acétate d'éthyle et méthanolique qui est l'ordre de 70,12 % et 68,20 % respectivement. Pour ce qui est des extraits éther de pétrole et aqueux résiduel, elles exhibent des faibles pourcentages d'inhibition de l'ordre de 18,77 % et 7,65% respectivement. Même un faible pourcentage d'inhibition indique une certaine capacité de don des protons.

En effet, une concentration de l'ordre de $\sim 0,4$ mg/mL permet d'obtenir une inhibition presque totale des radicaux Galvinoxyl pour l'extrait n-butanolique, tandis que cette inhibition

total est un peu tardive pour les deux extraits acétate d'éthyle et méthanolique (~0,45 mg/mL).

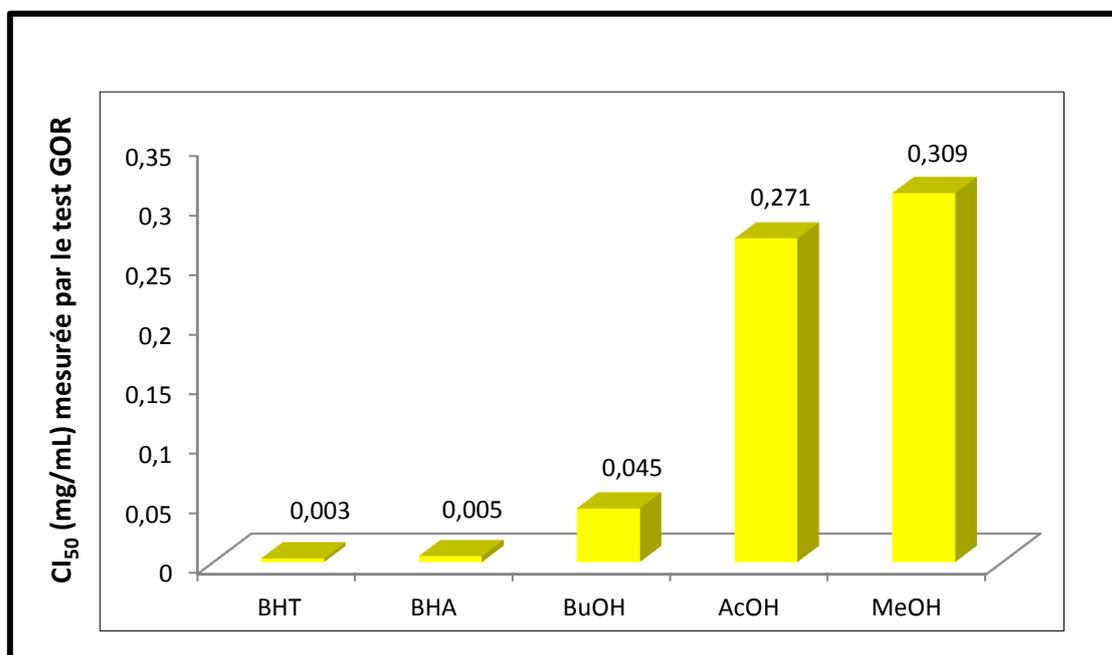


Figure III.11 : Les CI₅₀ des extraits testés classés par ordre croissant (GOR).

Les indices des CI₅₀ sont inversement proportionnels aux réactions colorimétriques obtenues (figure III.12) dont plus la CI₅₀ est petit, plus la réaction est intense, plus l'activité antiradicalaire de l'extrait est importante.

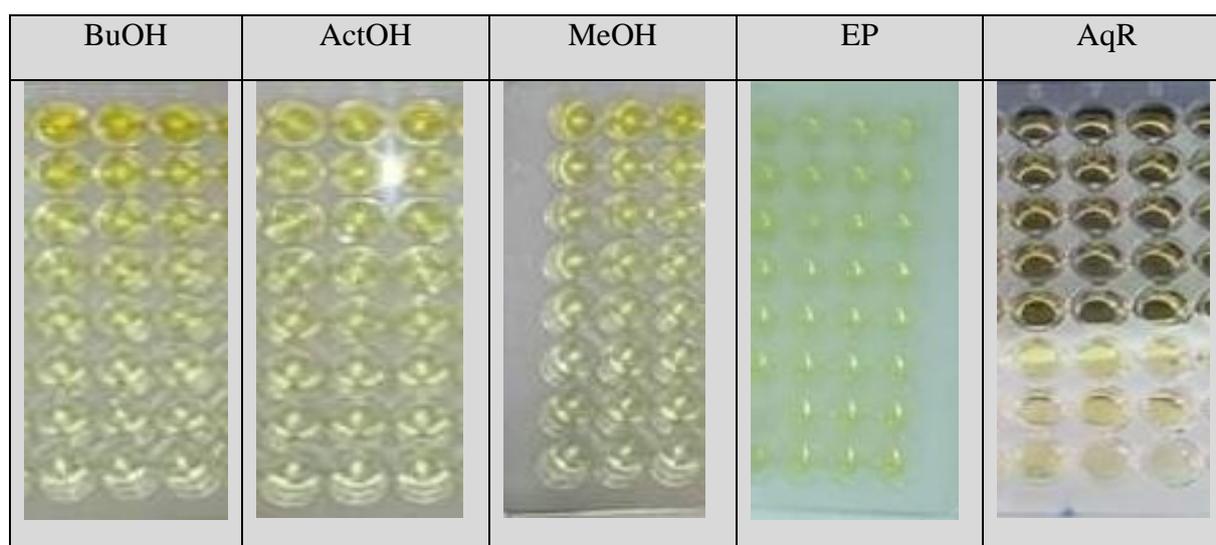


Figure III.12 : Photos prises lors du dosage de l'activité GOR.

Chapitre III: Résultats et Discussion

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test GOR indiquent que parmi tous les échantillons, la fraction n-butanolique exerce une bonne activité réductrice avec une valeur de CI_{50} atteignant $0,045 \pm 0,0067$ mg/mL, ce qui est largement supérieure à celle du références le BHA et le BHT. Or, en comparaison avec les deux fractions n-butanolique acétate d'éthyle et les deux standards on trouve que, l'extrait brut est l'échantillon qui doté d'un potentiel antioxydant le plus faible, donnant une valeur de $CI_{50} = 0,309 \pm 0,024$ mg/mL. D'un autre côté, les données enregistrées avec la fraction acétate d'éthyle ont mis en évidence une valeur de $CI_{50} = 0,271 \pm 0,055$ mg/mL, 90 et 54 fois moins faible que celle du BHT et BHA respectivement. Cependant, cette activité est meilleure que celles des fractions d'éther de pétrole et aqueuse résiduelle qui malgré leurs concentrations élevées allant jusqu'à 0,8 mg/mL n'ont pas permis d'observer une variation de l'inhibition, ce qui ne nous a pas permis de calculer les valeurs de la concentration de l'inhibition CI_{50} ($CI_{50} > 0,8$ mg/mL).

Les résultats du pourcentage d'inhibition et les valeurs CI_{50} ont montré que l'activité antioxydante Galvinoxyl du *Centaurium sp* a augmenté dans l'ordre suivant :

Aqueux résiduel < éther de pétrole < méthanol < acétate d'éthyle < n-butanol.

Les résultats du pouvoir antiradicalaire de l'extrait brut et ces fractions par le test Galvinoxyl confirme encore une fois l'efficacité antiradicalaire majeure de notre plante *Centaurium sp*.

Il est évident que la forte activité antiradicalaire des fractions acétate d'éthyle et n-butanolique par rapport aux autres fractions dans les trois méthodes DPPH, ABTS et GOR est attribuée à leur richesse en composés phénoliques particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Si, l'antioxydant de référence est le plus puissant piègeur du radical libre DPPH, ABTS, Galvinoxyl d'après l'analyse statistique, cela n'empêche pas qu'un certain nombre d'extraits sont très actifs et sont aussi d'excellents piègeurs après le BHA et le BHT vue les valeurs CI_{50} basses obtenues expérimentalement.

Dans la littérature aucun article n'a testé l'efficacité des extraits organiques et/ou aqueux des plantes de la famille Gentianacea par le test GOR, ce qui nécessite la comparaison avec d'autres plantes.

Notre résultat pour la fraction n-butanolique s'avère plus intéressant que celui obtenu pour les extraits méthanolique des parties aériennes de deux espèces de la famille Lamiaceae *Calamintha nepeta* ($CI_{50} = 313\mu\text{g/mL}$) et *Lavandula stoechas* ($CI_{50}=227\mu\text{g/mL}$) et pour l'extrait aqueux lyophilisé des fruits de l'espèce *Myrtus communis* (Myrtaceae) qui donne une valeur de CI_{50} de l'ordre de $229\mu\text{g/mL}$, également ce même extrait s'avère moins intéressant que celui enregistré avec l'extrait aqueux lyophilisé de l'espèce de la famille Smilacacées *Smilax asperal* ($CI_{50}= 5 \mu\text{g/mL}$). D'autre part, l'extrait brut méthanolique de notre plante a donné un effet inhibitrice sur Galvinoxyl moins puissant en comparant avec celui des extrait méthanoliques de l'espèce *Lavandula stoechas* et *Myrtus communis* et un effet presque similaire en comparant avec celui de *Calamintha nepeta* (Amira et al., 2012).

L'efficacité antiradicalaire de notre plante, en ce qui concerne les extraits méthanolique, n-butanolique et acétate d'éthyle vis-à-vis du Galvinoxyl est nettement meilleure que celle de (Yong et al., 2013), qui ont trouvé un potentiel antioxydant très faible, avec des pourcentages d'inhibition aux environs de 18%, 51%, 31% pour les extraits méthanolique, chloroformique et aqueux de *Clinacanthus nutans* (Acanthacées), respectivement.

I.4.1.4. Pouvoir chélateur du fer ferreux

L'ion ferreux bivalent est non seulement un matériel essentiel pour le transport de l'oxygène, la respiration et l'activité enzymatique dans le corps humain, mais également un métal actif qui jouent un rôle important en tant que catalyseurs des processus oxydatifs, conduisant à la formation de radicaux libres qui provoquent des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et de cellules. Donc la capacité de chélation de ce métal par des agents chélateurs efficaces forment des liaisons avec lui, peut rendre l'effet antioxydant important en retardant l'oxydation catalysée par ce métal (Gülçin et al., 2010).

Dans cette étude, l'activité de chélation du fer ferreux a été mesurée par l'inhibition de la formation de complexe [Fe (II)-Ferrozine] après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} . Le Ferrozine peut quantitativement former des complexes avec Fe^{2+} . Cependant, cette réaction est limitée en présence des agents chélateurs qui forment des complexes [Fe (II)-antioxydant] et donc une compétition entre les deux chélateurs.

À $\lambda_{\max} = 562 \text{ nm}$, nous avons constaté une diminution de l'absorbance due à l'inhibition de la formation du complexe [Fe (II)-Ferrozine] par l'agent chélateur qui s'est engagé au phénomène de chélation du fer ferreux. Autrement dit, la diminution de l'absorbance du complexe [Fe (II)-Ferrozine] observé indique la présence des antioxydants chélateurs dans l'extrait.

La capacité de chélation de fer ferreux de divers extraits des parties aériennes de la plante étudiée sont représentés dans la Figure III.13.

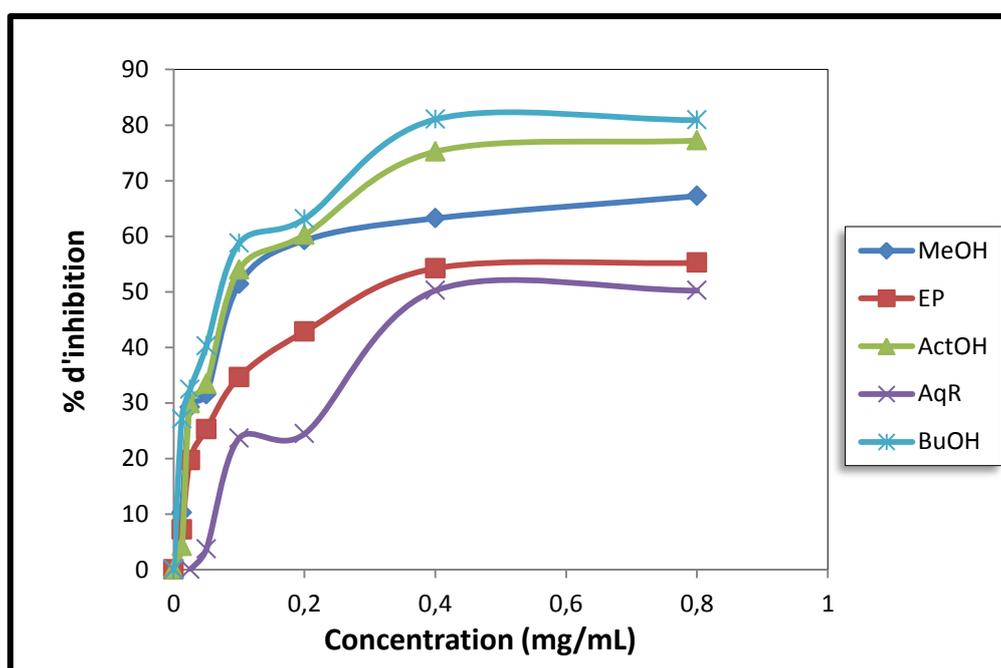


Figure III.13 : Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité métal chélate

Selon les résultats obtenus dans cette étude (figure III.13), on constate que tous les extraits ont démontrés une très bonne efficacité à chélater les ions de fer en fonction de la dose notamment pour les extraits acétate d'éthyle, n-butanol et méthanol, dans la gamme allant de 0,0125-0,8 mg/mL, avec un pourcentage d'inhibition variant de 0,01% jusqu'à 80,89% à différentes concentrations. Cette variation peut être due à l'augmentation de la concentration des métabolites secondaires actifs dans les extraits. La meilleure capacité chélatrice est celle de l'extrait n-butanolique avec un pourcentage d'inhibition atteignant 80,89% à la concentration de 0,8 mg/mL, suivi de l'extrait acétate d'éthyle (77,22%) puis l'extrait méthanolique (70,22%) à la même concentration. Quant aux extraits éther de pétrole

Chapitre III: Résultats et Discussion

et aqueux résiduel, elles ont une capacité chélatrice presque similaire avec des pourcentages d'inhibition estimées à 55,21% et 50,22%, respectivement.

Les résultats des concentrations chélatrice des ions Fe^{2+} à 50% d'inhibition sont déterminés graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, puis représentés par un histogramme affichant la décroissance du pouvoir antioxydant (Figure III.14).

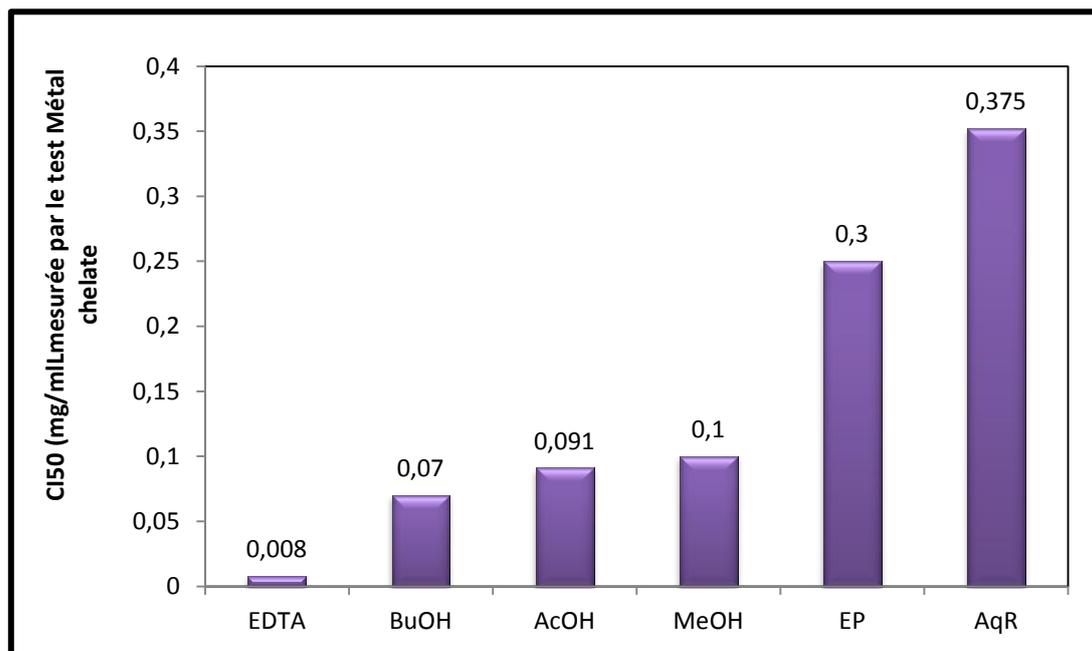


Figure III.14 : Les CI₅₀ des extraits testés classés par ordre croissant (métal chélate)

A l'addition des résultats de pourcentages d'inhibition et les valeurs des CI₅₀, on peut ainsi prédire d'après la figure ci-dessous si il y a une activité métal chélate par la réduction de la couleur violette intense de complexe [Fe (II)-Ferrozine] par rapport au blanc.

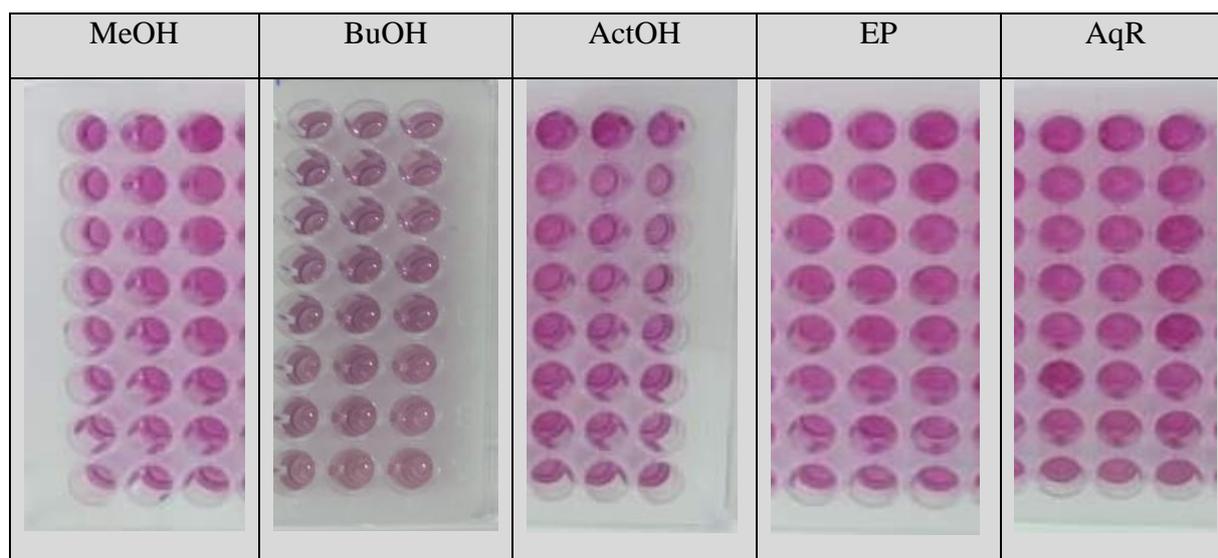


Figure III.15: Photos prises lors du dosage de l'activité métal chélate

Les résultats de la figure III.14 viennent confirmer le constat déjà fait (figure III.13) car les valeurs des CI_{50} (les concentrations inhibitrices à laquelle les ions de fer ferreux sont chélatés à 50%) des parties aériennes de la plante ont démontré une bonne efficacité de l'extrait brut et ses fractions à chélater le fer ferreux. Les valeurs des CI_{50} des différents extraits testés montrent une grande variation allant de 0,07 mg/mL à 0,389 mg/mL. Les fractions obtenues avec n-butanolique et acétate d'éthyle semblent avoir l'activité chélatrice la plus importante avec des CI_{50} respectives de $0,07 \pm 0,42$ mg/mL et $0,091 \pm 0,005$ mg/mL, suivi par l'extrait brut qui montrés une activité de chélation des ions ferreux moyenne avec une valeur de $0,1 \pm 0,070$ mg/mL. Alors que les deux fractions d'éther de pétrole et aqueuse résiduelle ont manifesté une capacité chélatrice moins puissante sur les ions ferreux par rapport aux autres extraits en enregistrant CI_{50} de l'ordre de $0,300 \pm 0,05$ mg/mL et $0,375 \pm 0,024$ mg/mL respectivement. Aucun de ces extraits semblaient de excellente chélateurs des ions ferreux que l'EDTA, le contrôle positif utilisé dans ce dosage dont la meilleure fraction n-butanolique est neuf fois inférieure à celle d'EDTA.

Les capacités de chélation des cinq extraits se sont révélées dans l'ordre suivant :
n-butanolique > acétate d'éthyle > méthanolique > éther de pétrole > aqueux résiduel.

Cela pourrait être dû à la nature complexe des extraits contenant un nombre de différents chélateurs de fer, avec différentes affinités, en compétition avec la ferrosine.

Chapitre III: Résultats et Discussion

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques (Capecka et al., 2005; Le et al., 2007; Verdan et al., 2011). Les acides aminés et les acides organiques sont aussi doués de capacités de séquestration des métaux de transition (Wong et al., 2006).

Par conséquent, d'après nos résultats de dosage totaux des composés phénoliques et l'HPLC, il est probablement que les composés phénoliques sont les principaux chélateurs présents dans les extraits.

Les flavonoïdes et les acides phénoliques exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques (Le et al., 2007). (Verdan et al., 2011) ont rapporté que les effets antioxydants des flavonoles sont dus en partie à leurs capacités de fixer différents métaux à plusieurs sites.

Cette étude rapport que les fractions n-butanolique et acétate d'éthyle présentent une activité chélatrice plus élevée que les autres fractions. Cela peut être expliqué par la solubilité des composés phénoliques notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes dans le butanol et l'acétate d'éthyle dont les résultats de (Sahreen et al., 2010) montrent que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants.

De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels spécifiques des OH (Fraga et al., 2010). Donc il faut que les composés phénoliques présents dans l'extrait disposent les groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice.

La comparaison de ces résultats avec celles trouvées avec d'autres études sur des plantes du même genre ou de la même famille éclaire l'importance de la capacité des extraits étudiés d'établir des liaisons avec les ions ferreux.

En menant une étude comparative entre nos extraits de la plante du genre *Centaurium* et l'espèce *Centaurium erythraea* (*Centaurium*) étudiée par (Bentahar., 2017), qui a enregistré des valeurs des CI_{50} égale à $0,5 \pm 0,55$ mg/mL pour l'extrait aqueux préparé par décoction et

Chapitre III: Résultats et Discussion

1,3±0.02 mg/mL pour l'extrait aqueux préparé par infusion, en trouve que la *Centaureum erythraea* possède une efficacité chélatrice des métaux très faible par rapport à notre plante.

D'après les résultats obtenus d'une étude réalisée par (Senol et al., 2012) sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol des fleurs, feuilles et racines des cinq espèces de genre *Gentiana* (*Gentiana asclepiadea*, *Gentiana cruciata*, *Gentiana olivieri*, *Gentiana septemfida*, *Gentiana verna*) et *Gentianella caucasea*, on peut dire que :

Les extraits dichlorométhane des racines de l'espèce *Gentiana asclepiadea* et d'acétate d'éthyle des fleurs et racines de cette espèce ont une activité chélatrice proche à celle de notre extrait n-butanolique (70%), par contre pour l'extrait acétate d'éthyle des feuilles s'est manifeste moins efficace comparativement à notre extrait acétate d'éthyle (42%).

Les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanolique des fleurs, feuilles et racines de l'espèce *Gentiana cruciata* et de l'espèce *Gentiana olivieri* ont montrés une activité légèrement inférieure à celle de nos extraits acétate d'éthyle, butanol et méthanol avec des pourcentages d'inhibition comprises entre de 29 % et 62%.

De même, les extraits méthanolique des fleurs, feuilles et racines de l'espèce *Gentianella caucasea* ont une capacité antioxydante significativement plus puissante que celle de notre extrait brut avec des pourcentages de l'ordre de 44%, 64% et 60% respectivement.

I.4.1.5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

La capacité réductrice des extraits est un indicateur significatif de l'activité donneuse d'électrons qui est un mécanisme important de l'action antioxydante. Cette méthode est basée sur la capacité des réducteurs (polyphénols) qui ont la capacité de donner d'électron à réduire le fer ferrique Fe^{3+} de ferricyanure de potassium en fer ferreux Fe^{2+} .

Le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert qui apparaît à 700 nm.

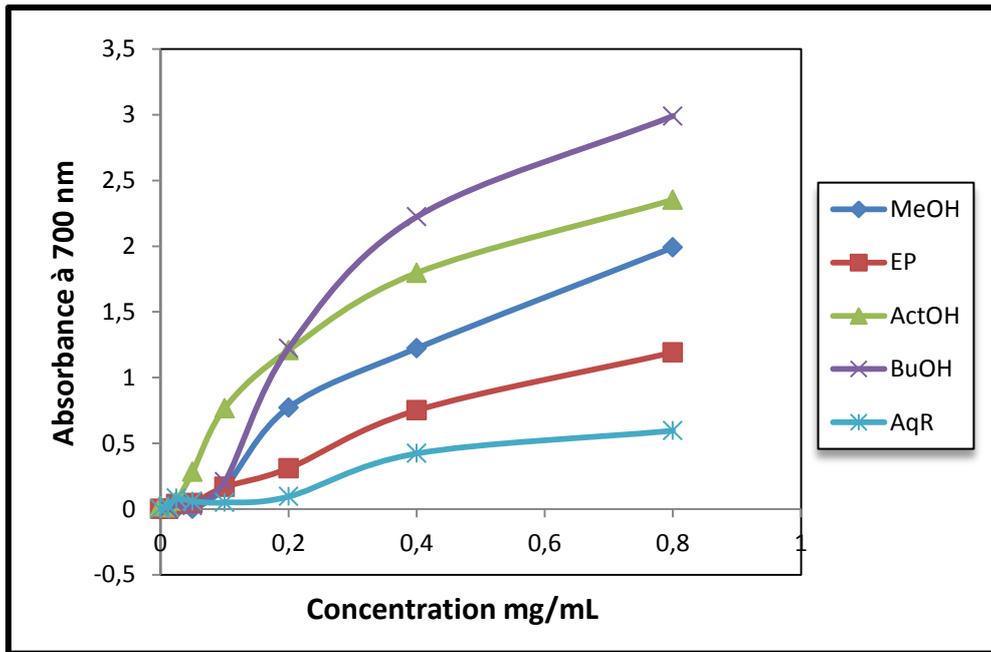


Figure III.16 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Pouvoir réducteur)

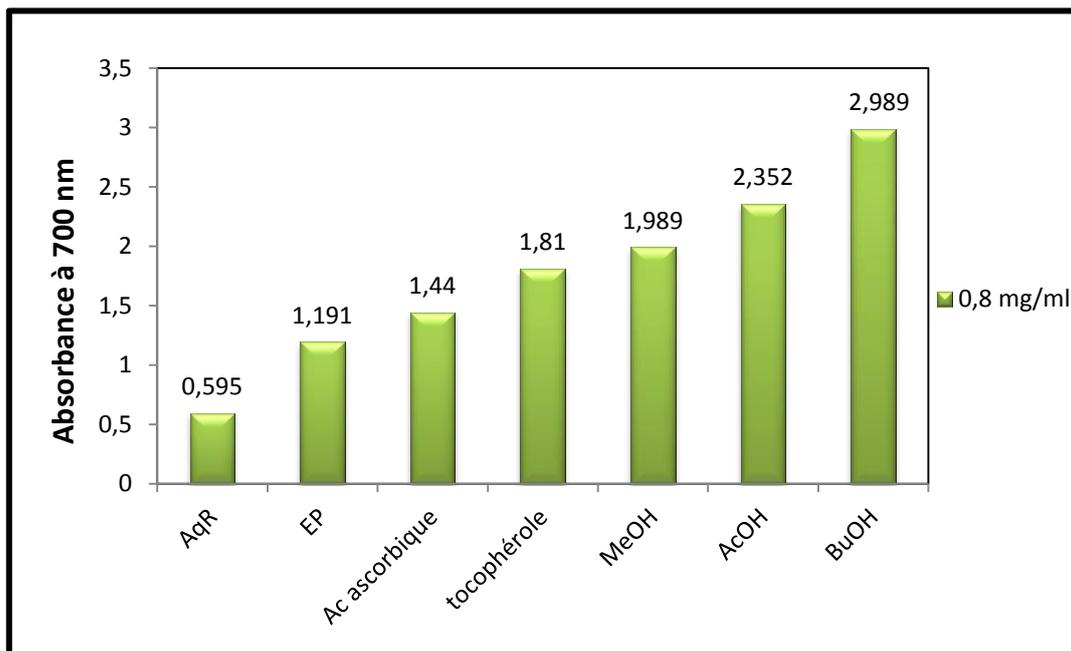


Figure III.17 : Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donnée (pouvoir réducteur)

La figure ci-dessous illustre le changement de la couleur du milieu réactionnelle du jaune au bleu vert ce qui confirme ainsi les résultats de la figure III.16 et III.17.

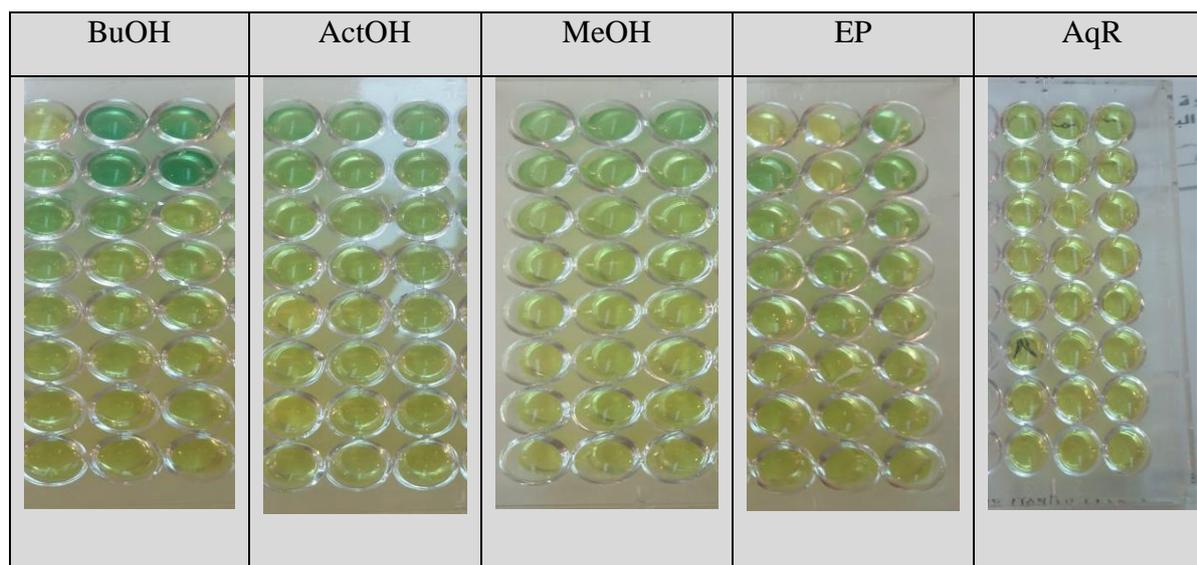


Figure III.18 : Photos prises lors du dosage de l'activité pouvoir réducteur

Les résultats de pouvoir réducteur des différents extraits sont représentés dans la figure III.16 qui montre les courbes de la capacité réductrice du fer ferrique en fonction des concentrations en extraits. L'analyse statistique de ces résultats révèle une proportionnalité entre les absorbances des extraits et leurs concentrations. Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est important.

Suivant les indications de la figure III.16, on remarque que tous les extraits ont la capacité de réduire le fer ferrique mais il y a une différence dans la puissance réductrice entre ces extraits et aussi entre les extraits et l'acide ascorbique, l'alpha-tocophérol en tant que standards (figure III.17).

A une dose de 0,8 mg/mL, les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique ont exprimées un pouvoir réducteur très élevé aux deux autres fractions et aussi par rapport à l'extrait brut avec une absorbance maximal de $2,352 \pm 0,024$ et $2,989 \pm 0,037$ nm respectivement, suivi de l'extrait brut qui montre une efficacité réductrice moyenne par rapport aux deux fractions précédentes avec une absorbance maximal de l'ordre de $1,989 \pm 0,061$ nm à la même dose. A propos des fractions d'éther de pétrole et aqueux résiduelle ont respectivement le pouvoir réducteur le plus faible de tous les extraits avec une absorbance maximal égale à $1,191 \pm 0,16$ et $0,595 \pm 0,0025$ nm.

Chapitre III: Résultats et Discussion

La comparaison entre les standards (acide ascorbique et alpha-tocophérol) et les différents extraits indique que les fractions n-butanolique, acétate d'éthyle et l'extrait brut exhibent une très bonne activité réductrice qui dépasser celle des standards dont la fraction n-butanolique est 2 à 1,5 fois plus active à celle de l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol respectivement et la fraction d'acétate d'éthyle est presque 1,5 fois supérieure à celle des standards. Concernant la fraction éther de pétrole manifeste un potentiel réducteur plus proche à celui de l'acide ascorbique qu'à celui de l'alpha-tocophérol. Tandis que la fraction aqueuse résiduelle représente l'échantillon le plus faible en matière de réduction de l'ion Fe^{3+} par rapport aux standards et aux extraits.

Le fort pouvoir antioxydant de l'acétate d'éthyle et n-butanolique est probablement en relation avec la présence et la richesse de ces fractions en composés réducteurs telle que les polyphénols particulièrement les acides phénoliques, les flavonoïdes et les sucres libres.

L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'explique en partie par leur capacité à capturer, stabiliser et neutraliser des radicaux libres en donnant soit des protons soit d'électrons (pour la réduction) et de complexer des métaux.

L'efficacité réductrice de notre plante est significativement inférieure à celles des parties aériennes de l'espèce du genre *Centaurium* ; *Centarium umbellatum* testé sous forme d'extrait aqueux et éthanolique avec des absorbances maximal de l'ordre de 0,97 et 0,61 nm respectivement (**Neagu et al., 2016**).

Notre résultat pour la fraction d'acétate d'éthyle et n-butanolique à la dose de 0,8 mg/mL s'avère moins importante que celui obtenu pour l'extrait aqueux de l'espèce *Gentianella nitida* (Gentianaceae) qui possède une absorbance maximal égale à 0,59 nm à la même dose (**Carbonel Villanueva., 2017**).

L'étude réalisée par (**Senol et al., 2012**) sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol des fleurs, feuilles et racines des cinq espèces de genre *Gentiana* (*Gentiana asclepiadea* , *Gentiana cruciata* , *Gentiana olivieri* , *Gentiana septemfida* , *Gentiana verna*) et *Gentianella caucasea*, montre que :

Chapitre III: Résultats et Discussion

Les extraits acétate d'éthyle des fleurs de l'espèce *Gentiana asclepiadea* et de l'espèce *Gentiana septemfida* ont une activité réductrice similaire de notre extrait n-butanolique avec une absorbance de l'ordre de $0,298 \pm 0,03$ et $0,297 \pm 0,02$ nm respectivement. Ainsi que, notre extrait acétate d'éthyle a un effet réducteur proche à celui de l'extrait acétate d'éthyle de ces deux espèces.

Les racines de l'espèce *Gentiana verna* possèdent une efficacité réductrice supérieure à notre plante avec des absorbances de l'ordre de $0,670 \pm 0,04$, $0,530 \pm 0,02$ et $0,394 \pm 0,02$ nm pour les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanolique respectivement.

Les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle des fleurs, feuilles et racines de l'espèce *Gentiana cruciata* ont montrés un pouvoir moins puissant à celui de notre fraction n-butanolique avec des absorbances maximal à 1 mg/mL allant de 0,180 à 2,95 nm. Pour l'extrait méthanolique des fleurs et feuilles de cette espèce, il possède un pouvoir moins intéressant à notre extrait brut avec une absorbance maximal de l'ordre de 0,160 nm et 0,174 nm respectivement.

De même, les trois extraits des fleurs, feuilles et racines de l'espèce *Gentianella caucasea* ont une activité réductrice significativement plus puissante à celle de nos extraits, justifié par les absorbances maximal obtenue à une concentration de 1 mg/ml comprise entre 0,425 à 0,977 nm.

I.4.1.6. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

La capacité réductrice de notre plante a été également étudiée par une méthode basée sur la mesure de la diminution d'absorbance à 450 nm résulte de la réduction cuprique du réactif beaucoup plus stable et facilement accessible CUPRAC [néocuproïne (NC)-cuivre (II)] que les réactifs radicalaires précédents.

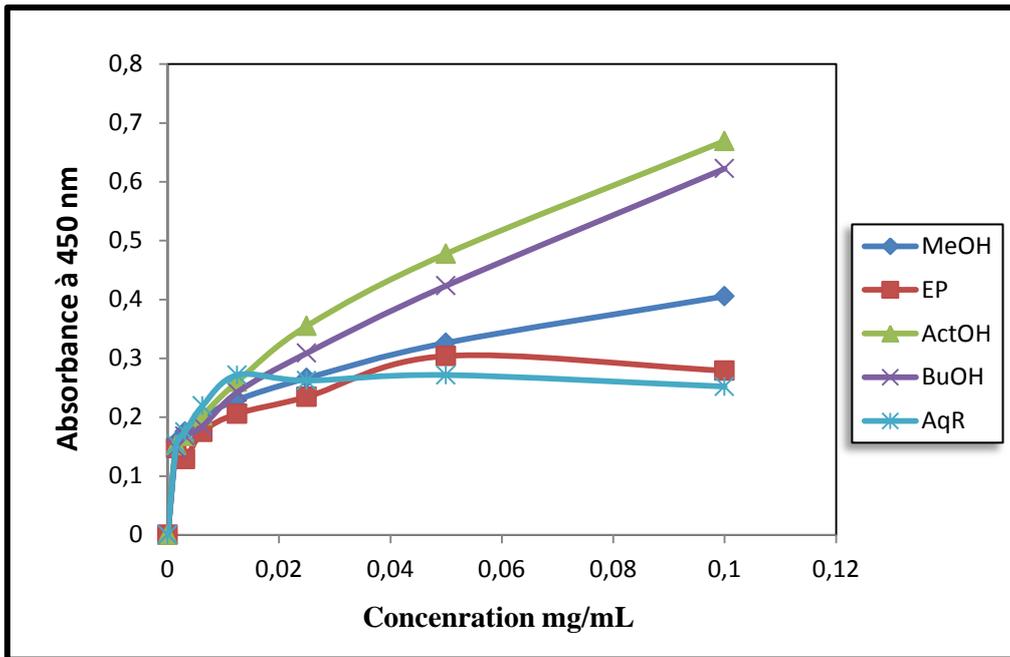


Figure III.19: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC)

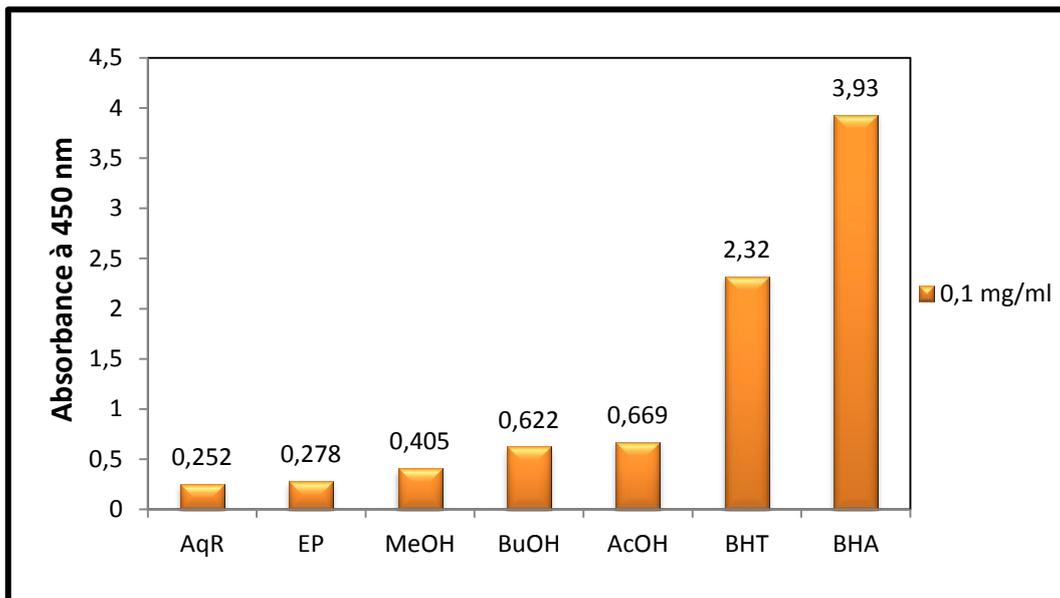


Figure III.20: Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donnée (CUPRAC)

Les résultats obtenus dans la figure III.19 et III.20 sont parfaitement cohérents au virage colorimétrique observé dans le milieu réactionnel.

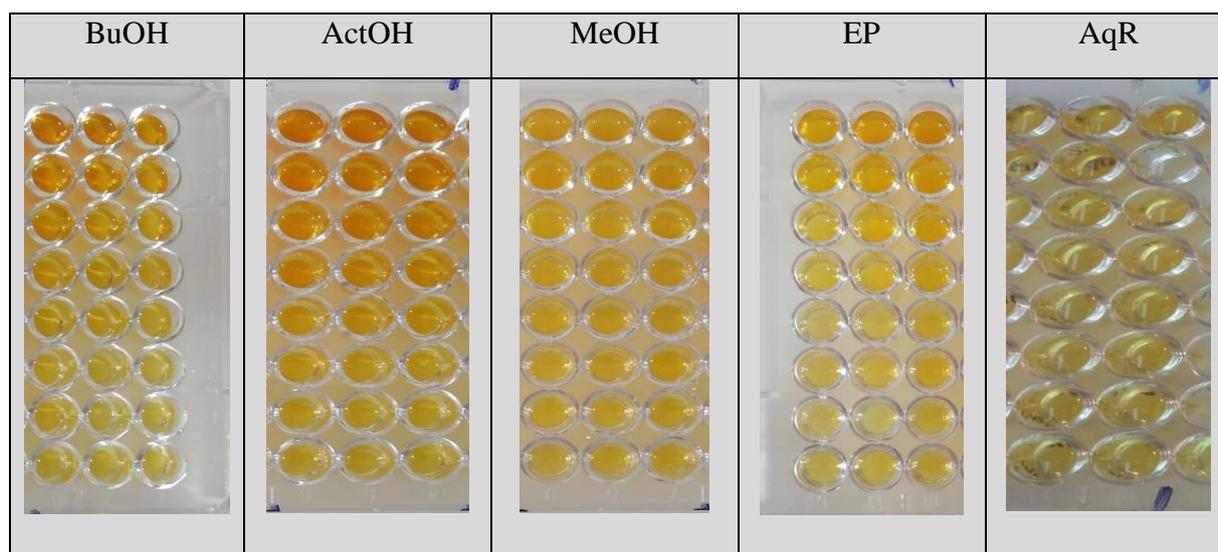


Figure III.21: Photos prises lors du dosage de l'activité CUPRAC

La représentation graphique (Figure III.19) montre que tous les fractions et l'extrait brut ont la capacité de réduire le cuivre (Cu^{2+}) dont cette capacité de réduction cuprique est augmentée en fonction de la dose utilisée de chaque fraction et de l'extrait brut. Plus l'absorbance est élevée, plus la capacité réductrice est intéressante.

A une concentration de 0,1 mg/mL on observe que la fraction acétate d'éthyle a la densité optique la plus élevée ($0,669 \pm 0,04$ nm), suivi de la fraction n-butanolique ($0,622 \pm 0,08$ nm) puis l'extrait brut avec une absorbance atteignant jusqu'à $0,405 \pm 0,05$ nm. Une faible capacité réductrice a été enregistrée avec les deux fractions éther de pétrole et aqueuse résiduelle $0,278 \pm 0,05$ nm et $0,252 \pm 0,04$ nm, respectivement.

Aucun de ces extraits semblaient de meilleure capacité réductrice que le BHT et le BHA, les standards utilisés dans ce dosage dont la meilleure fraction acétate d'éthyle est 3,5 et 6 fois inférieure à celle du BHT et BHA respectivement.

L'efficacité de la réduction cuprique des cinq extraits diminuait dans l'ordre :
acétate d'éthyle > n-butanolique > extrait brut > éther de pétrole > aqueux résiduel.

En partant de ces résultats, on peut déduire que les variations de la capacité réductrice de l'extrait brut et ces fractions testés pourraient être principalement due à la présence et à la teneur élevée en substances réductrices telle que les composés phénoliques, ce qui permet d'expliquer

la forte activité antioxydante remarquée notamment pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique.

Comme la méthode GOR, aucun article dans la littérature n'a testé l'efficacité des extraits organiques et/ou aqueux des plantes de la famille Gentianacea par ce test, ce qui nécessite la comparaison avec d'autres plantes.

Notre extrait brut méthanolique a révélé à une dose de 0,1 mg/mL une capacité de réduction cuprique presque six fois inférieure à celle trouvée pour l'extrait brut éthanolique des parties aériennes de la plante du genre *Tuberaria* (Cistaceae) (**Benoudina et Harieche., 2018**). Ce même extrait a également montré une activité réductrice comparable à celles de l'extrait brut éthanolique obtenue par (**Djebli et Belghobsi., 2018**) pour leur étude sur la plante du genre *Anthericum* (Liliaceae) avec une absorbance égale à 0,400 nm.

I.4.1.7. Test de l'activité phénanthroline

Dans cette méthode on utilise un composé organique la 1, 10-phénanthroline qui est susceptible de former des complexes stable avec le fer ferreux (Fe^{+2}) de couleur rouge orangé résultant à la réduction de ferre ferrique ($FeCl_3$) par les extraits. On nomme ce complexe « ferroïne » et il se prête bien à l'analyse colorimétrique à une longueur d'onde de 510 nm.

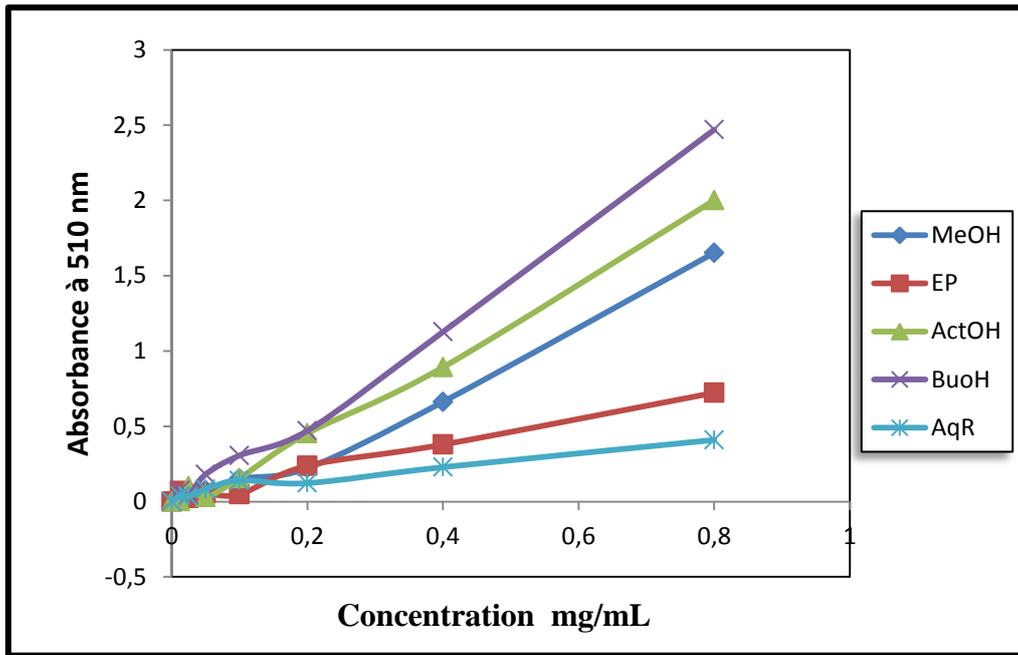


Figure III.22: Courbes des absorbances en fonction des concentrations (phénanthroline)

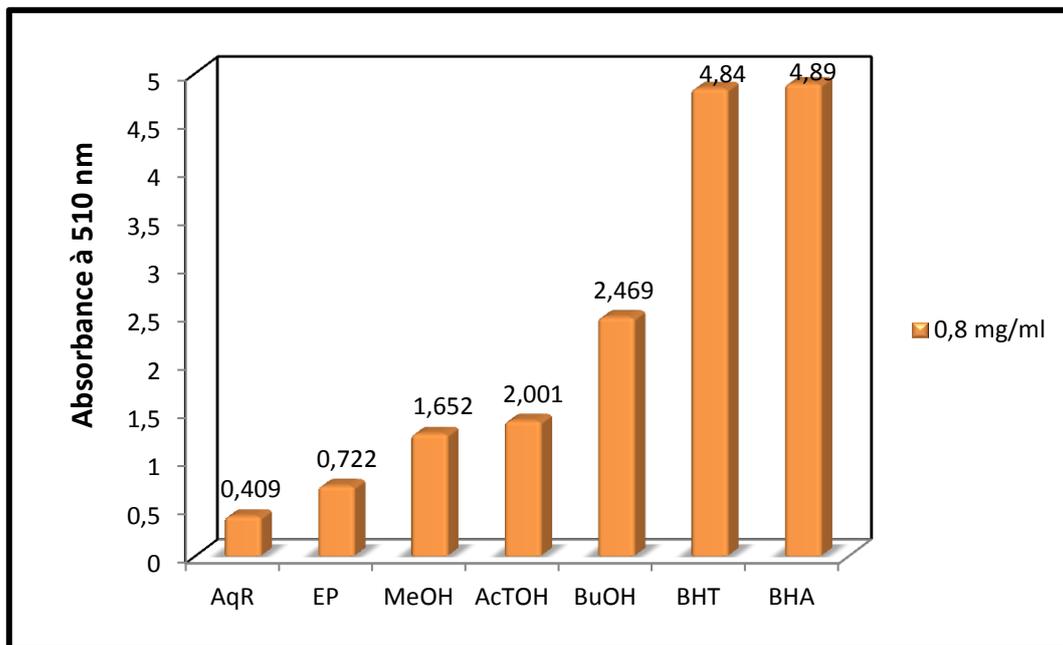


Figure III.23: Les absorbances des extraits testés et des standards classés par ordre croissant à une concentration donnée (phénanthroline)

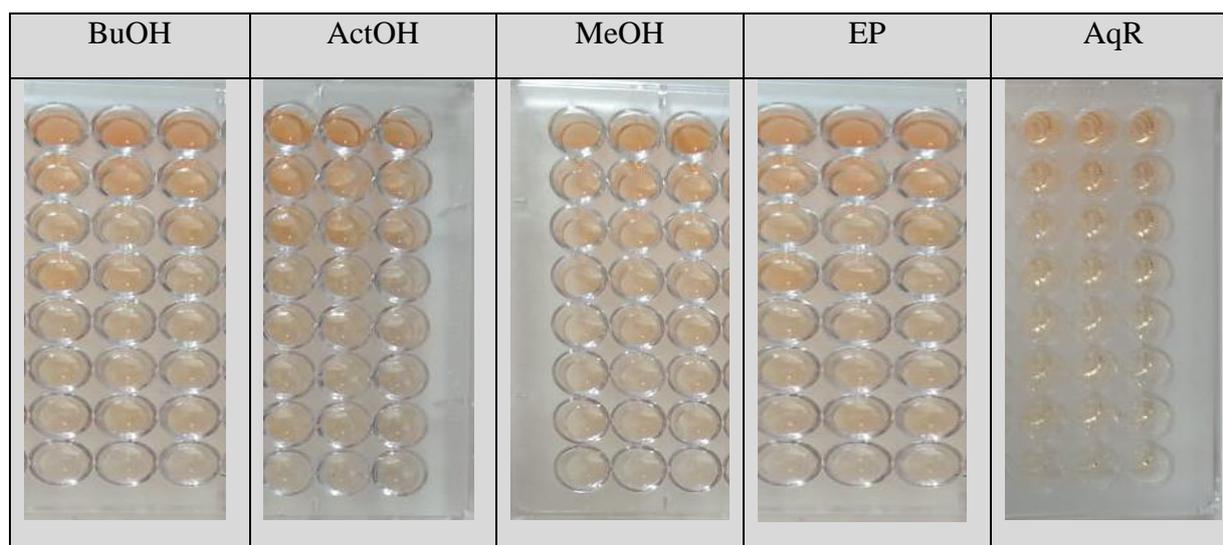


Figure III.24: Photos prises lors du dosage de l'activité phénanthroline

A partir de l'analyse statistique des résultats (figure III.22), on a constaté que tous les extraits présentent une capacité réductrice de fer ferrique considérable et dose dépendant. Le changement de la couleur du milieu réactionnelle du jaune au rouge-orangé (figure III.24), indique la formation des complexes ferroïne, ceci et donc un autre résultat qui confirme la capacité des extraits à donner des électrons pour réduire le fer ferrique. Suivant les indications de la figure III.23, les extraits ont montré une faible activité réductrice par rapport au BHA et BHT en tant que contrôle positif mais cela n'empêche pas qu'un certain nombre d'extraits sont très actifs après le BHA et le BHT vue les absorbances élevées obtenues expérimentalement.

A une concentration de 0,8 mg/mL, la fraction n-butanolique a manifesté une meilleure activité avec une absorbance maximal de l'ordre de $2,469 \pm 0,06$ nm. L'extrait brut exerce une activité réductrice inférieure à celle de la fraction acétate d'éthyle avec une absorbance maximal de $1,652 \pm 0,02$ nm et $2,001 \pm 0,04$ nm respectivement à la même concentration. L'exception est faite pour la fraction éther de pétrole et aqueuse résiduelle qui se sont manifestées par une faible absorbance de $0,722 \pm 0,03$ nm pour l'éther de pétrole et $0,409 \pm 0,01$ nm pour l'aqueux résiduelle par rapport à celle obtenu avec l'ensemble des extraits.

L'efficacité de la réduction cuprique des cinq extraits diminuait dans l'ordre :

n-butanolique > acétate d'éthyle > méthanolique > éther de pétrole > aqueux résiduel

Chapitre III: Résultats et Discussion

Cette différence d'activité entre les fractions n-butanolique, acétate d'éthyle et les autres extraits est due à la richesse des premiers fractions en agentes réducteurs capables de réduire le fer ferrique donc une augmentation de la formation des complexes ferroïne permis eux : les polyphénols particulièrement les dérivés de l'acide hydroxybenzoïques, l'acide hydroxycinnamique et les flavonoïdes.

En résumé, la comparaison de la puissance antioxydante (Figure III.5) des extraits de la plante du genre *Centaurium*, testés par les 7 méthodes antioxydantes (DPPH, ABTS, GOR, Métal chélate, pouvoir réducteur, CUPRAC et activité phénanthroline), a pu montrer une augmentation significative pour les extraits ou les fractions d'acétate d'éthyle et de n-buthanol par rapport à l'extrait brut et les deux fractions d'éther de pétrole et aqueuse résiduelle donc on peut dire que ces deux extraits sont les extraits les plus actives autrement dit les plus antioxydant, suivies par l'extrait brut et les fractions restées. Cette augmentation pourrait expliquer par la richesse de ces deux extraits en en constituants hydroxycinnamiques, hydroxybenzoïques et flavonoïdes structurellement apparentés ayant des propriétés antioxydantes connues.

Tableau III.5 : la comparaison de la puissance antioxydant des extraits

Extraits	CI ₅₀ mg/mL				Absorbance nm		
	DPPH	ABTS	GOR	Métal	PR	CUPRAC	AP
BuOH	0,08 ±0,007	0,019 ±0,009	0,045 ±0,0067	0,07 ±0,42	2,989 ±0,037	0,622 ±0,08	2,469 ±0,06
ActOH	0,086 ±0,005	0,033 ±0,231	0,271 ±0,055	0,091 ±0,005	2,52 ±0,024	0,669 ±0,04	2,001 ±0,04
MeOH	0,092 ±0,008	0,067 ±0,002	0,309 ±0,024	0,1 ±0,070	1,989 ±0,061	0,405 ±0,05	1,652 ±0,02
EP	0,286 ±0,103	0,08 ±0,007	>0,8	0,3 ±0,05	1,191 ±0,16	0,278 ±0,05	0,722 ±0,03
AqR	0,536 ±0,094	0,2 ±0,14	>0,8	0,375± 0,024	0,595 ±0,025	0,252 ±0,04	0,409 ±0,01

PR : pouvoir réducteur /AP : activité phénanthroline

I.4.2. Evaluation de l'activité anti-enzymatique

Dans le but d'identifier si notre plante possède un potentiel antidiabétique et/ou anti Alzheimer, des enzymes cibles thérapeutiques potentielles de ces deux pathologies, en l'occurrence l'alpha- glucosidase et l'acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase respectivement, ont été utilisés comme cibles d'étude anti-enzymatique.

I.4.2.1. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer

I.4.2.1.1. Activité anti- butyrylcholinestérase (in vitro)

C'est une méthode consiste à mesurer la capacité inhibitrice des extraits de notre plante sur l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE) responsable à l'hydrolyse de la butyrylthiocholine iodide (BuCI).

A 412 nm, nous avons remarqué une diminution des absorbances due au non dégradation du substrat butyrylthiocholine iodide par l'enzyme qui s'est engagé au phénomène d'inhibition de la butyrylcholinestérase.

La figure III.25 montre les pourcentages d'inhibition des échantillons et standard à une concentration de 0,1 mg/mL, associés avec l'inhibition maximale atteinte.

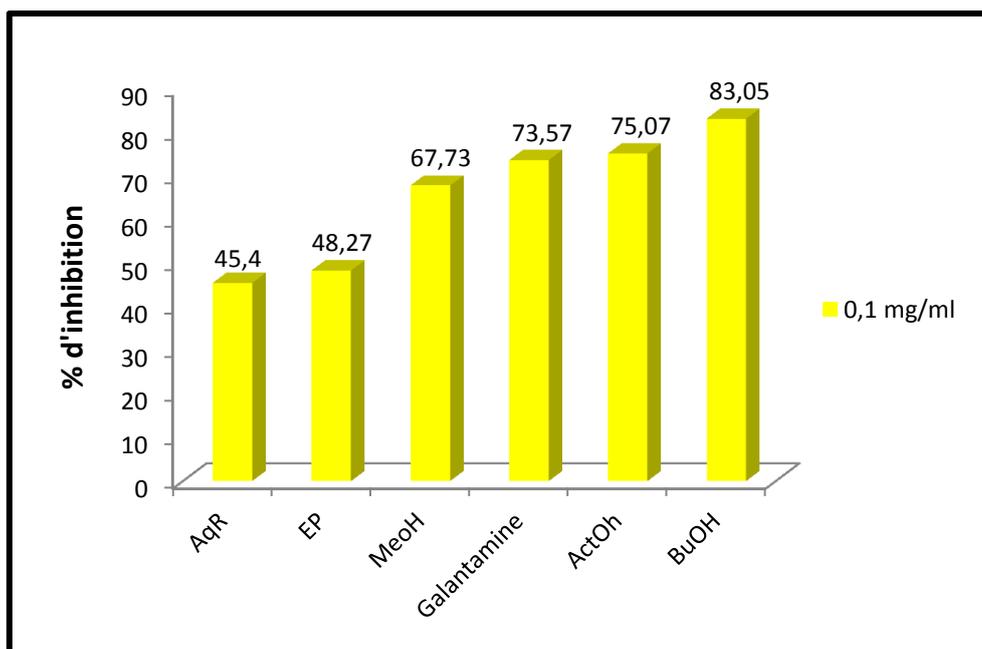


Figure III.25: Les pourcentages d'inhibition des échantillons testés et standard classés par ordre croissant à une concentration donnée (test anti-butrylcholinestérse)

La réduction de la couleur jaune foncée du milieu réactionnel est considérée dans ce test comme un indicateur qui permet de détecter l'activité inhibitrice de la plante. Le virage colorimétrique observé (figure III.26) est parfaitement cohérent aux résultats obtenus.

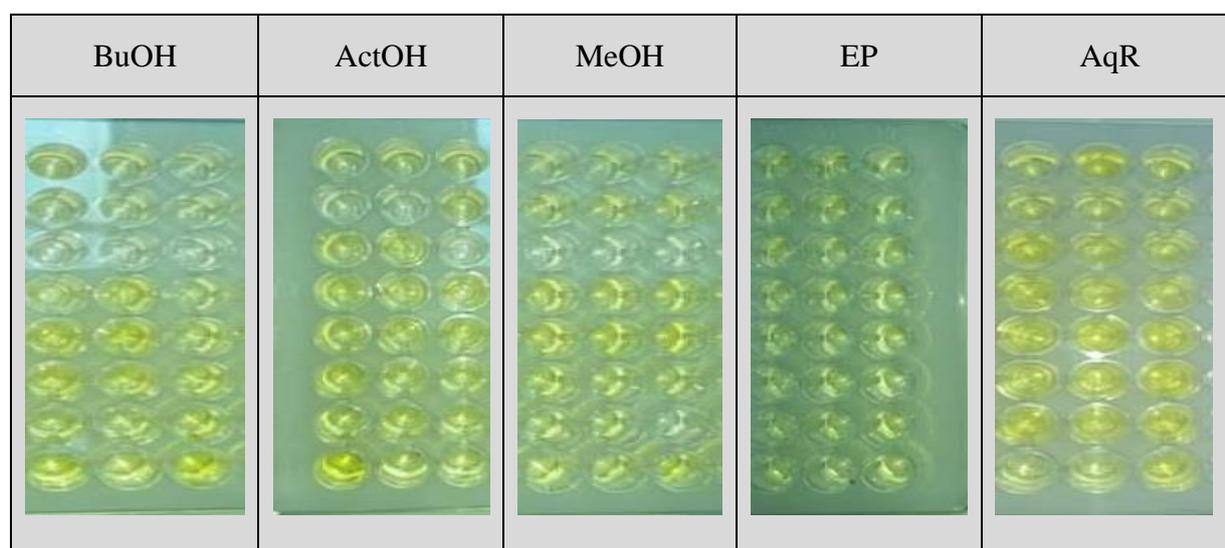


Figure III.26: Photos prises lors du dosage de l'activité anti- butrylcholinestérse

Chapitre III: Résultats et Discussion

En générale, à une faible concentration de 0,1 mg/mL, les extraits affichent une activité forte à modérée contre BChE (figure III.25). La meilleure inhibition de la BChE a été causée par la fraction n-butanolique ($83,05 \pm 0,03\%$), néanmoins la fraction acétate d'éthyle qui exerce aussi un grand effet inhibiteur vis-à-vis de la BChE ($75,07 \pm 0,02\%$). Comparativement avec le standard ces deux fractions possèdent une capacité inhibitrice qui excède largement celle du galantamine. D'autre part, l'extrait brut méthanolique exhibe un effet inhibiteur significatif avec un pourcentage d'inhibition égale à $67,63 \pm 0,005\%$ proche de celui de galantamine. Cependant, les autres extraits éther de pétrole et aqueux résiduel ont été présentés un faible effet inhibiteur contre la BChE avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de $48,27 \pm 0,04\%$ et $45,40 \pm 0,12\%$ respectivement, légèrement inférieure à celui du standard.

L'activité inhibitrice de l'enzyme butyrylcholinestérase est diminuée entre les extraits dans l'ordre suivant : butanol > acétate d'éthyle > méthanol > éther de pétrole \approx aqueux résiduel.

D'après la recherche bibliographique concernant la composition chimique et la recherche antérieure de cette plante du genre *Centaurium* présentée au début de ce travail, on a trouvé que cette plante renferme une quantité considérable d'alcaloïdes, des hétérosides secoiridoidiques (quatre types différentes) (sont des monoterpènes servant souvent d'intermédiaires dans la biosynthèse d'alcaloïdes) : la swertiamarine, le swéroside...etc différentes xanthones (sept types) parmi elles la méthylxanthone et aussi des flavonoïdes, la présence de ces derniers est détecté aussi dans notre pratique par le dosage quantitative totaux des flavonoïdes et par HPLC. Ces différents composés possèdent plusieurs propriétés biologiques parmi elles ; la capacité d'inhiber les cholinestérases en tant d'inhibiteurs enzymatiques.

Notre étude de la littérature a indiqué qu'il y a des études concernant l'activité inhibitrice du cholinestérase pour la famille Gentianaceae, c'est le cas par exemple de l'étude réalisée par (Urbain et al., 2004) sur les extraits méthanolique des feuilles de l'espèce *G. campestris* (*Gentiana*) et l'espèce du genre *Gentianella* qui montré une activité notable contre les cholinestérases. Dans cette étude, ils ont trouvé une corrélation positive entre la capacité d'inhibition des cholinestérases et la teneur en xanthone.

Chapitre III: Résultats et Discussion

À la lumière de la conclusion de l'étude susmentionnée et d'après la composition chimique et la recherche antérieure, on peut supposer que les xanthones pouvant exister dans notre espèce pourrait être responsables de l'effet inhibiteur de la BChE. Comme il pourrait être spéculé que l'effet inhibiteur de notre plante contre cette enzyme peut être attribué à la présence des alcaloïdes et/ou les flavonoïdes dans cette plante dont (Conforti et al., 2009) ont été signalé les flavonoïdes comme des bonne inhibiteurs de la butyrylcholinestèrase dans une étude réalisé sur deux flavonoïdes l'isoorientine et l'isovitexine. Comme il peut être que les composés responsables de l'activité inhibitrice de notre plante provenir de la classe chimique des secoiridoïdes dont la sécologanine et l'acide loganique ont été signalé comme ayant une forte inhibition des cholinestérasés (Pereira et al., 2010).

Donc l'effet inhibiteur de nos extraits est probablement lié à la présence d'un ou plus de ces composés et à la teneur notamment pour l'extrait de butanol et d'acétate d'éthyle qui donnent un fort effet.

En comparant nos résultats avec d'autres études sur des plantes du même genre ou de la même famille traitant différents extraits. D'après les résultats obtenus d'une étude réalisée par (Senol et al., 2012) sur les extraits au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol des fleurs, feuilles et racines des cinq espèces de genre *Gentiana* (*Gentiana asclepiadea*, *Gentiana cruciata*, *Gentiana olivieri*, *Gentiana septemfida*, *Gentiana verna*) et *Gentianella caucasea*, on peut dire que :

Les résultats d'inhibition obtenus avec les extraits méthanolique des fleurs, feuilles et racines de l'espèce *Gentiana asclepiadea*, *Gentiana cruciata*, *Gentianella caucasea*, *Gentiana olivieri* ont montré une capacité inhibitrice sur la butyrylcholinestèrase nettement faible à celle de notre extrait méthanolique avec des pourcentages d'inhibition comprise entre 2,54% jusqu'à 50,72%. Pour l'extrait méthanolique de l'espèce *Gentiana verna* et l'espèce *Gentiana septemfida* aucun effet inhibiteur est obtenus.

De même, les extraits acétate d'éthyle des fleurs, feuilles et racines de cinq espèces du genre *Gentiana* et l'espèce du genre *Gentianella* ont montrés une activité inhibitrice moins importante à celle de notre extrait acétate d'éthyle avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 3,02% à 19,62%.

Chapitre III: Résultats et Discussion

D'après cette comparaison, on constate que nos extraits ; méthanol, butanol, acétate d'éthyle même l'éther de pétrole et l'aqueux résiduel qui possèdent un effet faible sont signalés comme des inhibiteurs de la BChE plus efficaces que les trois extraits des fleurs, feuilles et racines des espèces utilisés dans cette étude.

Nos résultats d'inhibition obtenus pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique sont presque comparables à celui de la plante *Centarium umbellatum* (*Centaurium*) obtenue par les travaux de (Neagu et al., 2016) avec des pourcentages d'inhibition sur la BChE oscillent de 74,55% à 89,22%, bien que les extraits utilisés ne sont pas les mêmes. En effet, Neagu et al ont testé les parties aériennes de cette espèce sous forme d'extrait aqueux et éthanolique.

I.4.2.1.2. Teste anti- acétylcholinestérase (in vitro)

Dans cette méthode la bioactivité de métabolites secondaires des extraits passe en générale par l'inhibition de l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase ce qui conduit à l'inhibition du catabolisme de l'acétylthiocholine iodide.

La variation de l'absorbance à 412 nm permis de déterminer si il y'a ou non une activité anti- AChE, dont la diminution d'absorbance indique un accroissement de cette activité.

Tableau III.6: résultats inhibiteurs de l'extrait brut et ces fractions préparées par les parties aériennes de la plante du genre *Centaurium* contre l'acétylcholinestérase.

Extraits	Méthanolique	n-butanolique	Ether de Pétrole	Aqueux résiduel	Acétate d'éthyle
Concentration mg/mL	0,2-0,03125	0,2-0,03125	0,2-0,03125	0,2-0,03125	0,2-0,03125
% d'inhibition	0	0	0	0	0

Les résultats des pourcentages d'inhibition n'ont montré aucun effet inhibiteur quel que soit l'extrait de la plante utilisée.

La figure ci-dessous confirme les résultats des pourcentages d'inhibition obtenus dont il n'y a pas une réduction de la couleur jaune pour les cinq extraits à différentes concentrations ce

qui indique que le fonctionnement de cette enzyme est déroulé et la formation de l'acide -5-thio 2-nitrobenzoïque (TNB) responsable de la couleur jaune est augmentée.

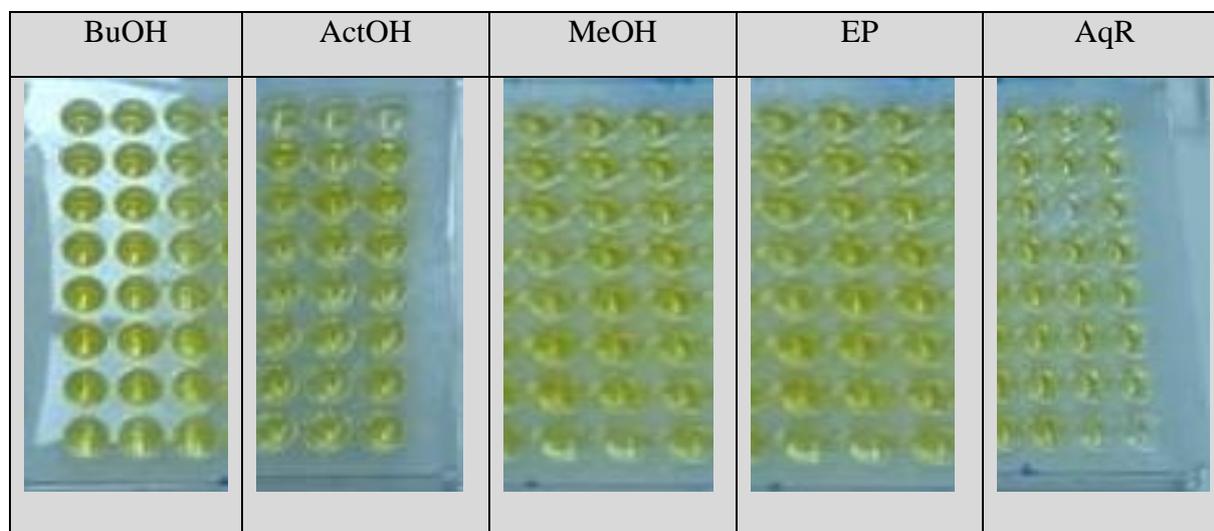


Figure III.27: Photos prises lors du dosage de l'activité anti-acétylcholinestérase

L'extrait éthanolique et aqueux résiduel des parties aériennes de *Centarium umbellatum* (*Centaurium*) étudiée par (Neagu *et al.*, 2016) a démontré un taux d'inhibition de l'AChE égale à 74,24% et 94,24% respectivement à une dose de 3 mg/mL.

De même, l'étude réalisée par (Senol *et al.*, 2012) sur les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanolique des fleurs, feuilles et racines des quatre espèces de genre *Gentiana* (*Gentiana cruciata*, *Gentiana olivieri*, *Gentiana septemfida*, *Gentiana verna*) et *Gentianella caucasea* ont montré une activité légèrement à modéré contre l'AChE avec des taux d'inhibition comprise entre 1,82 % à 53,65%. Tandis que les extraits de *Gentiana asclepiadea* n'ont montré aucun effet inhibiteur malgré ils sont riche en composés bioactive (Gentiopicroside, Swertiamarin, Isoorientin, flavonoïdes).

Si on compare nos résultats de l'effet inhibitrice des extraits de la plante sur l'enzyme AChE avec ceux de la bibliographie, on constate que soit nos extraits ne contiennent pas des composés bioactifs à effet inhibiteur de l'activité de l'AChE malgré la composition chimique et la recherche antérieure de notre plante montrent qu'il y a différentes composés bioactifs qui sont capables d'inhiber l'activité de cette enzyme soit ces composés bioactive sont existents vraiment mais ne possèdent pas une complémentarité avec le site actif de

l'acétylcholinestérase c'est le cas par exemple des flavonoïdes, comme cet résultat négative peut être lié à des conditions expérimentale.

I.4.2.2. Evaluation de l'activité anti- diabétique par le test d'inhibition de l' α -glucosidase (in vitro)

La surveillance des taux de glucose sanguin postprandial utilisant des inhibiteurs d'enzymes hydrolysant les glucides complexes provenant de sources naturelles est considérée comme une approche thérapeutique efficace.

Cette méthode consiste à mesurer l'activité inhibitrice des extraits de *Centaureum sp* contre l'enzyme α -glucosidases.

A 400 nm, nous avons constaté une diminution des absorbances due à la non hydrolyse du substrat p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside en glucose et p-nitrophenol par l'enzyme qui s'est engagé au phénomène de l'inhibition de α -glucosidases.

A cause de la forte activité antidiabétique des deux extraits acétate d'éthyle et n-butanolique, nous étions obligés d'établir une gamme de dilution pour les cinq extraits beaucoup plus étendue que celle du deux test enzymatiques précédents.

A des fins comparatives, on utilise la quersetine et l'acarbose comme des standards.

La figure III.28 montre les pourcentages d'inhibition des échantillons et standard à une concentration de 0,125 mg/ml, associés avec l'inhibition maximale atteinte.

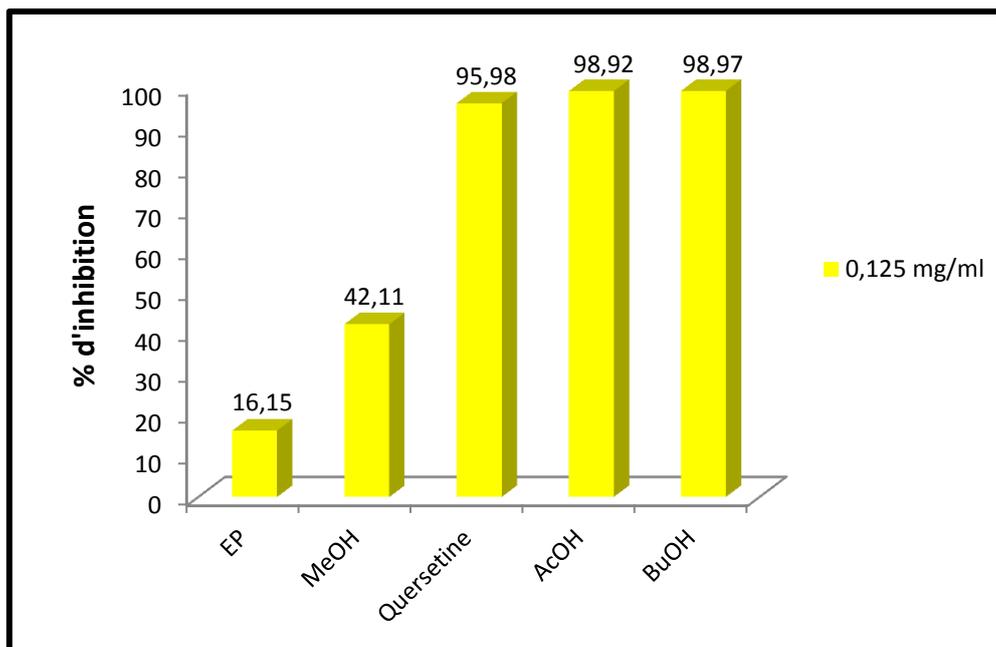


Figure III.28 : Les pourcentages d'inhibition des échantillons testés et standard classés par ordre croissant à une concentration donnée (test α -glucosidases)

La figure ci-dessous illustre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test sauf pour la fraction aqueux résiduelle qui indique que le fonctionnement de cette enzyme est déroulé et la formation de p-nitrophenol est augmentée.

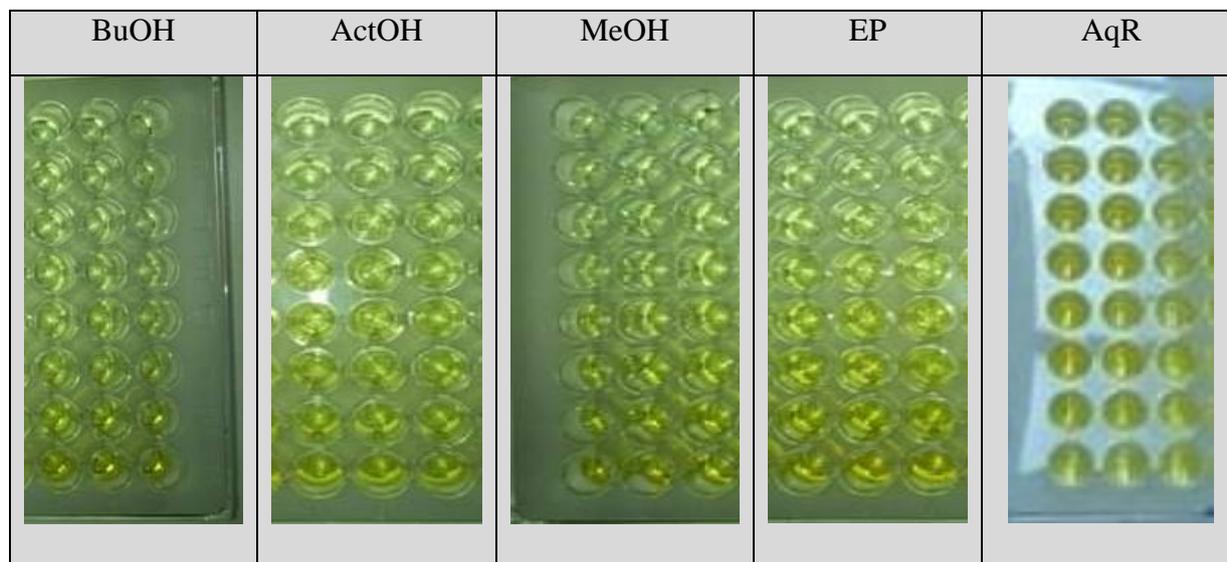


Figure III.29: Photos prises lors du dosage de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidases

Chapitre III: Résultats et Discussion

Les activités inhibitrices de l' α -glucosidase ont diminué entre les extraits dans l'ordre suivant : butanol \approx acétate d'éthyle > méthanol > éther de pétrole, tandis que la fraction aqueuse résiduelle est inactif (non représenté). A partir de résultat des pourcentages d'inhibition des extraits à une très faible dose (figure III.28), Il est à noter, qu'une inhibition plus forte et presque totale de l'activité de l' α - glucosidase a été rapportée pour l'acétate d'éthyle et le butanol contre l'extrait méthanolique et la fraction éther de pétrole.

Ces deux fractions sont exhibent une activité inhibitrice qui dépasse même celui des standards dont ils présentent des efficacités meilleures que celle d'acarbose qui est à une concentration de 0,3125 mg/mL exerce une activité inhibitrice de l' α - glucosidase moyenne de l'ordre de $54,86 \pm 1,79\%$ et leur activité inhibitrice presque totale est obtenue à une dose très élevée de 5 mg/ml avec un pourcentage d'inhibition maximal égale à $91,05 \pm 0,72\%$. Tandis que les fractions n-butanolique et acétate d'éthyle à une dose de 0,3125 mg/ml, ces pouvoirs inhibiteurs se sont traduit par des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 99,69% et 95,17% respectivement donc une inhibition de l'enzyme presque total à une faible dose.

Les auteurs ont conclu que les niveaux élevés de constituants polyphénoliques particulièrement les flavonoïdes contenus dans les fractions polaires peuvent agir en inhibent la dégradation de p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside en interagissant directement avec l'enzyme alpha-glucosidase (Yang *et al.*, 2014). Cette inhibition compétitive peut être expliquée par le fait que, nos extraits actifs possèdent des composés portant des groupements fonctionnels proches de ceux du substrat autrement dit, ayant une complémentarité avec le site actif de l'enzyme, ce qui l'a déplacé du site actif de l'enzyme.

Donc la forte activité inhibitrice de la fraction butanol et acétate d'éthyle à différentes concentrations est liée à leur teneur en composés phénolique particulièrement les flavonoïdes, qui malgré leur quantité considérable dans cette plante par rapport aux d'autres, ils sont très efficaces comme des composés ayant une grand complémentarité avec le site actif.

D'après les résultats de dosage d' α -glucosidase effectués dans la présente étude ont peut proposer cette plante du genre *Centaurium* comme agent antidiabétique fonctionnel, une propriété associée au potentiel inhibiteur enzymatique de leur constituants polyphénoliques en particulier les flavonoïdes.

Nos résultats d'inhibition obtenus pour les fraction acétate d'éthyle et n-butanolique de la plante du genre *Centaurium* sont nettement excellentes (dont tellement forte même à faible concentration on ne peut pas calculé la CI_{50}) par rapport à celui de *Gentiana olivieri* (*Gentiana*) obtenues par les travaux de (Orhan *et al.*, 2014) avec une valeur de CI_{50} égale à 198,2 mg/mL, bien que l'extrait utilisé n'est pas le même. En effet, Orhan et al ont testé les parties aériennes de cette espèce sous forme d'extrait hydro-alcoolique (80% éthanol).

I.4.3. Evaluation de l'activité antifongique

Les antifongiques sont des substances qui détruisent les champignons ou qui empêchent leurs développements.

Les plantes riches en métabolites secondaires possèdent cette propriété antifongique comme un système de défense ce qui permet la protection de la plante contre nombreux agressions pathogènes comme les bactéries et les champignons.

Le but de ce test est évaluer la capacité de la plante de limiter le développement des champignons.

Après 7jours d'incubation à 28 °C, on observe comparativement au témoin positive (DMSO) une diminution progressive de croissance mycélienne d'*Alternaria sp* selon les concentrations des extraits (1, 2, 4, 8, 16 mg /mL).

Les résultats sont exposés dans tableau III.7 qui présente les diamètres des zones de développement et le tableau III.8 qui montre le taux d'inhibition.

Tableau III.7 : Diamètres de zone développement (cm) de moisissure d'*Alternaria sp* en différentes concentrations.

Concentration (mg/mL)	1	2	4	8	16
Extraits					
MeOH	5,05	4,95	4,91	4,9	4,8
ActOH	4,32	4,17	4,12	4	3,95
BuOH	4,32	4,15	3,98	3,93	3,9
AqR	6,8	6,9	7	7	7,1

Tableau III.8 : Pourcentages d'inhibition des moisissures (%)

Concentration (mg /mL)	1	2	4	8	16
Extraits					
MeOH	8,18	10	10,72	10,9	12,72
ActOH	6,08	9,43	10,43	13,04	14,13
BuOH	6,08	9,78	13,47	14,65	15,21

Pour mieux élucider le pouvoir antifongique des extraits de *Centaureum sp*, les diamètres de la zone d'inhibition et les pourcentages d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes (Figure III.30 et III.31)

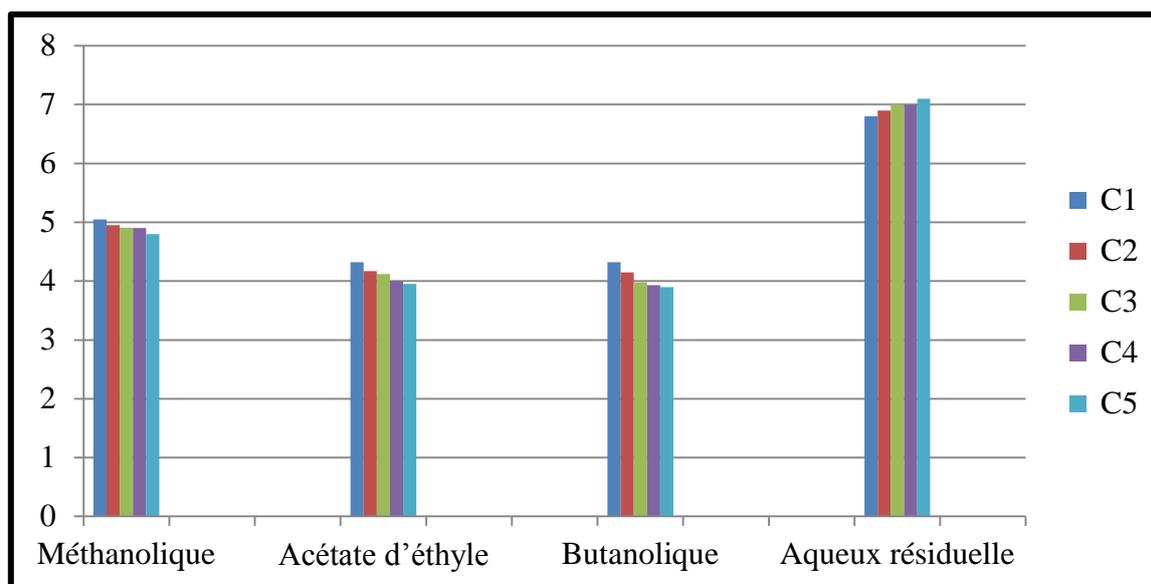


Figure III.30 : Diamètres de zone de développement (cm) de moisissure d'*Alternaria sp* en différentes concentrations.

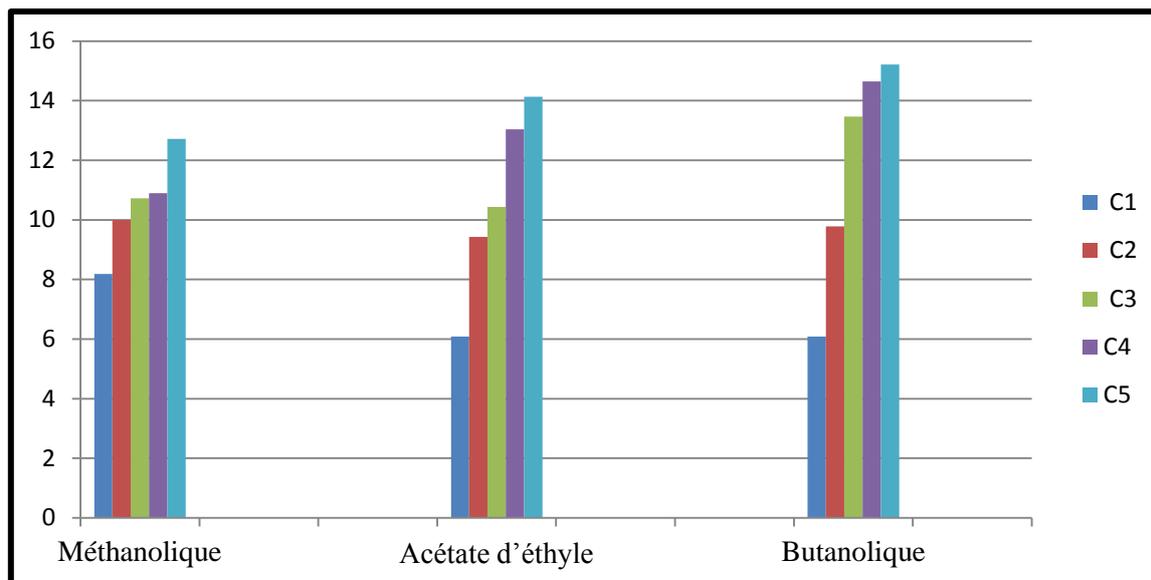


Figure III.31 : Pourcentages d'inhibition des moisissures(%)

Ces figures indiquent que les extraits testés ont une très faible activité antifongique à l'exception pour l'extrait aqueux résiduel qui présente aucune activité, cette activité est proportionnelle à la concentration. De ces figures nous avons déduit qu'à forte concentration de 16mg/mL l'extrait butanolique de *centaurium sp* présente un effet plus élevé contre les moisissures par rapport aux autres fractions par pourcentage d'inhibition de 15,21% suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique par pourcentage d'inhibition de 14,13% et 12,72%, respectivement, tandis que l'extrait aqueux résiduelle la croissance de souche d'*Alternaria sp* est remarquable dont le diamètre 7,1cm est plus élevé par rapport au témoins (DMSO) 4,6 cm donc cette extrait se manifeste une activité stimulatrice .

Les présents résultats ont révélé que les deux extraits butanolique et d'acétate d'éthyle sont riches en composés phénoliques et les flavonoïdes car ces deux fractions sont les plus actives.

Une absence d'activité dans l'extrait aqueux résiduel peut être due à la consommation des terpènes en tant que source de carbone.

Nos résultats indiquent que *Centaurium sp* est une plante qui nécessite pas une importance dans ce domaine, parce que les trois extraits de la plante méthanolique, butanolique et d'acétate d'éthyle ont montrés une très faible activité antifongique (**Hayen et Harder., 1995**).

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étude phytochimique suivi de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux, suivie par l'identification et la quantification des polyphénols par HPLC-DAD. Ainsi que de tester quelques activités biologiques de l'espèce *Centaurium sp* qui appartient à la famille Gentinacea.

L'évaluation du contenu en polyphénols et flavonoïdes totaux, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu et du trichlorure d'aluminium indique que tous les extraits sont riches en ces composés mais avec des valeurs variables en fonction du type de l'extrait.

L'analyse réalisée par HPLC-DAD sur notre plante montre la richesse des parties aériennes de cette espèce en composés phénoliques, qualitativement en dérivés hydroxybenzoïques, dérivés hydroxycinnamiques et flavonoïdes de type flavonols.

Le pouvoir antioxydant des extraits de la plante a été évalué in vitro par l'application de plusieurs tests : DPPH[•], ABTS^{•+}, CUPRAC, GOR, métal chélate et activité phénanthroline ainsi le test de pouvoir réducteur, ces tests montrent que la plante possède un potentiel antioxydant élevé, cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits en composés phénoliques, particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes.

L'activité anti-Alzheimer de la plante a été testée in vitro par les deux tests : anti-butrylcholinestérase qui indique que tous les extraits étudiés de *Centaurium sp* sont dotés d'une activité anti-Alzheimer élevée à modérée, par contre les résultats d'anti-acétylcholinestérase n'ont montré aucun effet inhibiteur pour tous les extraits de la plante.

L'activité antidiabétique de *Centaurium sp* a été évaluée par le test alpha-glucosidase, d'après les résultats obtenus on a constaté que cette plante présente un excellent effet anti-hyperglycémiant. Cet effet pour l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol s'est avéré meilleur que celui des standards utilisés.

L'évaluation du pouvoir antifongique a été évaluée sur les moisissures d'*Alternaria sp*, par la méthode de diffusion sur milieu de culture PDA. Nos résultats montrent que les extraits testés ont une très faible activité antifongique à l'exception pour l'extrait aqueux résiduelle qui n'a donné aucune activité.

Enfin, les résultats obtenus de cette étude montrent que la *Centaurium sp* est riche en composés bioactifs qui peuvent être employés pour différentes applications thérapeutiques. Des essais complémentaires seront nécessaires pour confirmer les activités mise en évidence.



Références

Bibliographiques



-A-

Abdel-Hameed, E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem*, 114(4),1271-1277.

Abe, E., Delye, S.G., Alvarez, J.C. (2010). Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique.*, 22 (2), 51-59.

Aighewi, B.A., Akoroda, M., Asiedu, R. (1998). Preliminary studies of seed yam production from minisets with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*), 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi). pp 22-28.

Aniszewski, T. (2007). Alcaloïdes - Secrets de la vie. Chimie des alcaloïdes, importance biologique, applications et rôle écologique. 1ère éd. Elsevier, p 316.

Ayres, D.C., Loike, J.D. (1990). Lignans : Chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press, England. p402.

-B-

Baba aissa, F. (2000). Les plantes médicinales en Algérie Edit. Bouchéne et AD. Diwan, Alger, p 368.

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia Smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II. Français. p 184.

Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., Lushchak, V. I. (2016). Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open Life Sciences*, 11(1), 298-307.

Beddou, F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L.* et *Anvillea radiata Coss. et Dur.* Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et biochimie, sous la direction de Bouheroum Mohamed, Université Abou Beker Belkaid. Faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers.

Belbache, H. (2003). Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf.* Mémoire de magister en chimie organique, sous la direction de Benayache, université Mentouri Constantine. pp 16-20.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée traditionnelle marocaine: Médecine arabe ancienne et savoir faire. ISBN 2- 910728-03-X. Ibis Press.

Benaissa, O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat en science en chimie organique, sous la direction de BENAYACHE Samir, Université Mentouri, Constantine. p63.

Benhouhou, S. (2015). A brief over view on the historical use of medicinal aromatic d'Algeria consulté. Université Mohamed khider-Biskra Faculte des Sciences de la Nature et

de la vie. Exacts et de la vie .Département des sciences Agronomique, Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région médicinales des Aurès.

Benoudina, F., Harieche, M. (2018). Investigation phytochimique et potentiel antioxydant d'une plante algérienne du genre *Tuberaria* (Cistaceae). Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Master, Spécialité : *biochimie appliquée*. Université des Frères Mentouri. Constantine .p120.

Bentahar, A. (2017). L'ulcère gastroduodéal à *Helicobacter pylori* : Aspects épidémiologique et phytothérapeutique traditionnel en Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat en Sciences Biologique, Spécialité: physiologie animale, sous la direction de khennouf Seddik , Université Ferhat Abbas 1, Sétif. p204.

Biaye, M. (2002). Action pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat pour obtenir le grade de docteur en pharmacie, sous la direction de M.Emmanuel Bassene. Université Cheikh Anta Diop De Dakar. p57.

Bisoli, E., Garcez, W.S., Hamerski, L., Tieppo, C., Garcez, F. R. (2008). Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, 13(11), 2717-2728.

Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E. (2004). New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 50, 120-123.

Boros, B., Jakabova, S., Dorneyi, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7972–7980.

Boudjouref, M. (2011). Etude d'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie, sous la direction de Belhattab Rachid, Université Ferhat Abbas, Algérie, Sétif. p 99.

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

Bruneton J. (2008). Pharmacognosie : Phytochimie plantes médicinales. Edition : Technique et Documentations. p1120.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2e édition, Tec et Doc., Lavoisier, Paris. p 915.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Edition tec & doc, Paris, pp 783-823.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3ed. Ed. Médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris. pp 783-785.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3ème éd. Paris. France. p 1120.

Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2ème Ed : TEC & DOC. Paris. p 337.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e éd.). Lavoisier, Paris, France. p 1292.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4ed. Lavoisier, Paris. pp 783-785.

Bruneton, J. (2009). Phytochimie plantes médicinales. Pharmacognosie, 4.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème éd. Lavoisier. Tec et Doc. Paris. p 1240.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3éd. Ed. . Technique et Documentation : Lavoisier, Paris, France. p1120.

-C-

Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. Food Chemistry, 93(2), 223-226.

Carbonel Villanueva, K.N. (2017). Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Gentianella nitida* en un modelo experimental inducido por paracetamol . TESIS para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica, universidad nacional mayor de san marcos facultad de medicina. p98.

Conforti, F., Menichini, F., Loizzo, M. R., Statti, A. G., Rapisarda, A., Menichini, F., Houghton, P.J. (2008). Antioxidant, α -amylase inhibitory and brine-shrimp toxicity studies on *Centaurea centaurium* L. methanolic root extract. Natural Product Research, 22(16), 1457–1466.

Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F. (2009). Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. Fitoterapia, 80(1), 62-67.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4), 564- 582.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. p384.

Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Dreza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P.O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15(6) , 964-970.

-D-

Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L. (2003). Natural product :their chemistry and biological significance, Journal of the American Oil Chemistry Society, 80, 65-70.

Djebli, L., Belghobsi, N.H. (2018). Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante algérienne du genre *Anthericum* (Liliaceae). Mémoire de Master, Spécialité : *biochimie appliquée*. Sous la direction de Boutaghane naima, Université des Frères Mentouri, Constantine. 89p.

Djemoui, D. (2012). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Mémoire Master Academique, Spécialité : Chimie Appliquée. p53.

Donaldson, M.S. (2004). Nutrition and cancer : A review of the evidence for an anticancer diet. *Nutrition Journal*, 3(19), 1-21.

Douglas, G.W., Meidinger, D., Pojar J. (1999). Illustrated Flora of British Columbia. Dicotyledons (Diapensiaceae through Onagraceae), province de la Colombie-Britannique, Ministry of Environment, Lands and Parks de la Colombie-Britannique et Ministry of Forests de la Colombie-Britannique, Victoria, 3, p 401.

-E-

Ekoumou, C. (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako. p145.

Ellis, G.P. (2009). The chemistry of heterocyclic compounds, chromenes, chromanones, and chromones. John Wiley & Sons, USA. p1196

Erlund, I. (2004). Examen des flavonoïdes Quercétine, Hesperetin et Naringenin. Sources alimentaires, bioactivités, biodisponibilité. *Nutrition Research*. 24(10) :851-874.

-F-

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

Ferhat, M., Kadi, I., Lahouaou, A. (2009). Recherche de substances bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Coss et Dur. Mémoire pour obtenir Le Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie(DES)- option : biochimie. universite mohamed boudiaf, m'sila. mémoire on line.

Fernández prieto, J., Pérez, R., Bueno, Á., Cires, E. (2012). A new endemism for the Azores : the case of *Centaureum scilloides* (L. f.) Samp. *Plant Systematics and Evolution*, 298 (10), 1867-1879.

Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.

Ford, R.A., Hawkins, D.R., Mayo, B.C., Api, A.M. (2001). The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39 (2), 153-162.

Fouché, J. G., Marquet, A., Hambuckers, A. (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament. In Exposition temporaire du (19).

Fournier, P. (1961). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editions Lechevalier, Paris. --Fournier, P., 1961. Les Quatre Flores de France. Editions Lechevalier, Paris.

Fraga, CG., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*, 31(6), 435–445.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.

-G-

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15(12), 8813- 8826.

Gee, J.M., Johnson I.T. (2001). Polyphenolic compounds : interactions with the gut and complications for human health. *Current Medicinal chemistry*, 8(11), 1245-55.

Geissamn, T.A. (1972). Biosynthesis. Royal Society of Chemistry, England. p295.

Gertsch, J., Tobler, R.T., Brun, R., Sticher, O., Heilmann, J. (2003). Antifungal, antiprotazoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryl naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Pharmacology*, 69, 420-424.

Guignard, J.L. (1998). Abrégé de botanique, Masson (Ed). Paris. p 212.

Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.

-H-

Hagerman, A.E. (2002). Tannin Chemistry, Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).

Haloui, M. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*, *J Ethnopharmacol* ,71(3), 465-72.

Hans et Kothe. (2007). Contribution à l'étude des composés phénoliques des graines de *Myrtus communis* L. *Plantes médicinales et phytothérapie* .p24.

Harbone, J.B. (1993). Introduction to ecological biochemistry. 4ème édition, Academic Press, London, England. p318.

- Harrar, A.E.N.** (2012). Activités antioxydants et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire Pour obtenir le diplôme de Magister Option : Biochimie et physiologie expérimentale, sous la direction de Belhattab Rachid, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. p 73.
- Hart, K.J., Yánez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J.** (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 8–35.
- Hatjimanoli, M., Debelmas, A.-M.** (1977). Etude de *Centaureium umbellatum* Gil. Identification des acides phenols. *Annales Pharmaceutiques Française*, 35, 107–111.
- Havsteen, B.H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol, Therapeut*, 96(2-3), 67– 202.
- Hellal, Z.** (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibacteriennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister en biologie, sous la direction de Djenane djamal, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. Algérie. p 78.
- Hemingway, R.W., Laks., P.E., Branham, S.J.** (1992). Plant polyphenols : Synthesis, properties, sinificance. Springer Science & Busines Media, Germany. p1053.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3-6.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hitchcock, C.L., Cronquist, A.** (1973). *Flora of the Pacific Northwest*, University of Washington Press, Seattle.
- Hopkins, W.G.** (2003). *Physiologie végétale*. 2 éme édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris. p 514.
- Hostettmann, K. Marston, A.** (1995). *Chemistry and Pharmacology of naturalproducts Saponins*: Cambridge university press. p 117.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*, 53(6),1841-1856.

-J-

- Javillier, M.** (1969). *Traité de biochimie générale*. Volume 3, partie2, Masson, France. p896.
- Jayaprakash, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K.** (2001). Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*, 55(25), 1018-1022.
- Jean-Blain, C.** (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins, *Rev.Méd. Vét*, 149, 911- 920.

-K-

Kaabeche, M. (1990). Les Groupements Végétaux de la région de Bousaada, Thesis Université Paris Sud. p112.

Kalla, A. (2012). Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*, Thèse de Doctorat en Sciences, Option : phytochimie, sous la direction de Djaballah belkacemi, Université Mentouri, Constantine. p155.

Kandouli, C. (2018). Etude des propriétés antidiabétiques, antioxydantes et antiinflammatoires des extraits hydrosolubles d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. sur le diabète de type 2 expérimental induit par le régime (high fat) chez la souris C57/BL6J. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire, sous la direction de Mechakra A. Option : Pharmacotoxicologie Cellulaire et Moléculaire, Université des Frères Mentouri, Constantine, p196

Kechat, A. (2011). Plantes médicinales et gellée royale utilisées dans le traitement du cancer. Faculté des sciences naturelles et de la vie, département des sciences agronomiques.

Keskin, N., Kunter, B. (2009). The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on *trans*-resveratrol production in grapevine callus culture. *Trim Bilimleri*, 15(1), 3-19.

Khanababae, K., Ree T.V. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18, 641-649.

Khenaka, K. (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin, Mémoire de Magister, en Microbiologie Appliquée, sous la direction de Arhab, Université Mentouri, Constantine. pp19, 24.

Kirmann, A., Cantacuzene, J., Duhamel, P. (1975). Chimie organique fonctions complexes. Tome 3 ème éd. Librairie Colin. Paris, p197-199.

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, Français. p348.

Kumarasamy, Y., Nahar, L., Sarker, S.D. (2003). Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*, 74(1-2), 151-4.

-L-

Lacaille-Dubois, M.A. (1999). Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner H, editor. *Immunomodulatory agents from plants*. Switzerland (Basel) :BirkhäuserVerlag. pp 243-272.

Laraoui, H. (2007). "Etude Phytochimique L'Extrait Chloroformique de BupleurumAtlanticum" Docteur de l'université Louis pasteur (Chimie Organique, UV El Hadj Lakhdar Batna).

Le, K., Chiu, F., Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. Food Chemistry, 105(1), 353-363.

Ling, W.H., Jones P.J.H. (1995). Dietary phytosterols of metabolism benefits and side effects. Review life science, 57(3), 195-206.

Loïc, B. (2015). La phytothérapie pertinente, éditions Altal. p107.

Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K., et Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. J.Acta.biologica. szegediensis, 47 (1-4), 119-125.

-M-

Macheix, J.J., Fleuriot, A., et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques. p192.

Maisuthisakul, P., Pasuk, S., et Ritthiruangdej, P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J Food Composition and Analysis, 21, 229-240.

Makris, D.P., Kallithraka, S., et Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape -products and wines: Burden, profile and influential parameters. Jurnal of food compstion and analysis, 19(5), 396-404.

Malecky, M. (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat, sous la direction de Daniel Sauvart, l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. pp 9, 13-19, 20, 27.

Merghem, R. (2009). Eléments de biochimie végétale. 1 ère Edition, Algérie, Constantine : Bahaeddine, p 172.

Messaoudi, S. (2005). Les plantes medicinales. *Ed. Dar El Fikr Tunis.*

Middleton, J.E., Kandaswami, C., et Theoharides, T.C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Pharmacologicals Reviews, 52, 673-751.

Midoun, T. (2011). Extraction Des Composes Phenoliques Et Etude Leurs Activités Antioxydante Par La Voltametrie Cyclique. Mémoire de Master, en chimie appliquée, sous la direction de Saidi Mokhtar, Université Kasdi Merbah, Ouargla. p53.

Mokkadem, A. (1999). Cause dégradations des plantes médicinales aromatique d'Algérie. Revue vie et Nature n°7, p24-26.

Mueller-Harvey, I., Mc et Allan, A.B. (1992). Tannins:theirbiochemistry and nutritionalproperties,Adv. Plant CellBiochem. Biotechnol, 1, 151-217.

-N-

Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R. et Krishina, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33(1) :2-16.

Neagu, E., Radu, G. L., Albu, C., et Paun, G. (2018). Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 578–585.

Nkhili, E.Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant, Thèse de doctorat, Université Cadi ayyad -Faculté des Sciences, Semlalia, Marrakech.

-O-

Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66 (17), 2012–2031.

Olennikov, D., Kashchenko, N., Chirikova, N., Koryakina, L., et Vladimirov, L. (2015). Bitter Gentian Teas: Nutritional and Phytochemical Profiles, Polysaccharide Characterisation and Bioactivity. *Molecules*, 20(11), 20014–20030.

Orhan, N., Hoşbaş, S., Orhan, DD., Asla, M., et Ergun, F. (2014). Enzyme inhibitory and radical scavenging effects of some antidiabetic plants of Turkey. *Iran J Basic Med Sci*, (17), 426-432.

Osman, A.M. (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+) –catechin : Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH• and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(3) :473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.123>.

Ozenda, P. (1977). Flore du sahara, Ed. CNRS., Paris, France. pp 250-259.

-P-

Paech, K. (1963). *Modern Methods of Plant Analysis/ Modern Methods der Pflanzena* Volume 6, Springer-Verlag, Germany.

Paris, M et Hurabielle. (1981). *Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1.* Ed Masson. Paris. pp 102-103-104-107.

Pereira, D.M., Ferreres, F., Oliveira, J.M.A., Gaspar, L., Faria, J., Valentão, P., et Andrade, P.B. (2010). Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, 17(8-9), 646–652.

Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*, 40(1), 1-11.

Poutrain, P. (2008). Etude de la régulation hormonale du métabolisme des alcaloïdes indoliques monoterpéniques chez *Catharanthus roseus*. Implication du calcium dans la transduction du signal induit par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, Thèse de doctorat, sous la direction de Marc Rideau, Université François – Rabelais. Tours, France. p 202.

Pringle, J. (2014). Morphological characteristics of the family Gentianaceae : chapter 1.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(10) :4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.

Privas, E. (2013). Matériaux ligno-cellulosiques «Élaboration et Caractérisation laboration ». Thèse de Doctorat en Science et génie des matériaux. L'École Nationale Supérieure des Mines, Paris. France. p 166.

Prouillac, C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro. Thèse de doctorat en chimie, sous la direction de RIMA.G, Université Paul Sabatier Toulouse III. p294.

Provost, M. (1998). Flore vasculaire de Basse-Normandie : avec suppléments pour la Haute-Normandie. Caen : Presses universitaires de Caen, 2 vol. (XXV-410 p.-32 p. de pl. en coul., XII-p 492).

-Q-

Quy-Diem, D., Artik, E., Phuong, L., Lien, H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J. food and drug analysis*, 22(3), 296-302.

Quyyou, A. (2003). Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doctorat, Université Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. p110.

-R-

Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways to cancerchemoprevention. *J. Nutr. Biochem*, 18(7), 427-442.

Rhee, I. K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., et Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2) :217–223.

Roberts, J.C. (1996). The chemistry of paper. Royal Society of Chemistry, England. p208.

Rybczynski, J., Davey M. (2014). The Gentianaceae, 1. Characterization and Ecology. Springer, 1-12.

-S-

Sahreen, S., Khan, M.R., et Khan, R.A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122(4) :1205-1211.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8), 2073-2085.

Seenivasan, P. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 30 (9), 6-39.

Seenivasan, P. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 9, 6-39.

Segnou, F.C.A., Akoroda, M., et Hahn, S. (1992). Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Euphytica*, 64(3), 197-203.

Senol, F. S., Yagci Tuzun, C., Toker, G., et Orhan, I. E. (2012). An in vitro perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five *Gentiana* species and *Gentiana caucasea*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(7) :802-812.

Stoiko, L et al. (2017) / *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 8 (Suppl 2).

Stuart, J.A., et Robb, E.L. (2013). *Bioactive polyphenols from wine grapes*. Springer Science & Business Media, Germany. Dergisi. p 75.

-T-

Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., et Okazaki, M. (2000). Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*, 151(2), 153-161.

Terry, A.V., Buccafusco, J.J. (2003). The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3) :821–827.

Thati, B., Noble, A., Rowan, R., Creaven, S.B., Walsh, M., Egan, d., et Kavanagh, K. (2007). Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*. 21(5) :801-808.

Ticli, B. (1997). *L'herbier de santé*. 1^o édition, Paris, édition VECCHI SAO,01, p206.

-U-

Urbain, A., Marston, A., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., et Hostettmann, K. (2004). Xanthones from *Gentiana campestris* New Acetylcholinesterase Inhibitors. *Planta Medica*, 70(10) :1011–1014.

-V-

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., et Bastos, M.L. (2001). Antioxidant activity of Centaurium erythraea infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J Agric Food Chem*, 49(7) :3476–3479.

Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P., et Brumaghim, J.L. (2011). Iron binding of 3- hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(10), 1314-1322.

Verlag, K. (2007). *Lexide des plantesmédicinales*. Ed. Elcy. p45.

Verlag, K. (2007). *Lexide des plantesmédicinales*. Ed. Elcy. p45.

Verpoorte, R. (2002). *La pharmacognosie du nouveau millénaire :pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du future, 4ème congrés européen d’ethnopharmacologie*. IRD Edition, Paris. p274.

-W-

Wallace, R.J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society*, 63(4), 621-629.

Waymel, J., Dufay, S., et Zambettakis, C. (2015). *Plan de conservation de la Petite centaurée vivace*. p4.

Webster, D. (2004). *Effet de quelques plantes médicinales Sur Les maladies cardiovasculaires*.

Wichtl, M. et Anton, R. (2009). *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Édition LAVOISIR, Paris. pp38- 41.

Wong, S.P., Leong, L.P., et William Koh, J.H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4) :775-783.

-Y-

Yang, J.P., He, H., et Lu, Y. H. (2014). Four flavonoid compounds from Phyllostachys edulis leaf extract retard the digestion of starch and its working mechanisms. *J.Agric.Food Chem*, 62(31) :7760-7770.

Yokozawa, Y., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka G.I., et Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213–222.

Yong, Y.K., Tan, J.J., Teh, S.S., Mah, S.H., Ee, G.C.L., Chiong, H.S., et Ahmad, Z. (2013). *Clinacanthus nutans* Extracts Are Antioxidant with Antiproliferative Effect on

Cultured Human Cancer Cell Lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013 :1–8.

-Z-

Ziegler, J., Facchini, et P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 735 – 769. [doi: 10.1146 / annurev.arplant.59.032607.092730](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730).

Sites-Web consultés

<https://books.google.dz/books?id=afm50BLzBcC&pg=PA11&dq=le+genre+centaurium&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjmaP8jLLhAhWNnxQKHY2rASoQ6AEIJzAA#v=onepage&q=le%20genre%20centaurium&f=false>. Consulté le: 05/03/2018.

<https://therapeutesmagazine.com/centauree-plante-medicinale-centauree-petite/>. Consulté le: 05/03/2018.

https://www.complements-alimentaires.co/centauree/#centaur%C3%A9e_description. Consulté le: 05/03/2018.

https://www.complements-alimentaires.co/centauree/#centaur%C3%A9e_description. Consulté le: 05/03/2018.

<https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-public-especes-peril/evaluations-rapports-situations-cosepac/petite-centauree-muhlenberg/chapitre-6.html>. Consulté le: 06/03/2018.

https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/89854. Consulté le: 06/03/2018.

(Quezel.P et Santana S.-Books -NCBI). Consulté le: 07/03/2018.

<https://www.mr-plantes.com/2010/11/centauree-centaurea/>. Consulté le: 12/03/2018.

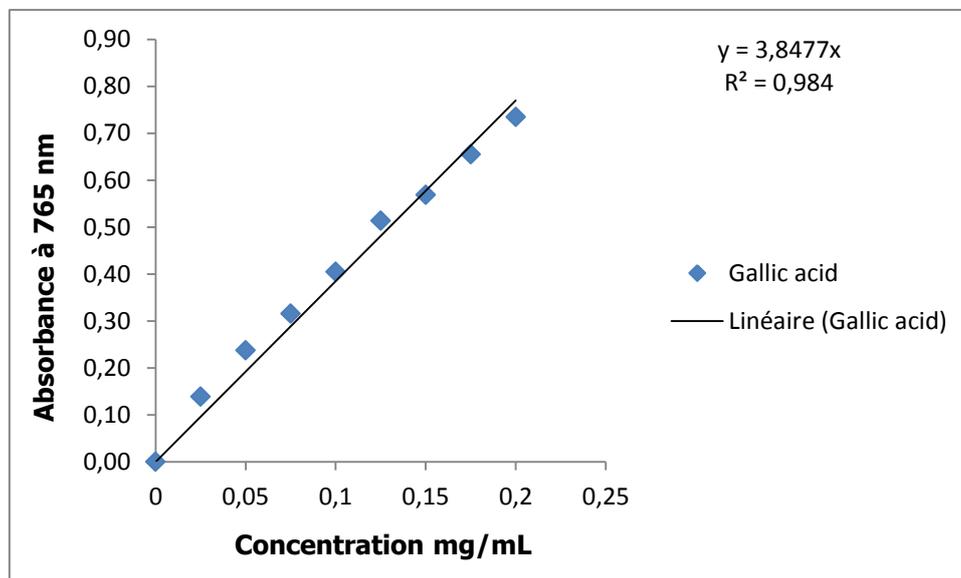


Annexes



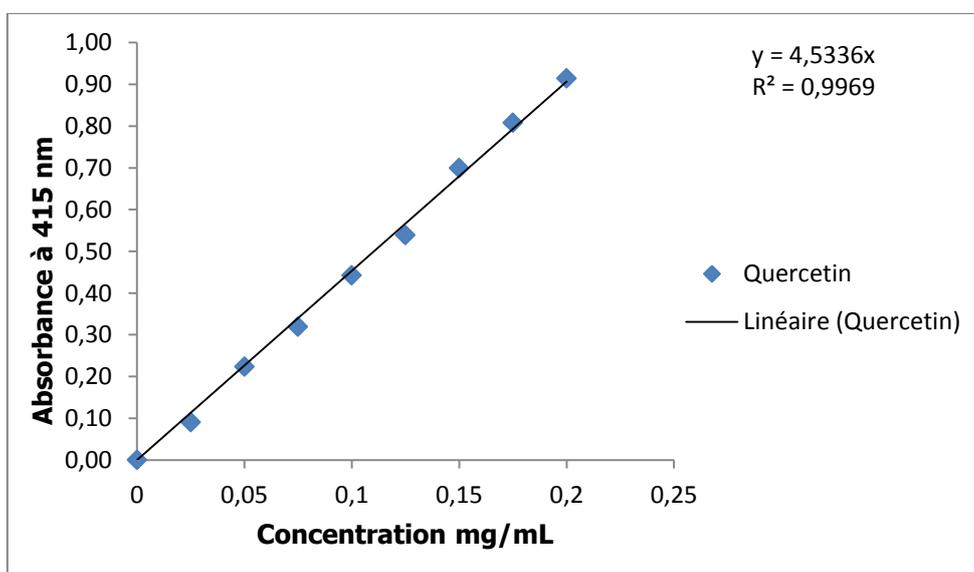
Annexe 1.

Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



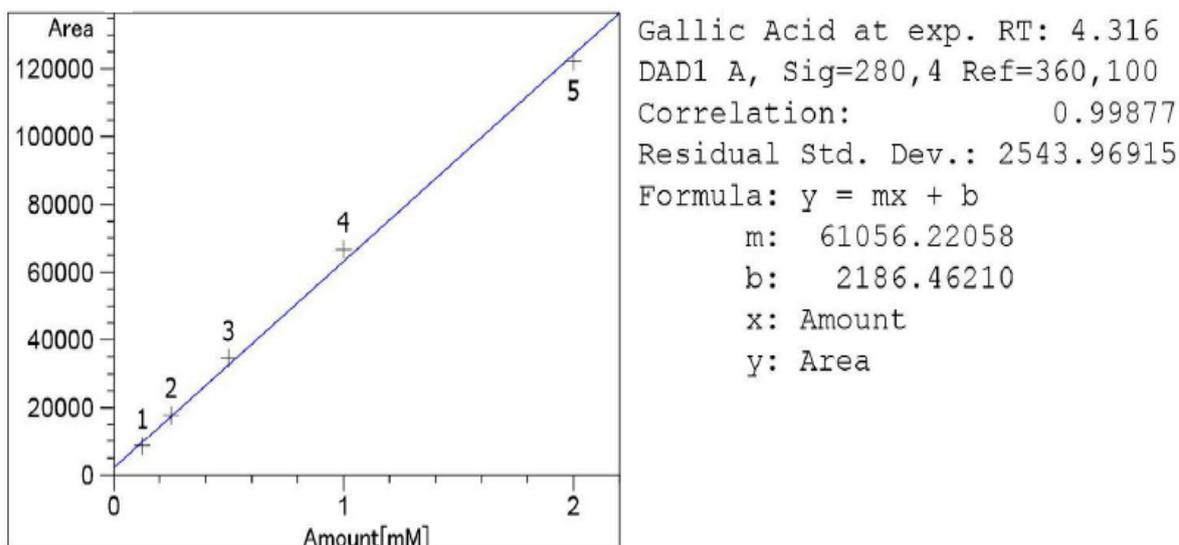
Annexe 2.

Courbe d'étalonnage de Quercetine



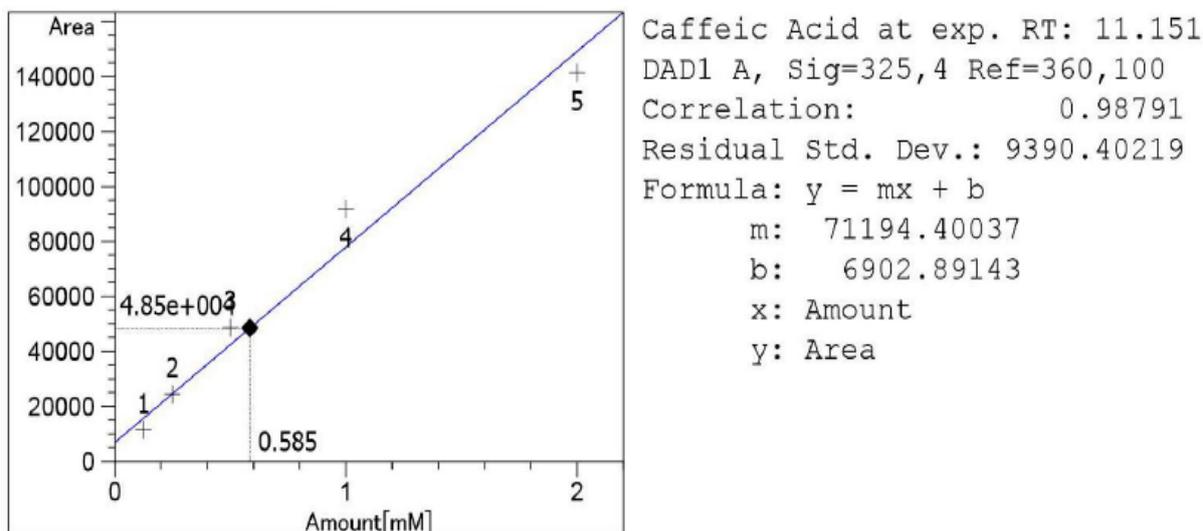
Annexe 3.

Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



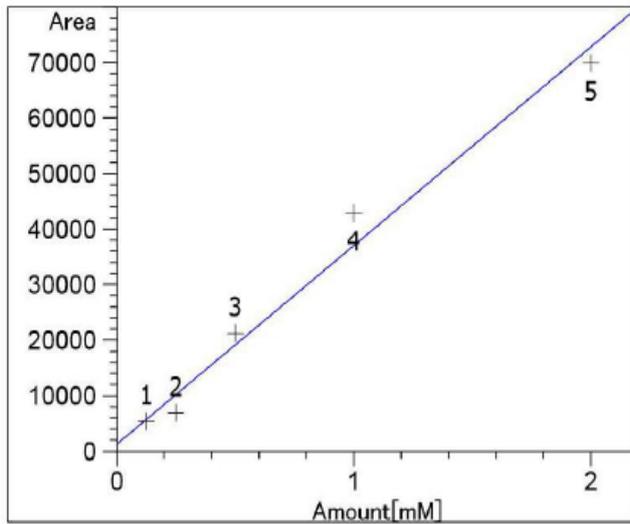
Annexe 4.

Courbe d'étalonnage de l'acide caféique



Annexe 5.

Courbe d'étalonnage de Rutine



Rutin at exp. RT: 25.606
DAD1 A, Sig=350,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99190
Residual Std. Dev.: 3854.55171
Formula: $y = mx + b$
m: 35807.26049
b: 1247.32697
x: Amount
y: Area

Résumé

Dans cette étude, cinq extraits ont été obtenus à partir des parties aériennes de *Centaureum sp* (Gentianaceae), afin d'étudier leur activités antioxydantes, antifongiques, anti-Alzheimer et antidiabétiques. De plus, pour chaque extrait, la composition chimique en composés phénolique par HPLC-DAD et la teneur total en polyphénols et flavonoïdes ont été déterminées

L'évaluation du pouvoir antioxydant par sept méthodes DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, Métal chélate, pouvoir réducteur et activité phénanthroline a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits et que les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique sont les plus antioxydantes. Ces deux fractions exhibent également une inhibition presque totale contre l'alpha-glucosidase ($98.92\pm 0,06\%$ et $98.97\pm 0,123\%$, respectivement).

Tous les extraits ont montré des efficacités inhibitrices de butyrylcholinestérase notamment les fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec une activité meilleur que celle du standard utilisé ($75,07\pm 0,02\%$ et $83,05\pm 0,03\%$, respectivement), cependant, les résultats d'anti-acétylcholinestérase n'ont montré aucun effet inhibiteur. Nos extraits possèdent une faible activité antifongique sur les moisissures d'*Alternaria sp* par la méthode de diffusion sur milieu de culture PDA. Le dosage des phénols et flavonoïdes totaux montre que les extrait acétate d'éthyle et n-butanol sont les plus riches en ces métabolites. L'analyse par HPLC-DAD nous a permis d'identifier et quantifier les dérivés de l'acide hydroxycinnamique, de l'acide hydroxybenzoïque et les flavonoïdes de type flavonol, qui sont présentes en quantité élevée dans les extrait acétate d'éthyle et n-butanol.

Mots clés : Gentianaceae, *Centaureum*, Polyphénols, Flavonoïdes, HPLC-DAD, Activité antioxydante, antifongique, anti-Alzheimer, antidiabétique.

Abstract

In this study, five extracts were obtained from the aerial parts of *Centaureum sp* (Gentianaceae) to study their antioxidant, antifungal, anti-Alzheimer and antidiabetic activities. In addition, for each extract, the chemical composition of polyphenols by HPLC-DAD and the total content of phenols and flavonoids were determined.

The evaluation of the antioxidant power by seven methods DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, Metal chelate, reducing power and phenanthroline activity revealed antioxidant capacities in all extracts and that the fractions ethyl acetate and n-butanolic are the most antioxidant. These two fractions are also exhibiting an almost total inhibition against alpha-glucosidase ($98.92 \pm 0.06\%$ et $98.97 \pm 0.123\%$, respectively).

All the extracts showed an inhibitory efficiencies of butyrylcholinesterase, in particular ethyl acetate and n-butanolic fractions with a better activity than the standard used ($75.07 \pm 0.02\%$ et $83.05 \pm 0.03\%$, respectively), however, the results of anti-acetylcholinesterase showed no inhibitory effect. Our extracts have low antifungal activity on the molds of *Alternaria sp* by the diffusion method on PDA culture medium. The determination of total phenols and flavonoids shows that the ethyl acetate and n-butanol extracts are the richest in these metabolites. HPLC-DAD analysis allowed us to identify and quantify derivatives of hydroxycinnamic acid, hydroxybenzene acid and flavonoids of the flavonol type, which are present in high amounts in the ethyl acetate and n-butanol extracts.

Key words : Gentianaceae, *Centaureum*, Polyphenols, Flavonoids, HPLC-DAD, Antioxidant activity, antifungal, anti-Alzheimer, antidiabetic.

ملخص

في هذه الدراسة تم الحصول على خمسة مقتطفات من الأجزاء الهوائية لنبتة *Centaurium sp* (Gentianaceae)، لدراسة أنشطتها المضادة للأكسدة، المضادة للفطريات، المضادة للزهايمر و المضادة للسكري. بالإضافة إلى ذلك، من أجل كل مستخلص، تم تحديد التركيب الكيميائي للفينول بواسطة HPLC-DAD و المحتوى الكلي للبوليفينول و الفلافونويد.

تقييم قوة مضادات الأكسدة من خلال سبعة طرق DPPH، ABTS، CUPRAC GOR، إستخلاص المعادن، القدرة الإرجاعية و نشاط فينونثرولين كشفت قدرات مضادة للأكسدة في جميع المستخلصات و إن الأجزاء اسيتات الإيثيل و ن- بوتانول هما الأكثر مضادات للأكسدة. يظهر هذين الجزئين أيضا تنبيها تقريبا كليا ضد alpha-glucosidase (98.92±0,06% و 98.97±0,123% على التوالي).

أظهرت جميع المستخلصات كفاءات مثبطة ضد butyrylcholinestérase خاصة اسيتات الإيثيل و ن- بوتانول مع نشاط أفضل من المعيار المستخدم (75,07±0,02% و 83,05±0,03% على التوالي)، لكن، نتائج مضاد acétylcholinestérase ، لم تظهر أي تأثير مثبط. مستخلصاتنا لها نشاط مضاد للفطريات منخفض على فطريات *Alternaria sp* من خلال طريقة الانتشار في وسط الزرع PDA. يبين تقدير محتوى الاجمالي للفينولات و الفلافونويد ان مستخلصات اسيتات الإيثيل و ن- بوتانول هم الأكثر ثراء بهذه المركبات. سمح لنا تحليل HPLC-DAD بتحديد و قياس مشتقات حمض الهيدروكسيناميك و حمض هيدروكسينزويك و الفلافونويد من نوع فلافونول ، التي تتواجد بكميات عالية في مستخلصات اسيتات الإيثيل و ن- بوتانول.

الكلمات المفتاحية : *Centaurium*، *Gentianaceae*، البوليفينول، الفلافونويد، HPLC-DAD، نشاط مضادة للأكسدة، مضادة للفطريات، مضادة للزهايمر، مضادة للسكري.

Année universitaire :

2018/2019

Présenté par :

BOUDRAA AMEL EL HAYET & BELKHAIRI AMIRA

Etude phytochimique et évaluation des activités biologique d'une plante algérienne du genre *Centaurium* (Gentianacea)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Résumé

Dans cette étude, cinq extraits ont été obtenus à partir des parties aériennes de *Centaurium sp* (Gentianacea), afin d'étudier leur activités antioxydantes, antifongiques, anti-Alzheimer et antidiabétiques. De plus, pour chaque extrait, la composition chimique en composés phénoliques par HPLC-DAD et la teneur total en polyphénols et flavonoïdes ont été déterminées.

L'évaluation du pouvoir antioxydant par sept méthodes DPPH, ABTS, CUPRAC, GOR, Métal chélate, pouvoir réducteur et activité phénanthroline a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits et que les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique sont les plus antioxydantes. Ces deux fractions exhibent également une inhibition presque totale contre l'alpha-glucosidase ($98.92 \pm 0,06\%$ et $98.97 \pm 0,123\%$, respectivement).

Tous les extraits ont montré des efficacités inhibitrices de butyrylcholinestérase notamment les fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec une activité meilleur que celle du standard utilisé ($75,07 \pm 0,02\%$ et $83,05 \pm 0,03\%$, respectivement), cependant, les résultats d'anti-acétylcholinestérase n'ont montré aucun effet inhibiteur. Nos extraits possèdent une faible activité antifongique sur les moisissures d'*Alternaria sp* par la méthode de diffusion sur milieu de culture PDA. Le dosage des phénols et flavonoïdes totaux montre que les extrait acétate d'éthyle et n-butanol sont les plus riches en ces métabolites. L'analyse par HPLC-DAD nous a permis d'identifier et quantifier les dérivés de l'acide hydroxycinnamique, de l'acide hydroxybenzoïque et les flavonoïdes de type flavonol, qui sont présentes en quantité élevée dans les extraits acétate d'éthyle et n-butanol.

Mots clés : Gentianacea, *Centaurium*, Polyphénols, Flavonoïdes, HPLC-DAD, Activité antioxydante, antifongique, anti-Alzheimer, antidiabétique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biochimie RDC

Jury d'évaluation

Président du jury : KITOUNI Rachid

MCB

UFM Constantine

Rapporteur : BOUANIMBA Nour

MCA

UFM Constantine

Examineur : HAROUNI Sofiane

MAA

UFM Constantine

Date de soutenance : 24/07/2019