

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologique

Spécialité: Ecotoxicologie animal

Intitulé :

**L'effet antioxydant de deux extraits butanolique d'une
plante médicinale**

Présenté Par :

Bendjama Kenza
Bouhbila Yousra

Bendjama Sara
Belmeguenai Amina

Membre de Jury:

Dr. Sabrina Boucetta (MCA)

Présidente

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. Hanane Aïssaoui (MCB)

Promoteuse

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. Wassila Benabderrahmane (MCB)

Examinatrice

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant toute chose nous remercions "ALLAH " le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

*Au terme de ce travail nous adressons également nos sincères remerciements à : **Mme Aissaoui Hanane** maitre de conférences (B) à l'université 20 Aout 1955- Skikda, pour avoir dirigé ce travail et accepté de nous encadrer, pour ses conseils et ses orientations.*

Qu'elle trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et profond respect

*Nos vifs remerciements vont également aux membre de jury pour l'intérêt qu'il ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner et évaluer notre travail et de l'enrichir par leur propositions, la présidente de jury **Mme Boucetta Sabine** maitre de conférences (A) à l'université 20 Aout 1955- Skikda , et **Mme Benabderrahmane Wassila** maitre de conférences (B) à l'université 20 Aout 1955- Skikda*

*Remerciements spéciaux à **Mr Boudjellab Zinne el Dine** le directeur de département SNV. de nous avoir donné les moyens de ce travail.*

*Nous remercions vivement **Dr Bensouici Chawki** responsable de Laboratoire de biochimie au centre de recherche en biotechnologie (CRBt), nous avoir accueillis, ainsi que les facilités et les aides qu'il nous a accordées pendant notre travail.*

Nous remercions également tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie.

*A tous les étudiants de graduation **MASTER 2** spécialité éco toxicologie animale*



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mon cher père **M.TAHAR***

*Ma chère mère **OUARDA***

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour
je puisse atteindre mes objectifs.*

***A** mes sœurs **KJHADIDJA, HALIMA, KHAWLA** et leurs maris :*

Pour leurs soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

***A** mon frère **LYES** et leur fiancée **INES**.*

***A** les petites de famille*

OUSSAMA, MALAK, SABAR, NOURHANE, AKRAM

***A** mes chères amies et mes cousines.*

***A** mes collègues :*

AMINA, SARA, YOUSRA

A** mon encadreur **AISSAOUI HANANE

Pour son indéfectible soutien et son patience.

Et à toute la famille **BENDJAMA**.

Kenza



Dédicace

Je saisis cette occasion mémorable de ma vie pour dédier ce modeste travail

À mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui;

*Ma mère **Louisa** et Mon père **Houcine**.*

*À que mon cœur souffre encore pour sa séparation, ma chère cousine **Yasmina** (رحمها الله)*

À mon grand-père et ma grand-mère pour leur soutien.

À mes frères.

À mes chers amies et mes cousines.

*À toute LA famille **Bendjama** de près ou de loin.*

À mes collègues :

Kenza , Amina , Yousra.

*À mon encadreur **Aissaoui Hanane***

Et à toutes personnes qui ont contribuées à la réalisation de ce travail.

À tous mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université.

Sara



Dédicace

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance. Je dédie ma remise de diplôme et ma joie.

À mon paradis, à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moitié

Maman « Sabiha »

À ma source de vie, d'amour et d'affection, à mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir m'encourage

Papa « bachir »

À Ma seule frère « Noureddine », pour l'amour qu'il me réserve.

Bien sûr, je n'oublie pas de remercier ma sœur « khaoula » mon soutien dans la vie, et ma deux petites sœurs « Aya et Asma » qui sait toujours la joie et le bonheur pour tout ma famille.

À mes amis proches : Amani, Hadil, Manel, Zineb, je vous aime, mes

Collèges :Kenza, Yousra et Sara ; merci pour les bons moments

À mon encadreur Aissaoui Hanane.

À mes grande famille « belmegunai »et « bouteraa », et tous mes proches .

Amína



Dédicace

*. Je dédie ce travail à mes très chers parents **BOUHBILA AHCENE** et **NOURI FOUZIA** qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux.*

***A** mes frère **Aymen** ,**Hani** ,**Firas** .Ma petite sœur **chorouk**.ma cousine **BENLOUCIF HALIMA**.*

***A** mon grand-père **BOUHBILA MOUHAMMAD**, que dieu lui fasse miséricorde.*

A** mes grandes familles **BOUHBILA**, **NOURI

***Et** sans oublier toutes mes amies : **SELSABIL**, **CHAIMA**, **NESRINE**, **ABIR**, **SARA**.*

***A**mes collègues: **AMINA**, **KENZA**, **SARA**.*

A** mon encadreur **Aissaoui Hanane

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

YOUSRA

ملخص

يخصص هذا العمل لتقييم القوة المضادة للأوكسدة لاثنين من المستخلصات البوتانولية من نبات طبي ينتمي إلى عائلة النجمية، وبشكل أكثر دقة جنس *Centaurea*. يتم الحصول على هذه المستخلصات من أوراق وزهور النبات.

تم استخدام أربع طرق لتقييم النشاط المضاد للأوكسدة: اختبار DPPH واختبار ABTS واختبار FRAP واختبار الفينانثرولين. من بين هذه الطرق، أظهرت طريقة الفينانثرولين أفضل نشاط مضاد للأوكسدة لكلا المستخلصين. حيث أظهر مستخلص *n*-BuOH من الزهور $A_{0.5}$ قدره 2.23 ± 8.90 $\mu\text{g/ml}$ ، بينما أظهر مستخلص *n*-BuOH من الأوراق $55.66 \pm$ $\mu\text{g/ml}$ $A_{0.5}$ كانت هذه القيم أعلى من الطرق الأخرى التي تم تقييمها.

أظهر تقييم النشاط المضاد للأوكسدة لمستخلصات *n*-BuOH لأوراق وأزهار النبات أن المستخلص من الزهور لديه أعلى مضادة للأوكسدة.

الكلمات المفتاحية :

العائلة النجمية ، *Centaurea* ، أنشطة مضادة للأوكسدة، DPPH ، ABTS ، FRAP ، فينانثرولين.

Résumé

Ce travail est consacré à l'évaluation du pouvoir antioxydant de deux extraits butanoliques provenant d'une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées, plus précisément du genre *Centaurea*. Ces extraits sont obtenus à partir des feuilles et des fleurs de la plante.

Quatre méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante : le test du DPPH, le test de l'ABTS, le test du FRAP et le test de la phénanthroline. Parmi ces méthodes, la phénanthroline a révélé la meilleure activité antioxydante pour les deux extraits. L'extrait *n*-BuOH des fleurs a présenté un $A_{0,5}$ de $8,90 \pm 2,23$ $\mu\text{g/ml}$, tandis que l'extrait *n*-BuOH des feuilles a montré un $A_{0,5}$ de $55,66 \pm 3,47$ $\mu\text{g/ml}$. Ces valeurs étaient supérieures à celles des autres méthodes évaluées.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits *n*-BuOH des feuilles et des fleurs de la plante a permis de constater que l'extrait provenant des fleurs présentait la capacité antioxydante la plus élevée.

Mots clés :

Asteraceae, *Centaurea*, activité antioxydante, DPPH, ABTS, FRAP, phénanthroline.

Abstract

This work is devoted to evaluating the antioxidant power of two butanol extracts from a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, more specifically the *Centaurea* genus. These extracts are obtained from the plant's leaves and flowers.

Four methods were used to assess antioxidant activity: the DPPH test, the ABTS test, the FRAP test and the phenanthroline test. Of these methods, phenanthroline showed the best antioxidant activity for both extracts. The flower *n*-BuOH extract showed an $A_{0.5}$ of 8.90 ± 2.23 $\mu\text{g/ml}$, while the leaf *n*-BuOH extract showed an $A_{0.5}$ of 55.66 ± 3.47 $\mu\text{g/ml}$. These values were higher than those of the other methods evaluated.

Evaluation of the antioxidant activity of the *n*-BuOH extracts from the plant's leaves and flowers revealed that the extract from the flowers had the highest antioxidant capacity.

Key words:

Asteraceae, *Centaurea*, antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP, phenanthroline.

Sommaire

Liste des tableau

Liste des figures

Liste des abréviation

Introduction..... 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 famille des Astéracées.....	3
I.1.1 Généralités.....	3
I.1.2 Distribution géographique.....	3
I.1.3 Description botanique.....	4
I.1.4 Systématique.....	5
I.2 Genre <i>Centaurea</i>.....	6
I.2.1 Généralités.....	6
I.2.2 Description botanique du genre <i>Centaurea</i>	6
I.2.3 Distribution géographies de <i>Centaurea</i>	6
I.2.4 Utilisation du genre <i>Centaurea</i> en médecine traditionnelle.....	7
I.3 Études chimiques antérieures sur le genre <i>Centaurea</i>.....	8
I.3.1 Alcaloïdes.....	8
I.3.2 Composés phénoliques.....	9
I.3.2.1 Flavonoïdes	9
I.3.2.2 Acides phénoliques.....	11
I.3.2.3 Lignanes.....	11
I.3.3 Triterpènes	12
I.4 Etude biologique sur le genre <i>Centaurea</i>.....	13

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Extraction	14
II.2 Matériels et produits	16
II.2.1 Matériels	16
II.2.2 Produits chimiques	16
II.3 Activités antioxydantes	16
II.3.1 Préparation des échantillons.....	17
II.3.2 Activité de piégeage de radical libre DPPH.....	18
II.3.2.1 Principe.....	18
II.3.2.2 Protocole.....	18
II.3.3 Activité de la réduction du radical-cation ABTS.....	19
II.3.3.1 Principe.....	19
II.3.3.2 Protocole.....	20
II.3.4 Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP).....	21
II.3.4.1 Principe.....	21
II.3.3.2 Protocol.....	21
II.3.5 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} phenanthroline.....	22
II.3.4.1 Principe.....	22
II.3.4.2 Protocol.....	23
II.4 Analyses statistiques	23

Chapitre III Résultats et discussion

III.1 Rendement des extraits	25
III.2 Activités antioxydants	25

III.2.1 Test de l'activité scavenger du radical DPPH	26
III.2.2 Activité antioxydants déterminée par la méthode d'ABTS	28
III.2.3 Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP.....	30
III.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² - Phenantroline.....	31
III.3 Conclusion	32
Conclusion générale	33
Références bibliographiques	34

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Distribution géographique de quelque espèce du genre <i>Centaurea</i>	7
Tableau I.2 : Quelques alcaloïdes isolés d'espèces du genre <i>Centaurea</i>	8
Tableau I.3 : Quelques composés flavoniques isolés d'espèces du genre <i>Centaurea</i>	10
Tableau I.4 : Quelques composés phénoliques isolés d'espèces du genre <i>Centaurea</i>	11
Tableau I.5 : Quelques lignanes isolés d'espèces du genre <i>Centaurea</i>	11
Tableau I.6 : Quelques composés triterpéniques et stéroïdiens isolés des espèces <i>Centaurea</i>	12
Tableau I.7 : Activités biologiques de certaines espèces du genre <i>centaurea</i> ...	13
Tableau II.1 : Les prévenantes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale.....	17
Tableau III.1 : Rendement des extraits	25
Tableau III.2 : Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits et du standard utilisant le test de DPPH	27
Tableau III.3 : Pouvoir d'inhibition IC ₅₀ des extraits et du standard utilisant le test de ABTS ⁺	29
Tableau III.4 : Pouvoir réducteur A _{0,5} des extraits et du standard utilisant le test FRAP.....	30
Tableau III.5 : Pouvoir réducteur A _{0,5} des extraits et du standard utilisant le test Phénantroline	31

Liste des Figures

Figure I.1 : Types des fleurs des Astéracée	5
Figure I.2 : Le fruit de <i>Taraxacum campylodes</i> (Astéracée)	5
Figure II.1: Protocole d'extraction.....	15
Figure II.2 : Réduction de DPPH par un antioxydant.....	18
Figure II.3 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant.....	20
Figure II.4 : Mécanisme réactionnel du test FRAP.....	21
Figure II.5 : Formation du complexe Fe ⁺² -phenanthroline.....	23
Figure III.1 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents échantillons.....	26
Figure III.2 : Histogramme montre les valeurs de l'IC ₅₀ de test DPPH.....	27
Figure III.3 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons.....	29
Figure III.4 : Histogramme montre les valeurs de l'IC ₅₀ de test ABTS.....	28
Figure III.5 : Histogramme montre les valeurs de l'A _{0,5} de test FRAP.....	30
Figure III.6 : Histogramme représentant les valeurs de l'A _{0,5} de test Phenantroline	32

Liste des Abréviations

ABTS	acide 2, 2-azinobis-3-thylbenzothiazoline-6-sulfonique
A_{0,5}	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
AcOEt	l'acétate d'éthyle
CHCl₃	Chloroforme
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
FeCl₃	chlorure de ferrique
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
Fe²⁺	Ion fer ferreux
Fe³⁺	Ion fer ferrique
H₂O	Molécule d'eau
H[•]	Hydrogène
HA	atome d'hydrogène
IC₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
K₃Fe(CN)₆	ferricyanides de potassium
K₂S₂O₈	persulfate de potassium
MeOH	Méthanol
OH[•]	radicaux hydroxyls
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
O₂^{•-}	radicaux superoxydes
pH 6,6	Phosphate buffer
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter

TCA	Acide trichloroacétique
Trolox	Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> - butanol

Introduction générale

Introduction générale

Pendant des siècles, l'homme a pu compter sur la nature pour répondre à leurs besoins fondamentaux : nourriture, abri, vêtements et besoins médicaux. L'usage thérapeutique des propriétés extraordinaires des plantes pour traiter toutes les maladies humaines est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (Dellile ,2007).

Malgré les avancées considérables réalisées au cours du XX^{ème} siècle dans le domaine de la synthèse moléculaire, l'exploration des ressources naturelles par le biais du criblage a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments efficaces. Ces derniers jouent un rôle de plus en plus important dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006).

Actuellement, environ 80% de la population mondiale utilise des plantes médicinales pour traiter leurs affections, soit en raison de la difficulté d'accéder aux médicaments modernes prescrits, soit en raison de l'efficacité avérée de ces plantes. Pour cette raison, l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie font actuellement des recensements dans le monde entier pour répertorier les plantes reconnues pour leurs propriétés médicinales. C'est à la recherche moderne de clarifier ses propriétés et de valider les usages traditionnels de ces plantes (Pelt, 2001).

L'Algérie compte environ 3000 espèces végétales appartenant à diverses familles botaniques, parmi lesquelles la famille des astéracées (composées) occupe une place prépondérante et a fait l'objet de nombreuses études approfondies (Quezel et Santa, 1963).

Centaurea est l'un des genres les plus connus de la famille des Astéracées. Il se trouve dans différentes régions allant de l'Asie au bassin méditerranéen. Actuellement, il compte des milliers de formes, comprenant des espèces, des sous-espèces et des variétés, qui sont regroupées en environ 600 espèces distinctes. Certaines sont très répandues et d'autres sont très localisées (Bremer, 1994).

Le genre *Centaurea* est reconnu pour sa richesse en biomolécules appartenant à diverses classes de métabolites secondaires, tels que les alcaloïdes, les sesquiterpénoïdes lactones, les tritérpénoïdes, les terpénoïdes et les polyphénols, en particulier les flavonoïdes. Ces derniers sont considérés comme des constituants typiques de la famille des Astéracées en général, et du genre *Centaurea* en particulier. Les flavonoïdes agissent comme des antioxydants primaires, aidant à stabiliser les radicaux peroxydes, et ils ont également la capacité de chélater les métaux (Sarni-Manchado, 2006).

Ce travail de recherche se focalise sur l'évaluation des activités antioxydantes de deux extraits, l'un à base de feuilles et l'autre à base de fleurs, d'une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées, plus précisément au genre *Centaurea*.

Ainsi, ce manuscrit est organisé en trois chapitres, le premier chapitre concerne tout d'abord la synthèse bibliographique. Ce dernier est consacré à la présentation de l'aspect botanique suivi d'une synthèse des principaux résultats phytochimiques et biologiques antérieurs relatifs aux espèces du genre *Centaurea*.

Le deuxième chapitre expose les travaux personnels réalisés sur les deux extraits tels que l'évaluation et la recherche des activités antioxydantes.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus concernant les activités antioxydantes des extraits butanoliques des feuilles et des fleurs, et une discussion approfondie des résultats.

Enfin, une conclusion générale sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce manuscrit.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1 La famille des Astéracées

I.2 Le Genre *Centaurea*

I.3 Études chimiques antérieures sur le genre *Centaurea*

I.4 Etude biologique sur le genre *Centaurea*

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1 La famille des Astéracées

I.1.1 Généralités

Le nom Astéracée est dérivé du mot grec "Aster", qui signifie étoile, en raison de la forme de la fleur. Les astéracées sont la plus grande famille de la division des spermatophytes. Elle comprend près de 25 000 espèces connues regroupées en 1500 genres répartis en 17 tribus répandues à travers le monde (Crete, 1965), ce qui représente environ 8-10 % toutes les plantes à fleurs. Les genres les plus importants selon le nombre d'espèces sont : Senecio (1500 espèces), Vernonia (1000 espèces), Cousinia (600 espèces) et Centaurea (600 espèces).

La famille des Astéracées (Composées) est une importante famille de plantes dicotylédones et, avec environ 109 genres et plus de 408 espèces, fait partie des plantes médicinales devenues très importantes en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

I.1.2 Distribution géographique

Les Astéracées sont distribuées dans le monde entier à l'exception de l'Antarctique. Ils s'acclimatent bien dans les régions semi-arides tropicales et subtropicales, dans la toundra alpine et arctique et dans les régions tempérées. En revanche, ils sont rares dans les forêts tropicales. Ce sont essentiellement des plantes herbacées, bien que des arbres, des arbustes ou des lianes puissent exister (Bremer, 1994).

Les premiers représentants de ce groupe semblent avoir l'Afrique, l'Australie et l'Amérique occidentale. L'Afrique offre la plus grande diversité de preuves individuelles d'espèces éteintes. L'Amérique andine compte plusieurs espèces qui se rapprochent de ce qui peut être considéré comme le type primitif de toute la famille. Une répartition géographique sauvage importante de

cette famille se trouve également en Turquie, au Canada, en Inde, en Iran et dans les États baltes (Ivancheva et Tsvetkova, 2003).

I.1.3 Description botanique

Les astéracées ont en commun que les fleurs sont fusionnées en têtes, c'est-à-dire rapprochées, la tige florale étant à l'extrémité d'une branche ou d'une tige, ou entourée d'une structure florale formée de bractées. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée involucre (Barkely, 2006).

Les fleurs des composées sont toujours regroupées dans une inflorescence (groupe de fleurs sur la même tige) appelée tête ou capitule qui fonctionne comme une fleur unique. Les Astéracées sont divisées en deux types : l'un avec des fleurs aux pétales en forme de langue (fleurs ligulées) et l'autre avec des pétales tubulaires (fleurs tubuleuses) (Figure.I)

Chez la moitié des espèces, les petites fleurs centrales sont tubulaires et en forme de minuscules disques, tandis que les fleurs périphériques ont des corolles ligulées qui s'étendent vers l'extérieur comme de multiples pétales qui attirent les insectes pollinisateurs. Les corolles sont entourées à la base de bractées (Ozenda, 1991).

Les feuilles sont généralement alternes. Elles peuvent également être opposées ou réunies dans une rosette principale (Pâquerette).

Le fruit est constitué d'akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus (Figure I.2) qui favorise la dispersion des graines par le vent.

Les tiges sont généralement droites, mais tombent quelque fois au fait de s'élever.

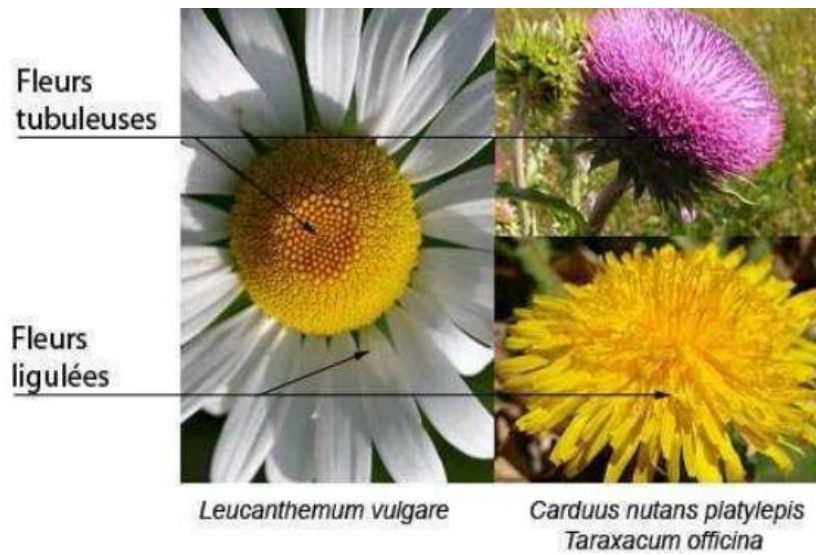


Figure I.1: Types des fleurs des Astéracée (Ozenda, 1991).



Figure I.2 : Le fruit de *Taraxacum campylodes* (Astéracée) (Vicki, 2009).

I.1.4 Systématique

Classification selon Cronquist (1988)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Embranchement	Phanerogamae (Phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (Angiospermes)
Class	Magnoliopsida (Dicotyledones)
Sous-classe	Asteridae

Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae (Compositae)

I.2 Le Genre *Centaurea*

I.2.1 Généralités

Le genre *Centaurea* appartient à la famille des Astéracées. Le genre contient environ 700 espèces et est répandu en Algérie, dans le sud de l'Europe, dans la région méditerranéenne, en Asie occidentale et dans les Amériques (Mabberley, 1987). En Algérie, elle est représentée par 45 espèces dont 7 se trouvent dans le "Sahara" méridional (Harborne, 1992).

Des études phytochimiques sur cette espèce végétale ont montré que les adventices sont très riches en métabolites secondaires : notamment lactones sesquiterpéniques (Fortuna, 2001 ; Medjroubi, 2003 ; Kollu, 2012 ; Medjroubi, 2005), flavonoïdes (Hammoud, 2012), composés acétylés, alcaloïdes et stéroïdes (Picher, 1984).

I.2.2 Description botanique du genre *Centaurea*

Les *Centaurea* sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelle ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs.

Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubées, multiflores homomorphe ou dimorphes, celle de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Le plus souvent, leur couleur varie entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (Quezel et Santa, 1963).

I.2.3 Distribution géographiques de *Centaurea*

Genre *Centaurea* répandu géographiquement. Ce genre est présent en Europe, en Asie, en Afrique, en Amérique du Nord (Canada et États-Unis) et en Australie (Mishio, 2006).

Dans la nouvelle flore d'Algérie Quezel et Santa. (1963) ont signalé et décrit 45 espèces du genre *Centaurea* dans le sol algérien (Quezel et Santa, 1963). Quelques exemples sont résumés dans (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Distribution géographique de quelques espèces du genre *Centaurea* (Mishio, 2006).

Localisation	Espèces
Afrique du Nord	<i>C.chamaerhaponticum</i> , <i>C. pullata</i>
Algérie	<i>C.pubescens</i> , <i>C. musimomum</i> , <i>C. dimorpha</i>
Europe	<i>C.maroccana</i> , <i>C. ptosimopappa</i>
Europe de l'est	<i>C.solstitialis</i> , <i>C. diffusa</i>
Région méditerranéenne	<i>C.calcitrapa</i> , <i>C. hololeuca</i>
Saharienne	<i>C.amphalotricha</i> , <i>C. tougourensis</i> <i>C.ruthencia</i> , <i>C. hyalolepis</i> Boiss.

I.2.4 Utilisation du genre *Centaurea* en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont citées dans la littérature pour leur large utilisation en médecine traditionnelle (Yesilada, 2002) et (Kamanzi, 1983). Parmi les propriétés médicinales attribuées aux espèces de ce genre figurent :

- Traitement de certaines maladies comme le diabète, les rhumatismes, le paludisme, l'hypertension (Shoeb, 2005).
- Antidiabétique et antidiarrhéique (Kose, 2007 ; Shoeb, 2005).
- Antirhumatismal (Kose, 2007).
- Effets hypoglycémians et antipyrétiques (Masso, 1979).

Dans la médecine traditionnelle turque, les souches de *Centaurea* sont utilisées pour soulager la douleur et l'inflammation, les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, la fièvre et les maux de tête (Esra, 2009).

I.3 Études chimiques antérieures sur le genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* est riche en métabolites secondaires, les principaux composants comprennent les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les lactones sesquiterpéniques, les stéroïdes, les alcaloïdes et d'autres composants.

I.3.1 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles, principalement dérivées de plantes, contenant dans leur structure chimique au moins un atome d'azote avec différents degrés de basicité. Depuis que le premier alcaloïde, la morphine, a été identifié à partir de l'opium en 1806 (Harborne et Herbert, 1998), plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés à partir de plantes (Hesse, 2002).

Les alcaloïdes du genre *Centaurea* sont principalement des pyrrolizidines et des indolizidines. Le tableau I.2 présente quelques alcaloïdes isolés des espèces de ce genre.

Tableau I.2 : Quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Centaurea*.

Composé	Espèces	Réf
Moschamide	<i>C. moschata</i>	(Sarker, 1998)
Schischkinine	<i>C. schischkinii</i>	(Shoeb, 2005)
Montamine	<i>C. montana</i>	(Shoeb, 2006)
Tryptamine		
<i>N</i> -(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxytryptamine		
<i>Cis-N</i> -(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxytryptamine		
<i>Cis</i> -moschamine	<i>C. cyanus</i>	(Sarker, 2001)
Moschamindole	<i>C. moschata</i>	(Sarker, 1997)
Moschamindolol		
Centcyamine	<i>C. montana</i>	(Shoeb, 2006)
	<i>C. cyanus</i>	(Sarker, 2001)
<i>Cis</i> -centcyamine	<i>C. montana</i>	(Shoeb, 2006)

Tableau I.2 : Quelques alcaloïdes isolés d'espèces du genre *Centaurea*. (Suite)

Composé	Espèces	Réf
Moschamine	<i>C. nigra</i>	(Middleton, 2003)
	<i>C. cyanus</i>	(Sarke, 2001)
	<i>C. moschata</i>	(Sarker, 1997)
	<i>C. montana</i>	(Shoeb, 2006)
	<i>C. arenaria</i>	(Csapi, 2010)
	<i>C. vlachorum</i>	(Entela, 2016)
<i>N</i> -(<i>p</i> -coumaroyl) serotonine	<i>C. vlachorum</i>	
	<i>C. nigra</i>	(Middleton, 2003)
	<i>C. montana</i>	(Shoeb, 2006)
	<i>C. moschata</i>	(Sarker, 1997)

I.3.2 Composés phénoliques

Les composés phénoliques, les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Les composés phénoliques partagent une structure chimique commune contenant un cycle aromatique avec un ou plusieurs substituants hydroxyle qui peuvent être divisés en plusieurs classes, et les principaux groupes de composés phénoliques comprennent les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, les stilbènes et les lignanes (Alu'datt, 2017 ; Cong-Cong, 2017)

I.3.2.1 Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, à partir de laquelle plus de 9 000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harbone, 1973). Ils sont une source d'effets physiologiques positifs en raison de leurs propriétés antioxydantes après neutralisation des radicaux libres et limitation de certains dommages oxydatifs. Ils sont considérés comme des pigments végétaux presque universels, souvent responsables de la couleur des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. A l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme de glycosides (Bruneton, 1999).

Le genre *Centaurea* contient une large gamme de flavonoïdes, plus de 160 flavonoïdes ont été isolés à partir de 74 espèces de *Centaurea*.

Tableau I.3 : Quelques composés flavoniques isolés des espèces du genre *Centaurea*.

Composé	Espèces	Type de composé	Réf
Naringenine	<i>C. fragilis</i>	Flavanone	(Azzouzi, 2016a)
Hesperidine		Flavanone	(Azzouzi, 2016a)
Quercetine	<i>C. napifolia</i>	Flavonol	(Akkal, 2003)
Jaceosidine	<i>C. hierapolitana</i>	Flavone	(Karamenders, 2007)
Montanoside	<i>C. montana</i>	Flavanone	(Shoeb, 2006)
Neohesperidine	<i>C. fragilis</i>	Flavanone <i>O</i> -glycosylés	(Azzouzi, 2016a)
Hispiduline	<i>C. maroccana</i>	Flavone	(Bentamene, 2007)
	<i>C. acaulis</i>		(Hammoud, 2012)
	<i>C. furfuracea</i>		(Akkal, 2003)
	<i>C. melitensis</i>		(Ayad, 2012)
	<i>C. hierapolitana</i>		(Karamenders, 2007)
Cirsimaritine	<i>C. furfuracea</i>	Flavone	(Akkal, 2003)
	<i>C. omphalodes</i>		(Khalfallah, 2012)
	<i>C. omphalotricha</i>		(Kolli, 2012)
Vicenine 2	<i>C. pubescens</i>	Flavone <i>O</i> - glycosylés	(Akkal, 1997)
	<i>C. sicula</i>		(Bicha, 2013)
Isoorientin 7- <i>O</i> -glucoside	<i>C. sicula</i>		
Afzéline	<i>C. bornmuelleri</i> <i>hausskn</i>	Flavonol <i>O</i> - glycosylés	(Shoeb, 2007a)
Neolignane	<i>C. hierapolitana</i>		(Karamenders, 2007)
Kaempferol 7- <i>O</i> - β -D-glucoside.	<i>C. microcarpa</i>	flavonol <i>O</i> - glycosylés	(Louaar, 2011)
	<i>C. furfuracea</i>		(Akkal, 2007)
Chryisine	<i>C. omphalodes</i>	Flavone	(Khalfalla, 2012)
Montanoside	<i>C. montana</i>	Flavone	(Shoeb, 2006)
Algerianine	<i>C. africana</i>	Flavonol	(Sghiri, 2009)
Apigenine	<i>C. orphanidea</i>	Flavone	(Gousiadou, 2003)
	<i>C. maroccana</i>		(Bentamene, 2007)
	<i>C. tougourensis</i>		(Nacer, 2006)

I.3.2.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont une classe importante de composés phénoliques dans les plantes et se présentent sous forme libre ou combinée. Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux sous-groupes : l'acide hydroxybenzoïque (structure C6-C1) et l'acide hydroxycinnamique (structure C6-C3) (Cong-Cong, 2017).

Tableau I.4 : Quelques composés phénoliques isolés des espèces du genre *Centaurea*

Composé	Espèces	Réf
Acide salicylique	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi, 2016b)
Acide 4-Hydroxybenzoïque	<i>C. fragilis</i>	(Azzouzi, 2016a)
Acide protocatechuique	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi, 2016b)
	<i>C. melitensis</i>	(Ayad, 2012)
	<i>C. fragilis</i>	(Azzouzi, 2016a)
Acide chlorogénique	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi, 2016b)

I.3.2.3 Lignanes

Les lignanes sont des composés végétaux naturels constitués principalement de deux unités phénylpropane. On les trouve dans les céréales, les fruits et les légumes.

Des études phytochimiques sur des espèces du genre *Centaurea* ont mis en évidence la présence de ces substances chez de nombreuses espèces. Le tableau I.5 présente quelques lignanes isolés d'espèces du genre *Centaurea*.

Tableau I.5 : Quelques lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea*.

Composé	Espèces	Réf
(-)-Arctigenine	<i>C. diluta subsp. Algeriensis</i>	(Zater, 2016)
Dehydrodiconiferyl alcohol	<i>C. hierapolitana</i>	(Karamenders, 2007)
Matairesinol	<i>C. bornmuelleri Hausskn</i>	(Shoeb, 2007a)
	<i>C. americana</i>	(Cooper, 2002)
Arctigenine		

Tableau I.5 : Quelques lignanes isolés des espèces du genre *Centaurea*. (Suite)

Composé	Espèces	Réf
Lariciresinol 4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>C. cyanus</i>	(Shoeb, 2004)
Berchemol		
Arctiine	<i>C. nigra</i>	(Moirra, 2003)
Matairesinoside	<i>C. bornmuelleri</i> Hausskn	(Shoeb, 2007a)
Matairesinol		

I.3.3 Triterpènes

Les triterpènes sont des composés avec 30 atomes de carbone dans le squelette qui sont formés par la cyclisation de l'époxyqualène. La cyclisation du cation formé par l'époxyqualène peut conduire à la formation de différentes formes triterpéniques : acyclique, tétracyclique ou pentacyclique.

Cette classe de produits naturels comprend les triterpènes, les stéroïdes, les limonoïdes, les quassinoides et les saponines triterpénoïdes et stéroïdiennes (Sandjo, 2013). Cette classe de produits naturels comprend les triterpènes, les stéroïdes, les limonoïdes, les quassinoides, ainsi que les triterpénoïde et saponines stéroïdes. (Sandjo, 2013). Ces composés sont communs à de nombreuses plantes du genre *Centaurea*.

Tableau I.6 : Quelques composés triterpéniques et stéroïdiens isolés des espèces *Centaurea*

Composé	Espèces	Type du composé	Réf
β -Sitostérol	<i>C. africana</i>	Stérols	(Seghiri, 2009)
	<i>C. omphalotricha</i>		(Mouffok, 2012)
Daucostérol	<i>C. africana</i>		(Seghiril, 2009)
	<i>C. omphalotricha</i>		(Mouffok, 2012)
Moschatine	<i>C. moschata</i>	Stéroïdes	(Sarker, 1998)

Tableau I.6 : Quelques composés triterpéniques et stéroïdiens isolés des espèces *Centaurea*
(Suite)

Composé	Espèces	Type du composé	Réf
Lupéol	<i>C. omphalotricha</i>	Triterpene	(Mouffok, 2012)
Taraxastérol	<i>C. omphalotricha</i>		
α -Amirine	<i>C. africana</i>		(Seghiri, 2009)
β -Amirine			

I.4 Etude biologique sur le genre *Centaurea*

Les espèces du genre *centaurea* sont utilisées en médecine traditionnelle car ils possèdent des propriétés thérapeutiques, le tableau regroupe quelques exemples d'espèces dont les activités biologiques susdites ont été vérifiées et confirmées suite à différents travaux

Tableau I.7 : Activités biologiques de certaines espèces du genre *centaurea*

Espèces	Activité biologique	Réf
<i>C. pullata</i>	Antibactérienne	(Djeddi, 2008)
<i>C. moschata</i>	Antioxydant	(Kumarasamy, 2002)
	Antibactérienne	
<i>C. helenioides Boiss</i>	Antiinflammatoire	(Hellwig, 2004)
	Cardiotonique	
	Neurocytotoxique	
<i>C. calcitrapa L</i>	Antipyrétique	(Mishio, 2006)
<i>C. furfuracea</i>	Antiplasmodial	(Akkal, 2007)
	Cytotoxique	
<i>C. montana</i>		(Shoeb, 2006)
<i>C. americana</i>	Antioxydant	(Shoeb, 2006b)
<i>C. achaia</i>	Antifongique	(Skaltsa, 2000a)
<i>C. thessala</i>		(Skaltsa, 2000a)

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II.1 Extraction

II.2 Matériels et produits

II.3 Activités antioxydantes

II.4 Etude biologique sur le genre *Centaurea*

Chapitre II

Matériels et méthodes

Les parties aériennes de cette espèce ont été séchées dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires.

On a séparé les feuilles et les fleurs, ensuite on a broyé chaque partie. Les feuilles pèsent 500 g et les fleurs 600 g.

II.1 Extraction

Le matériel végétal est mis à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (Ethanol/Eau ; 80:20 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits récupérés sont réunis et concentrés. À la solution obtenue, on ajoute sous agitation magnétique, de l'eau distillée (à un rapport de 400 ml d'eau distillée pour 1 kg de matière sèche). La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette dernière permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable.

Après filtration on obtient une solution aqueuse de coloration rouge brune. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Le filtrat est épuisé par le chloroforme, la phase organique est concentrée à sec à une température n'excédant pas 35°C, et donne une masse de 2 g de l'extrait chloroforme fleurs et 1,7 g de l'extrait chloroforme feuilles.

La phase aqueuse résiduelle est reprise avec l'acétate d'éthyle. Cette phase acétate est concentrée à sec et donne un extrait AcOEt de fleurs de masse 2,4 g et un extrait AcOEt de feuilles

de masse 3 g.

Finalement, en suivant la même procédure avec du *n*-butanol, on obtient un extrait *n*-butanol des fleurs de masse 12,2 g et 10,8 g de l'extrait *n*-butanol des feuilles.

La figure II.1 résume la procédure d'extraction.

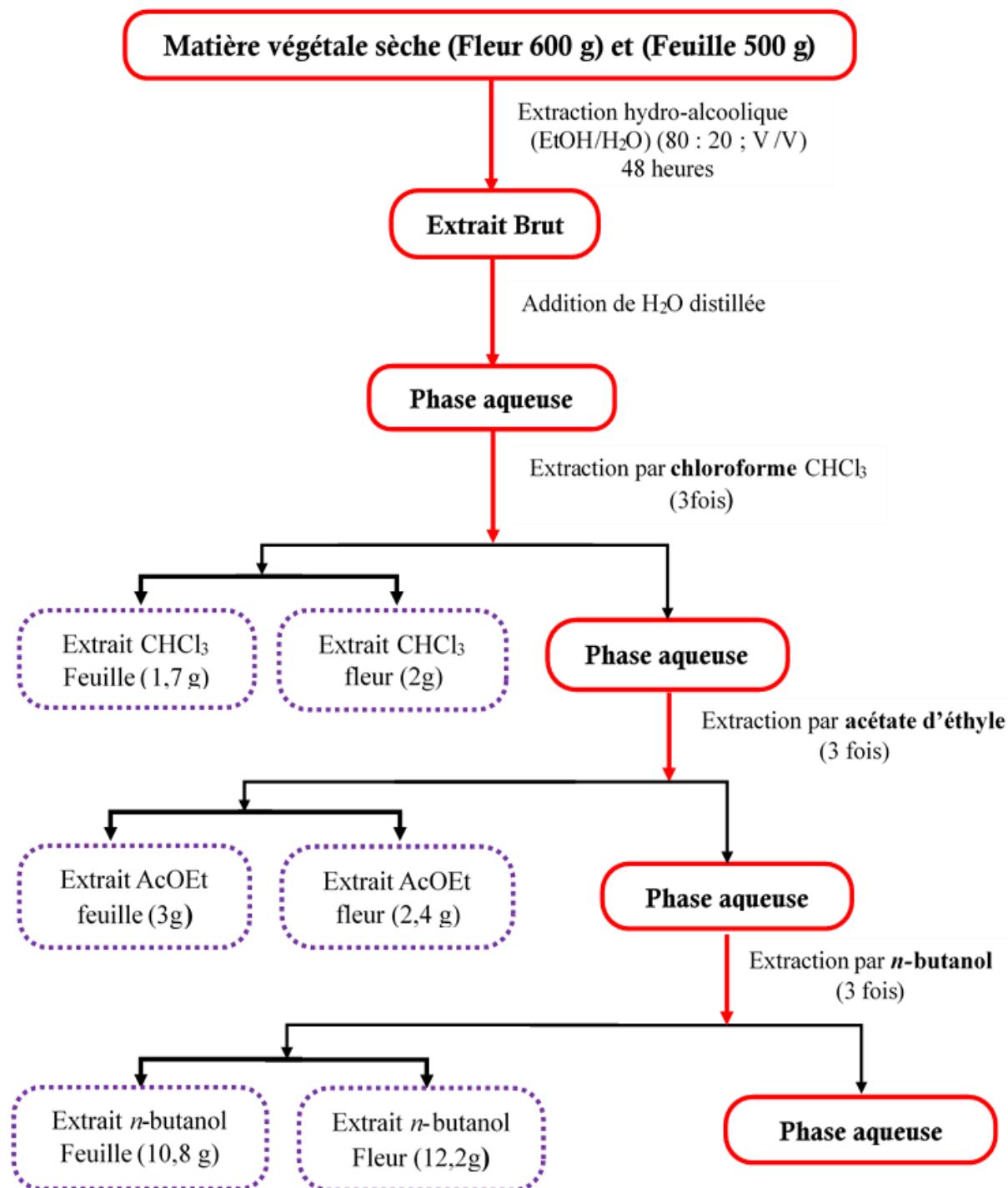


Figure II.1 : Protocole d'extraction

II.2 Matériels et produits

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de biochimie au niveau du centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBt).

II.2.1 Matériels

Etuve, Bain à ultrasons,	Spatule métallique,
Lecteur de microplaque à 96 puits,	Tubes à essais,
Micropipette 500 μ l et 1000 μ l,	Tube Eppendorf (1ml),
Balance analytique de précision,	Microplaque à 96 puits.

II.2.2 Produits chimiques

Méthanol,	$K_2S_2O_8$,	ABTS,
Ethanol,	$K_3Fe(CN)_6$,	DPPH,
Eau distillée,	$FeCl_3$,	Acide trichloroacétique (TCA),
Acide ascorbique,	Trolox,	Phosphate buffer (pH 6,6).
Phenanthroline		

II.3 Activités antioxydantes

Les antioxydants sont des "substances qui contribuent à prolonger la durée de conservation des aliments en les protégeant des altérations causées par l'oxydation, telles que le rancissement des graisses et les changements de couleur" (défini selon le règlement européen CE/1333/2008).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa résistance à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les composés phénoliques. En fait, la plupart des antioxydants, qu'ils soient synthétiques ou naturels, ont des groupes hydroxyles phénoliques dans leur structure, et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^*) et les superoxydes (O_2^*). (Bartosz, 2003).

Diverses méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante en piégeant diverse radicale libre, parmi ces méthodes :

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Ricardo, 1991).

- TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo, 1991).
- Les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie, 1996).
- Les radicaux ABTS[•] (sel d'ammonium d'acide 2, 2-azinobis-3-thylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re, 1999).
- La méthode utilisant le radical libre DPPH[•] (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) (Sharma, 2009 ; Popovici, 2009).

Pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons mené des tests d'activité antioxydante in vitro en utilisant quatre méthodes antioxydantes : piégeage des radicaux libres DPPH, piégeage ABTS, réduction par formation de complexes (Fe⁺² – phénanthroline) et réduction de l'activité énergétique. (FRAP) (reducing power)

II.3.1 Préparation des échantillons

Des échantillons de deux extraits (de fleurs et de feuilles de n-butanol) sont préparés à différentes concentrations et pesés au préalable sur la balance analytique.

Après pesée, 4 mg de chaque extrait sont dissous dans 1 ml de solvant (MeOH ou eau) dans des tubes éppendorf (un tube pour chaque extrait) et met tout en agitation ultrasonique jusqu'à homogénéisation des solutions.

Pour chaque solution d'extrait, six dilutions sont préparées selon la relation 1 en versant 0,5 ml de MeOH ou eau dans six tubes éppendorf de 1 ml

$$(1/2^n) \dots\dots\dots (1)$$

n : le nombre de dilution

Tableau II.1 : les prévenantes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale.

N° de tube	1	2	3	4	5	6	7
Concentrations	1	½	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64

II.3.2 Activité de piégeage de radical libre DPPH

II.3.2.1 Principe

Le DPPH, également connu sous le nom de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, est un radical libre de couleur violette qui conserve sa stabilité à température ambiante. Son dosage est basé sur le mécanisme de transfert d'électrons, dans lequel il est réduit en présence d'une molécule antioxydante capable de céder un atome d'hydrogène (HA). Ce processus conduit à la formation d'une solution de coloration jaune pâle appelée DPPH-H (Figure II.2). L'absorption du DPPH est mesurée à une longueur d'onde de 512 à 517 nm (Molyneux, 2003).

La méthode est basée sur des critères tels que la rapidité, la sensibilité, la facilité d'utilisation et la faible consommation de réactifs (Musa, 2016) et est donc souvent utilisée dans l'étude des antioxydants naturels.

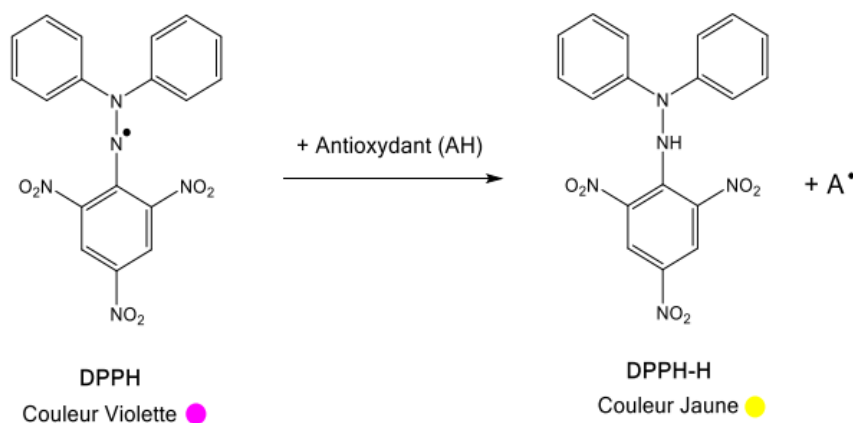


Figure II.2 : Réduction de DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2003).

II.3.2.2 Protocole

Dans un récipient, on ajoute 6 mg de DPPH à 100 ml de méthanol, puis on réserve le mélange à 4°C, à l'abri de la lumière. A l'aide d'un spectrophotomètre, on mesure l'absorbance 0,5-.0,7 à 517 nm.

Dans une microplaque à 96 puits de 200 µl de volume chacun, on verse 160 µl de la solution de DPPH. Ensuite, on l'ajoute 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations dans les puits correspondants. Pour le contrôle négatif, on mélange 40 µl de méthanol avec 160 µl de la solution de DPPH.

Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Enfin, on procède à la lecture des résultats à une longueur d'onde de 517 nm.

Les standards utilisés dans les mêmes conditions réactionnelles sont : Trolox et acide ascorbique.

On a évalué l'activité de piégeage des radicaux DPPH en termes de pourcentage d'inhibition (%), et les résultats ont été exprimés en IC₅₀.

L'IC₅₀ représente la concentration inhibitrice de l'extrait nécessaire pour éliminer 50% des radicaux DPPH dans la solution réactionnelle. Si l'IC₅₀ est plus faible, cela indique une activité plus élevée et meilleure.

$$I\% = \frac{A_{blanc} - A_{echant}}{A_{blanc}} \times 100$$

A: Absorbance du contrôle réactif

A_{éch}: Absorbance de (l'extrait + réactif)

II.3.3 Activité de la réduction du radical-cation ABTS

II.3.3.1 Principe

L'ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) est un radical stable et incolore. En présence de persulfate de potassium (K₂S₂O₈), il s'oxyde pour former le radical ABTS^{•+} en extrayant un électron d'un atome d'azote de l'ABTS. Le test ABTS est utilisé pour évaluer la capacité de piégeage et l'activité antioxydante. Il est basé sur la capacité du composé à neutraliser le radical-cation ABTS^{•+}, ce qui donne une couleur bleu turquoise (Re, 1999).

En présence d'un antioxydant, qui agit comme donneur d'un atome d'hydrogène (H[•]), le radical-cation ABTS^{•+} se transforme en ABTSH⁺ par piégeage d'un H[•] (Figure II.3).

Cette réaction entraîne la disparition de la coloration de la solution (Sochor, 2010). L'intensité de la coloration dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire.

L'absorption de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

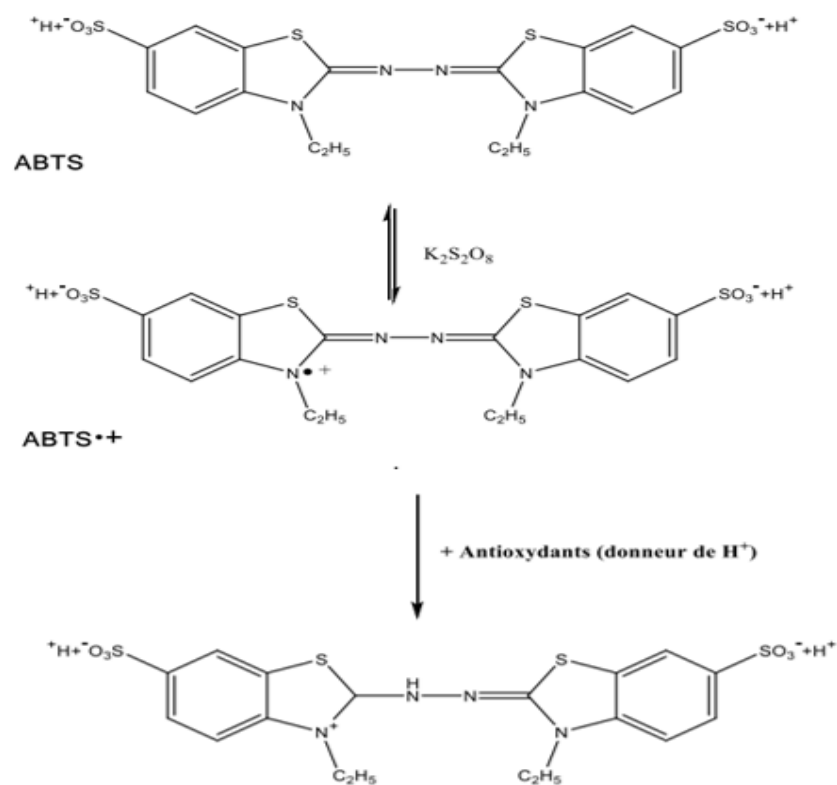


Figure II.3 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant (Re, 1999)

II.3.2.2 Protocole

Pour préparer la solution d'ABTS à une concentration de 7 mM, on a dissous 19,2 mg d'ABTS dans 5 ml d'eau. De même, pour préparer la solution de persulfate de potassium K₂S₂O₈ à une concentration de 2,45 mM, on a dissous 3,3 mg de K₂S₂O₈ dans 5 ml d'eau. Les deux solutions ont été mélangées pour proliférer la formation de l'ABTS^{•+}. Ce mélange est ensuite laissé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 12 à 16 heures. Après cette période, le mélange est dilué avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir une absorbance de 0,7±0,02 à 734 nm.

Dans les microplaques, on ajoute 40 µl de l'extrait à différentes concentrations, puis on ajoute 160 µl de solution fraîche d'ABTS. Pour les derniers puits, on prépare le blanc en remplaçant l'extrait par du méthanol (MeOH). Ensuite, on incube le tout pendant 10 minutes dans l'obscurité et à température ambiante, suivi de la lecture de l'absorbance à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaques. (Re, 1999)

Les standards suivants on utilise dans les mêmes conditions réactionnelles : Trolox et acide ascorbique.

L'activité de capture des radicaux ABTS a été évaluée en tant que pourcentage d'inhibition (%). Les résultats sont exprimés en IC₅₀.

II.3.4 Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

II.3.4.1 Principe

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), qui évalue la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}), est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante d'un extrait. Ce test est considéré comme direct et rapide. L'apparition du Fe^{2+} est révélée par un changement de couleur, passant du jaune au bleu-vert (Figure II.4), et l'intensité de cette coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaques à une longueur d'onde de 700 nm (Benzie, 1996).

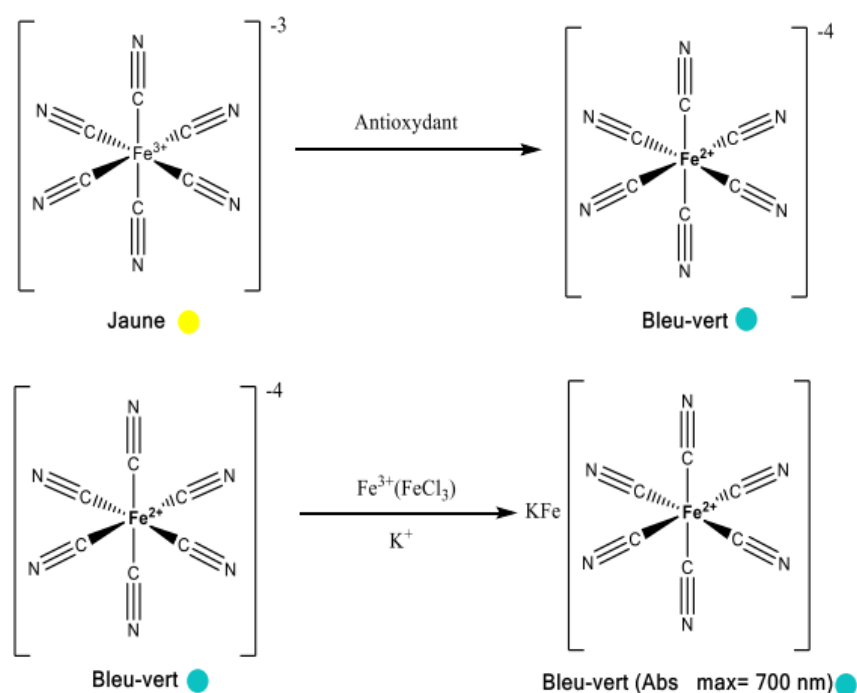


Figure II.4 : Mécanisme réactionnel du test FRAP (Benzie, 1996).

II.3.3.2 Protocol

La méthode décrite par Oyaizu en 1986 (Oyaizu, 1986) avec une légère modification est utilisée pour déterminer le pouvoir réducteur des extraits. Les solutions de réaction on prépare comme suit :

- Un tampon phosphate buffer à (pH=6,6),
- La solution de ferricyanure de potassium (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 ml H_2O),
- La solution d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) (1 g de TCA dans 10 ml H_2O),

- La solution de chlorure de ferrique FeCl_3 (0,1%) (0,1 g de FeCl_3 dans 100 ml H_2O).

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, on ajoute 10 μl de l'extrait à différentes concentrations, puis on ajoute 40 μl de tampon phosphate buffer (pH = 6,6), en mélangeant avec 50 μl de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%). Le mélange est incubé dans une étuve à 50 °C pendant 20 minutes. Après l'incubation, on ajoute trois solutions : 50 μl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 10 μl de FeCl_3 (0,1%) et 40 μl d'eau distillée. Il est important de noter qu'un blanc est également préparé dans le dernier puits, en suivant la même méthode, mais en remplaçant l'extrait par du méthanol (MeOH). La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 700 nm.

Les résultats sont exprimés en $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$), correspondant à une concentration présentant une absorbance de 0,50.

Les standards utilisés dans les mêmes conditions réactionnelles sont l'acide ascorbique et Trolox

II.3.5 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline.

II.3.4.1 Principe

Il s'agit d'une opération simple basée sur la création du complexe Fe^{+2} -phénanthroline à partir de fer en solution aqueuse sous forme de fer réduit (Fe^{+2}), détectable par spectrophotométrie. Cette réaction se déroule en présence d'1,10-phénanthroline (également connue sous le nom d'orthophénanthroline) dans une solution acide ayant un pH compris entre 3 et 4 (Figure II.5).

Le complexe Fe^{+2} -phénanthroline, également connu sous le nom de ferroïne, présente une couleur rouge-orangé foncé. Il est largement utilisé comme indicateur d'oxydoréduction en chimie. Ce complexe ionique octaédrique est soluble et stable en solution aqueuse, ce qui permet de mesurer son absorbance à une longueur d'onde de 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaques (Adhikamsetty, 2008 ; Belcher, 1973).

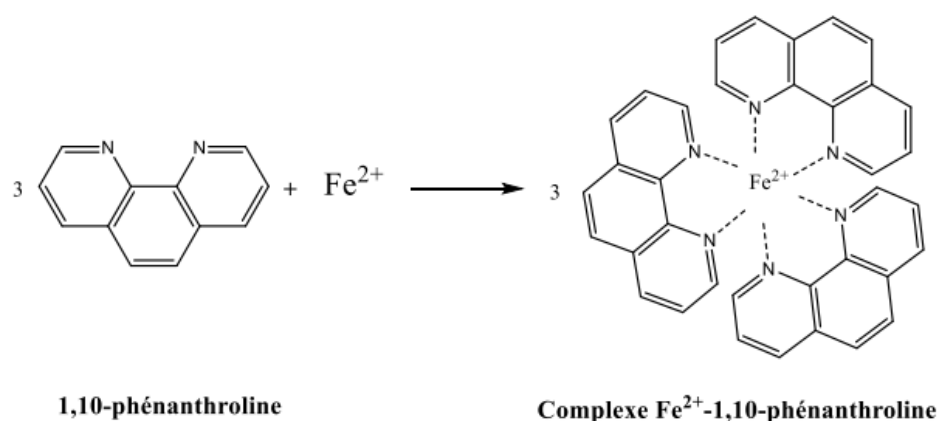


Figure II.5 : Formation du complexe Fe⁺²-phenanthroline.

II.3.4.2 Protocol

La méthode décrite par Szydłowska-Czerniaka en 2008 (Szydłowska-Czerniaka, 2008) est utilisée pour déterminer l'activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline des extraits. Les solutions réactionnelles on prépare comme suit :

- Le phénanthroline (0,5 %), on prépare en dissolvant 0,05 g de 1,10-phénanthroline dans 10 ml de méthanol.
- Le chlorure ferrique FeCl₃ (0,2 %), on prépare en dissolvant 0,02 g de FeCl₃ dans 10 ml d'eau.

Dans les puits, on ajoute 10 µl des extraits à différentes concentrations, puis on ajoute 50 µl de FeCl₃ (0,2 %), suivi de l'ajout de 30 µl de phénanthroline (0,5 %) à la solution.

Enfin, on complète le mélange avec 110 µl de méthanol, en n'oubliant pas le blanc (qui on prépare de la même manière que les autres échantillons, sauf que l'extrait est remplacé par du méthanol). Le mélange est incubé pendant 20 minutes dans une étuve à une température de 30°C, puis on mesure l'absorbance à une longueur d'onde de 510 nm.

Les résultats sont exprimés en A_{0.5} (µg/ml), ce qui correspond à une concentration présentant une absorbance de 0,50. Les standards utilisés dans les mêmes conditions réactionnelles sont le Trolox et l'acide ascorbique.

II.4 Analyses statistiques

Les histogrammes et les tableaux sont tracés par le Microsoft Excel 2013.

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 3.

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Les valeurs d'A_{0,5} (la concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [Absorbance= f (concentrations)]

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1 Rendement des extraits

III.2 Activités antioxydantes

III.3 Conclusion

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Rendement des extraits

Le calcul du rendement de cette extraction par rapport à la matière sèche est reporté dans le tableau III.1

Tableau III.1: Rendement des extraits

	Rendement (%)		
	Ext CHCl ₃	Ext AcOEt	Ext <i>n</i> -BuOH
Les fleurs	0,33	0,40	2,03
Les feuilles	0,34	0,60	2,16

III. 2 Activités antioxydantes

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits. La complexité chimique des extraits, leur polarité et leur comportement chimique peuvent entraîner des résultats positifs selon le test utilisé.

Dans cette étude, l'activité antioxydante des extraits *n*-butanol des feuilles et des fleurs d'une plante appartenant au genre *Centaurea* a été évaluée à l'aide de quatre méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du radical-cation ABTS, le test du pouvoir réducteur FRAP et le test du phénanthroline . Il est évident qu'une seule méthode ne suffit pas à caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon.

Les propriétés antioxydantes des extraits de la plante ont été comparées aux standards de l'acide ascorbique et du Trolox pour toutes les activités.

III.2.1 Test de l'activité scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits est évaluée en mesurant leur capacité à fournir un atome d'hydrogène, en utilisant le radical libre stable DPPH, et cette mesure est effectuée à une longueur d'onde de 517 nm.

Le Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme référence standard. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et du standard (Figure III.1).

Les valeurs d'IC₅₀ fournissent une mesure de l'activité antioxydante, où une valeur plus faible indique une plus grande capacité à inhiber les radicaux libres. Les valeurs de CI₅₀, exprimées en µg/ml, sont calculées graphiquement à partir des droites de régression obtenues, qui représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait testé.

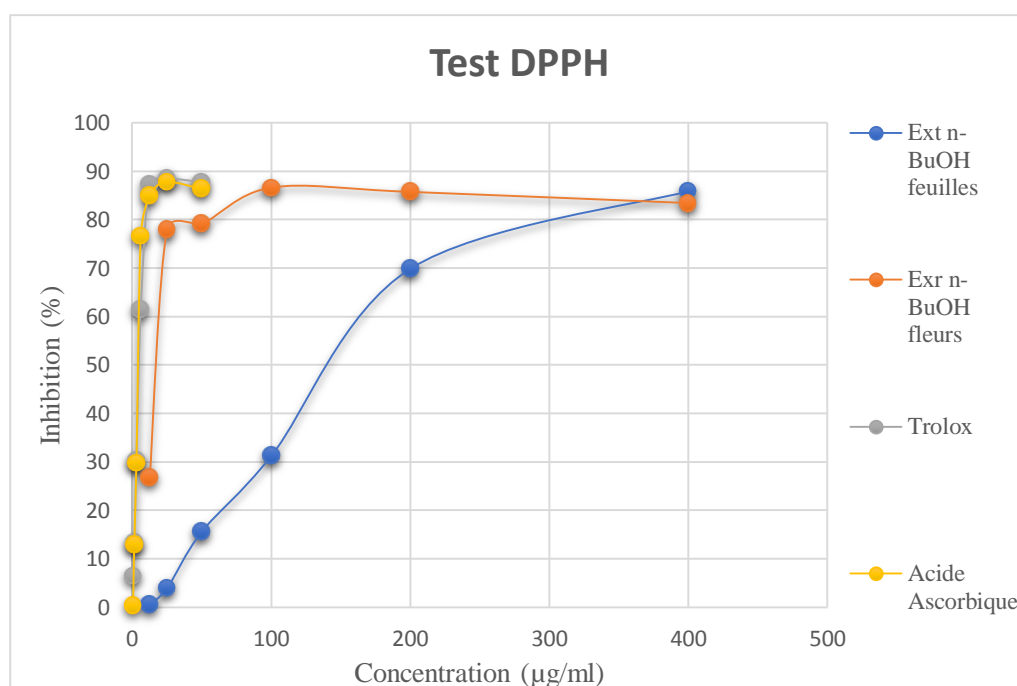
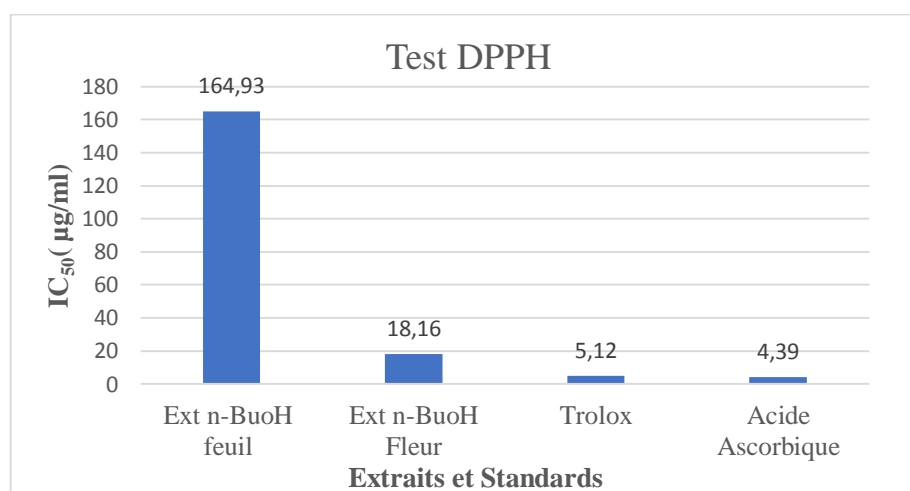


Figure III.1 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents échantillons

Les valeurs de l'IC₅₀ pour chaque extrait, ainsi que celles de Trolox et de l'acide ascorbique, sont représentées dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits et du standard utilisant le test du DPPH

Extraits et standards	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ext <i>n</i> -BuOH feuilles	146,93±3,99
Ext <i>n</i> -BuOH fleurs	18,16±0,19
Trolox	5.12±0.21
Acide ascorbique	4.39±0.01

**Figure III.2 :** Histogrammes montrent les valeurs de l' IC_{50} de test DPPH.

La figure III.2 révèle que les deux extraits testés ont une activité anti radicalaire dose dépendante vis-à-vis du DPPH'. L'extrait *n*-BuOH de fleurs présente un IC_{50} de $18,16 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$, ce qui indique une activité antioxydante modérée. En comparaison, l'extrait *n*-BuOH de feuilles montre un IC_{50} plus élevé de $146,93 \pm 3,99 \mu\text{g/ml}$, ce qui suggère une activité antioxydante relativement plus faible.

En revanche, les standards Trolox et acide ascorbique présentent des IC_{50} plus bas. Trolox affiche un IC_{50} de $5,12 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, tandis que l'acide ascorbique montre un IC_{50} de $4,39 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$. Ces deux standards présentent donc une activité antioxydante plus élevée que les extraits testés.

En conclusion, les extraits *n*-BuOH de fleurs et de feuilles présentent des activités antioxydantes moins importantes par rapport aux standards Trolox et acide ascorbique. Cependant, l'extrait *n*-BuOH de fleurs montre une activité antioxydante plus élevée que l'extrait *n*-BuOH de feuilles.

III.2.2 Activité antioxydante déterminée par la méthode d'ABTS^{•+}

L'activité scavenger des extraits est également examinée en utilisant la méthode ABTS. Cette méthode implique la réaction du persulfate de potassium avec l'ABTS pour former le radical ABTS^{•+}. La génération préalable du radical avant l'ajout des extraits est nécessaire pour éviter toute interférence des composés dans la formation du radical, ce qui pourrait surestimer la capacité antioxydante (Katalinic, 2006).

L'incorporation de l'extrait ou des standards dans la solution entraîne un changement de couleur, indiquant la présence d'une activité scavenger des échantillons. Les résultats du test de mesure de l'ABTS^{•+} nous ont permis de construire des graphiques montrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon (Figure III.3).

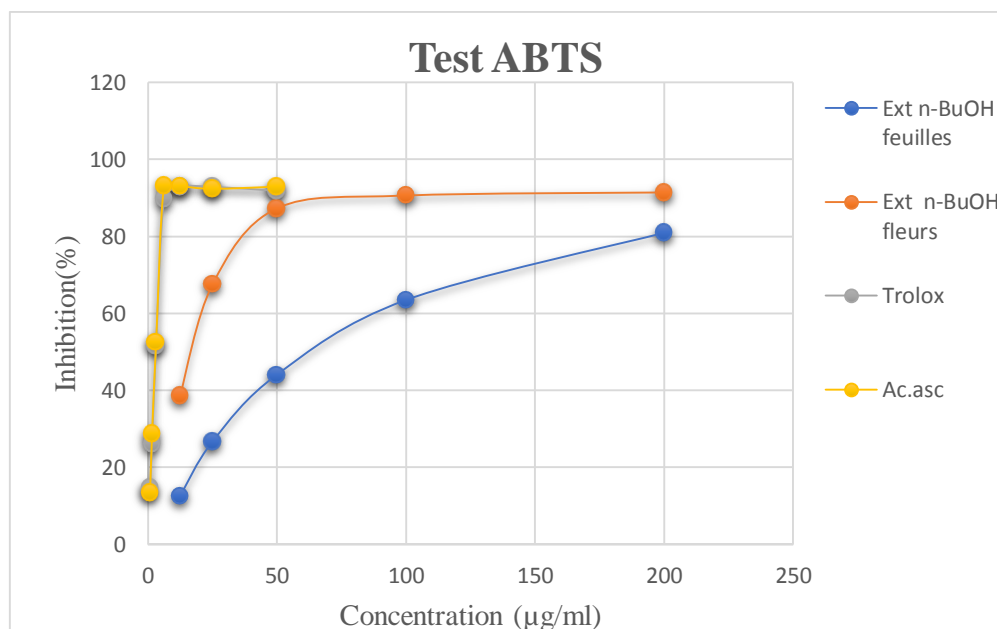


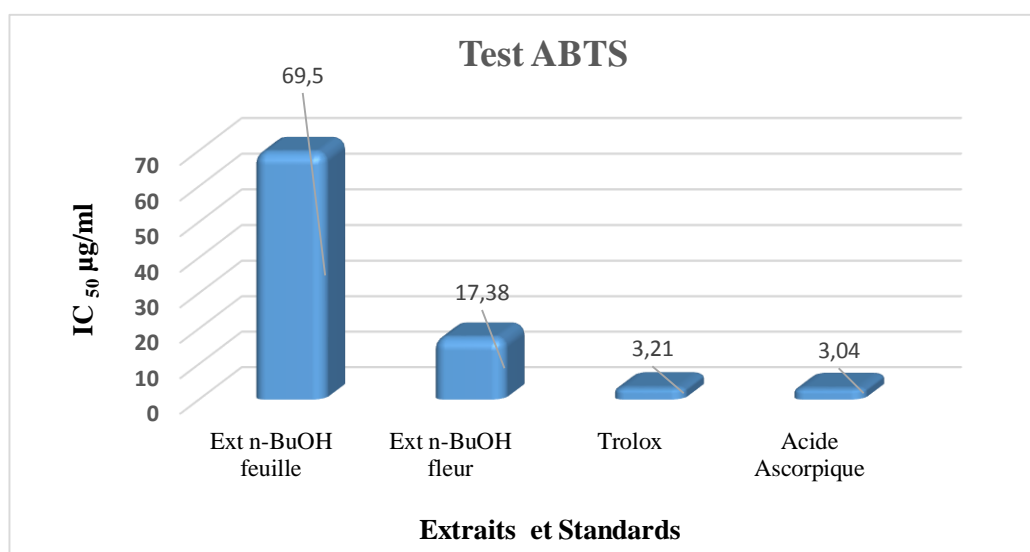
Figure III.3 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les différents échantillons.

Le tableau III.3 présente les valeurs du pouvoir antioxydant (IC_{50}) des deux échantillons, ainsi que celles des standards Trolox et acide ascorbique. Ces valeurs ont été calculées graphiquement à l'aide des régressions linéaires des graphiques tracés.

Les valeurs d' IC_{50} concernant les deux extraits, le Trolox et l'acide ascorbique sont résumées dans le tableau III.3 et la figure III.4.

Tableau III.3 : Pouvoir d'inhibition IC_{50} des extraits et du standard utilisant le test d'ABTS^{•+}

Extraits et standards	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ext <i>n</i> -BuOH feuilles	69,50±2,85
Ext <i>n</i> -BuOH fleurs	17,38±0,21
Trolox	3,21±0,06
Acide ascorbique	3,04±0,05

**Figure III.4** : Histogrammes montrent les valeurs de l' IC_{50} de test ABTS.

Les résultats obtenus des pourcentages d'inhibition et des valeurs des IC_{50} indiquent que les deux extraits présentent des activités antioxydantes moins significatives que les deux antioxydants de référence (Figure III.4).

L'extrait *n*-BuOH des fleurs présente la plus faible IC_{50} ($17,38 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$), ce qui suggère une forte activité antioxydante. L'extrait *n*-BuOH des feuilles a une IC_{50} plus élevée ($69,50 \pm 2,85 \mu\text{g/ml}$), indiquant une activité antioxydante relativement moins puissante que l'extrait des fleurs.

En ce qui concerne les standards, le Trolox et l'acide ascorbique ont des valeurs d' IC_{50} très similaires, avec le Trolox à $3,21 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ et l'acide ascorbique à $3,04 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$. Ces deux substances sont des antioxydants couramment utilisés comme références dans les études antioxydantes.

En résumé, l'extrait *n*-BuOH des fleurs présente une activité antioxydante plus élevée que l'extrait *n*-BuOH des feuilles, tandis que le Trolox et l'acide ascorbique ont des activités antioxydantes similaires.

III.2.3 Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique(FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir donneur d'électron. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$ de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{2+}) de coloration bleu verte, ce qui est indicatif de son potentiel antioxydant.(Bentabet, 2014).

Les valeurs $A_{0,5}$ correspondant à la concentration de 0,5 d'absorbance, ont été calculées à partir du graphique d'absorbance en fonction de la concentration de chaque échantillon, afin de comparer les données d'activité. Plus la valeur de l' $A_{0,5}$ est petite plus la capacité de l'antioxydant est meilleur.

Les valeurs d' $A_{0,50}$ concernant les deux extraits, le Trolox et l'acide ascorbique sont résumées dans le tableau III.4 et la figure III.5.

Tableau III.4 : Pouvoir réducteur $A_{0,5}$ des extraits et du standard utilisant le test FRAP

Extraits et standards	$A_{0,5}(\mu\text{g/ml})$
Ext <i>n</i> -BuOH feuilles	144,49±7,78
Ext <i>n</i> -BuOH fleurs	43,11±1,27
Trolox	5,25±0,20
Acide ascorbique	3,62±0,29

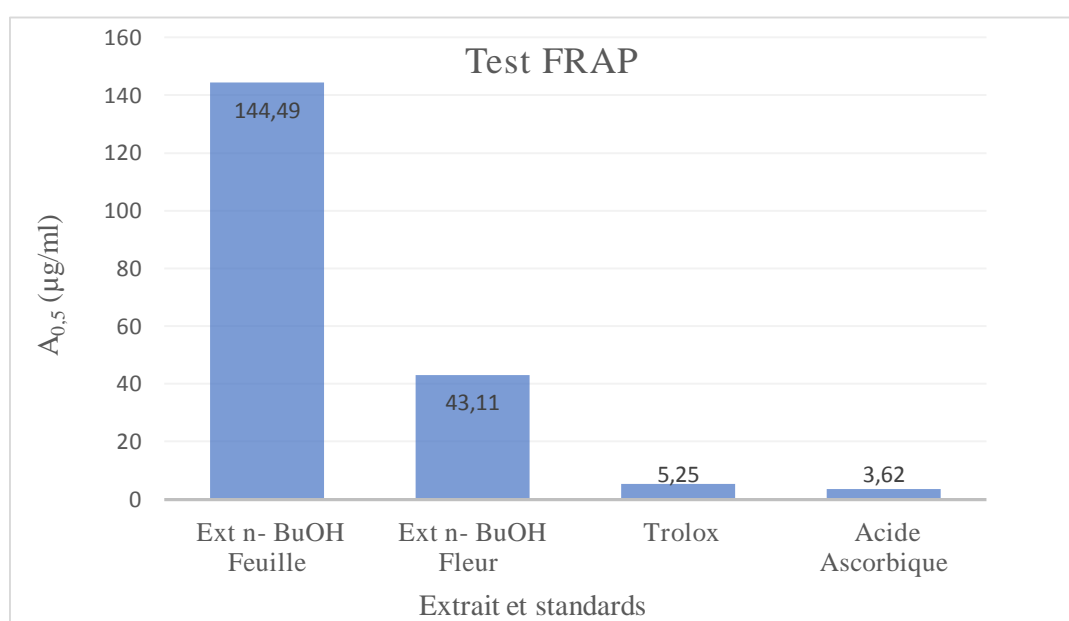


Figure III.5 : Histogrammes montrent les valeurs de l' $A_{0,5}$ de test FRAP.

La figure III.5 montre que l'extrait *n*-BuOH des fleurs présente une $A_{0,5}$ plus basse ($43,11 \pm 1,27 \mu\text{g/ml}$) par rapport à l'extrait *n*-BuOH des feuilles ($144,49 \pm 7,78 \mu\text{g/ml}$). Cela suggère que l'extrait des fleurs a une activité antioxydante plus élevée dans l'activité FRAP que l'extrait des feuilles.

En ce qui concerne les standards, le Trolox a une $A_{0,5}$ de $5,25 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$, tandis que l'acide ascorbique a une $A_{0,5}$ de $3,62 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$. Ces deux substances ont une activité antioxydante plus élevée que les extraits, ce qui indique qu'elles sont plus efficaces pour réduire les ions ferriques dans l'activité FRAP.

En résumé, l'extrait *n*-BuOH des fleurs présente une activité antioxydante plus élevée que l'extrait *n*-BuOH des feuilles dans l'activité FRAP. Cependant, les standards, tels que le Trolox et l'acide ascorbique, ont une activité antioxydante plus élevée que les extraits, ce qui suggère qu'ils pourraient être plus efficaces en tant qu'antioxydants dans cette activité spécifique.

III.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénanthroline

La méthode de la phénanthroline est couramment utilisée pour évaluer la capacité antioxydante totale des substances antioxydantes. Cette méthode est basée sur la capacité d'un agent antioxydant à réduire le fer trivalent (Fe^{3+}) en fer divalent (Fe^{2+}). L'ion Fe^{2+} formé réagit ensuite avec la phénanthroline pour former un complexe de couleur rouge orangé, qui peut être quantifié par sa capacité d'absorption à une longueur d'onde de 510 nm (Szydłowska-Czerniaka, 2008).

Le tableau III.5 et la figure III.6 présentent les valeurs d' $A_{0,5}$ pour les deux extraits *n*-BuOH (fleurs et feuilles), le Trolox et l'acide ascorbique.

Tableau III.5 : Pouvoir réducteur $A_{0,5}$ des extraits et du standard utilisant le test phénanthroline

Extraits et standards	$A_{0,5}(\mu\text{g /ml})$
Ext <i>n</i> -BuOH feuilles	$55,66 \pm 3,47$
Ext <i>n</i> -BuOH fleurs	$8,90 \pm 2,23$
Trolox	$5,21 \pm 0,27$
Acide ascorbique	$3,08 \pm 0,02$

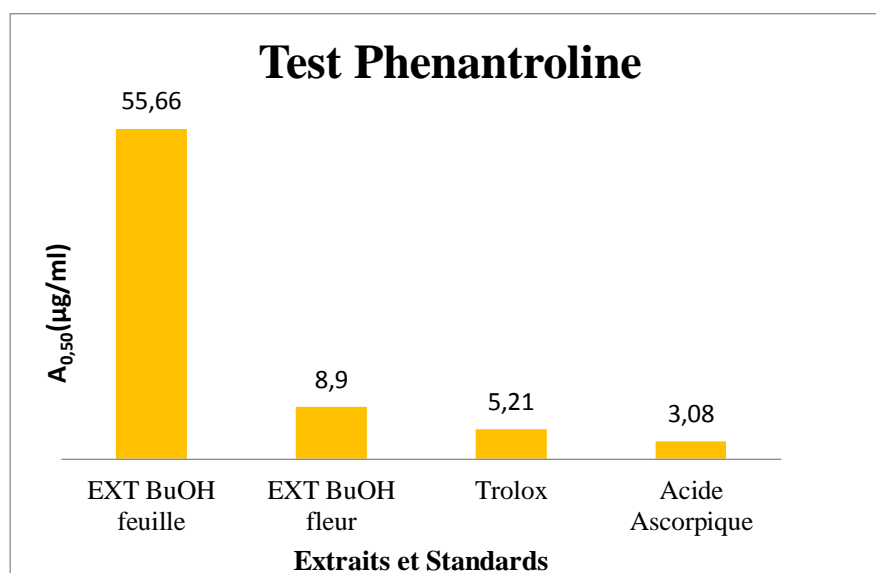


Figure III.6 : Histogramme représentant les valeurs de l' $A_{0,5}$ de test phenantroline

D'après la figure III.6, on observe que l' $A_{0,5}$ de l'extrait *n*-BuOH des fleurs ($8,90 \pm 2,23 \mu\text{g/ml}$) est considérablement plus bas que celui de l'extrait *n*-BuOH des feuilles ($55,66 \pm 3,47 \mu\text{g/ml}$). Cela indique que l'extrait *n*-BuOH des fleurs possède une meilleure capacité de réduction des ions Fe^{3+} et de formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline que l'extrait *n*-BuOH des feuilles.

En comparaison avec les standards, le Trolox présente un $A_{0,5}$ de $5,21 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$, ce qui se situe entre les valeurs des extraits *n*-BuOH de fleurs et de feuilles. Cela suggère que le Trolox possède une activité de réduction similaire à celle des extraits végétaux testés.

Par ailleurs, l'acide ascorbique présente le plus bas $A_{0,5}$ parmi toutes les substances comparées, avec une valeur de $3,08 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$. Cela indique que l'acide ascorbique a la plus forte capacité de réduction des ions Fe^{3+} et de formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline parmi les composés étudiés.

En conséquence, l'extrait de fleurs ayant des activités antioxydantes plus levées que l'extrait des feuilles

III.3 Conclusion

Lors de l'utilisation des quatre méthodes, il a été observé que l'extrait butanolique des fleurs présente une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait butanolique des feuilles. Cette différence peut s'expliquer par la composition phytochimique ou/et la synergie entre les composants. Ces deux dernières peuvent également influencer l'activité antioxydante globale.

D'autre part, les résultats montrent que le test à la phenthroline avait un effet antioxydant significativement plus élevé dans les deux extraits (fleur et feuille) par rapport aux autres activités.

Conclusion générale

L'évaluation des plantes médicinales en termes de leurs activités biologiques a connu une augmentation significative à l'échelle mondiale. Preuve que les molécules isolées à partir de ces plantes sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

Dans le cadre de notre étude, nous nous concentrons sur l'évaluation du pouvoir antioxydant de deux extraits butanoliques issus d'une plante médicinale de la famille des Astéracées, plus précisément du genre *Centaurea*. Ces extraits sont obtenus à partir des feuilles et des fleurs de la plante.

L'étude de utilisant différents tests tels que le DPPH, l'ABTS, le FRAP et la phénanthroline. Les résultats ont démontré que ces extraits butanoliques présentent une capacité d'inhibition des radicaux libres, attribuée à la présence de phénols et de flavonoïdes de qualité dans les extraits. De plus, ces extraits ont montré une activité antioxydante/capacité réductrice modérée par rapport aux standards utilisés tels que l'acide l'activité antioxydante de deux extraits butanoliques issus des feuilles et des fleurs a été réalisée en ascorbique et le trolox.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits *n*-BuOH des feuilles et des fleurs de la plante a permis de constater que l'extrait de fleurs présentait la capacité antioxydante la plus élevée.

En outre, il convient de noter que le test à la phénanthroline a démontré un effet antioxydant élevé dans les deux extraits (fleurs et feuilles), par rapport aux autres activités évaluées.

En fin, toutes ces recherches ne représentent qu'une première étape dans la quête de substances naturelles biologiquement actives. Et pour compléter cette étude, il serait souhaitable de :

- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques.
- ✓ Analyser les extraits obtenus par des méthodes plus performantes.
- ✓ Etude pour isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques et afin d'évaluer d'autres activités biologiques.

Références bibliographiques

A

- Adhikamsetty R.K., Gollapalli N.R., Jonnalagadda S.B., (2008). Cinétique de complexation de Fe^{2+} avec la 1,10 phenantroline formant du ferrioxalate dans des solutions acides. *J international de cinétique chimique*, 40(8), 515-523.
- Akkal S., Benayache F., Benayache S., Jay M., (1997). Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 361-362.
- Akkal S., Benayache F., Medjroubi K., Tillequin F., (2007). Flavanol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, 319-320.
- Akkal S., Benayache F., Medjroubi K., Tillequin F., Seguin E., (2003). Flavonoids from *Centaurea furfuracea* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 641-643.
- Alu'datt M.H., Rababah T., Alhamad M.N., Al-Mahasneh M.A., Almajwal A., Gammoh S., Ereifej K., Johargy A., Alli I., (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 218, 99-106.
- Atmani G., Benayache S., Benayache F., Dendougui H., Jay M., (1998). Métabolisme des Composés flavoniques de *Centaurea nicaensis* All. *J Soc Alg Chim*, 8, 29-38.
- Ayad R., Ababsa Z.E.A., Belfadel F.Z., Akkal S., Leon F., Brouard I., Medjroubi K., (2012). phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *Int. J. Med. Plants*, 2, 151-154.
- Azzouzi D., Mekkiou R., Demirtas I., Gul F., Seghiri R., Boumaza O., Benayache S., Benayache F., (2016a). Qualitative and Quantitative Analysis of Polar Extract from *Centaurea fragilis* Dur. Using HPLC-TOF/MS. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 8, 1526-1528.
- Azzouzi D., Bioud K., Demirtas I., Gul F., Sarri D., Benayache S., Benayache F., Mekkiou R., (2016b). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 13, 841-846.

B

- Barkely T.M., Brouillet L., Strother J.L., (2006). Flora of North America-Asteraceae, 19, 20-21.

- Bartosz G., (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments Toxicol*, 9, 5-21.
- Belcher R., (1973). The application of chelate compounds in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem*, 34(1), 13-28.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., & Boucherit K., (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *researchGate*, 1-8.
- Bentamene A., Benayache S., Creche J., Bermejo J., Benayache F., (2007). Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 34, 749-750.
- Benzie I.F., Strain J., (1996). the ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76.
- Bicha S., Amrani A., Benaissa O., Leon F., Zama D., Brouard I., Benayache S., Bentamene A., Benayache F., (2013). A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L. *Scholars Research Library*, 5, 24-30.
- Bremer K., (1994). Asteraceae (Cladistics) and Classification. *Timber Press*. Portlande. Oregon. 752p.
- Bruneton J., (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème édition. 3, Lavoisier, Paris.

C

- Cong-Cong X., Bing W., Yi-Qiong P., Jian-Sheng T., Tong Z., (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15, 721-731.
- Cooper G., Laird A., Nahar L., Sarker S.D., (2002). Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(1), 65-67.
- Crete P., (1965). Précis de botanique. *Masson édition 2*, Paris. 429p.
- Csapi B., Hajdú Z., Zupkó I., Berényi Á., Forgo P., Szabó P., Hohmann J., (2010). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research*, 24, 1664-1669.

D

Dellile L., (2007). les plantes médicinales en Algérie *Edition BERTI*. Alger 122.

Djeddi S., Karioti A., Sokovic M., Koukoulitsa C., Skaltsa H., (2008). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem*, 16, 3725-3731.

E

Esra K.A., Arif R., Ergun F., Yesilada E., (2009). Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 210-215.

Entela H., Olga T., Sokol A., Hadjipavlou-Litina D., & Diamanto L., (2016). Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Formerly Natural Product Letters* , 31, 1195-1200.

F

Fortuna A.M., De Riscalca E.C., Catalan C.A., Gedris T.E., Herz W., (2001). Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9), 967-971.

H

Hammoud L., Seghiri R., Benayache S., Mosset P., Lobstein A., Chaabi M., Leon F., Brouard I., Bermejo J., Benayache F., (2012). A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Natural Product Research*, 26, 203-208.

Harborne F., Herbert B., (1998). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol. Taylor and Francis.

Harborne J.B., (1973). *Methods of Plant Analysis*. *Phytochemical Methods*. 33.

Harborne J.B., Williams C.A., (1992). Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Hellwig F.H., (2004). *Centaureinae* (Asteraceae) en Méditerranée-histoire du rayonnement écogéographique. *Plant Systematics and Evolution*, 246, 137-162.

Hesse M., (2002). *Nature's Curse or Blessing*. Wiley Vch.

Hodaj E., Tsiftoglou O., Abazi S., Hadjipavlou-Litina D., Lazari D., (2016). Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Natural Product Research*, 31, 1195-1200.

I

Ivancheva S., Tsvetkova R., (2003). Distribution of flavonoid aglycones in tribe Anthemideae (Asteraceae). *Advances in phytochemistry*, 85-95 ref 32.

G

Gousiadou C., Skaltsa H., (2003). Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(4), 389-396.

Gurib-Fakim A., (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Spectra of Medicine*, 27, 1-93.

K

Kamanzi K., Raynaud J., Voirin B., (1983). Les flavonoïdes C-glycosyl dans les fleurs de *Centaurea melitensis* L. (Compositae). *Plantes Médicinales et Phytothérapie* (France), 17,47-51.

Karamenderes C., Bedir E., Pawar R., Baykan S., Khan I.A., (2007). Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry*, 68(5), 609-615.

Katalinic V., Milos M., Kulisic T et Jukic M., (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.

Khalfallah A., Berrehal D., Kabouche A., Touzani R., Kabouche K., (2012). Flavonoids from *Centaurea omphalodes*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 482-483.

Kolli E., Leon F., Benayache F., Estevez S., Quintana J., Bermejo J., Benayache S., Braz J., (2012). Cytotoxic Sesquiterpene Lactones and other Constituents of *Centaurea omphalotricha*. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 23, 977-983.

Köse Y.B., İşcan G., Demirci B., Başer K.H.C., Çelik S., (2007). Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. *Fitoterapia*, 78(3), 253-254.

Kumarasamy Y., Fergusson M.E., Nahar L., Sarker S.D., (2002). Bioactivity of Moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharmaceutical Biology*, 40, 307-310.

L

Louaar S., Achouri A., Lefahal M., Laouer H., Medjroubi K., Duddeck H.S., Akkal., (2011). Flavonoids from Algerian Endemic *Centaurea microcarpa* and their chemotaxonomical significance. *Nat Prod Commun*, 6, 1603-1604.

M

- Mabberley D.J., (1987). The Plante Book 110. *Cambridge University Press*.
- Masso J.L., Bertran M., Adzet T., (1979). Contribution to the chemical and Contribution to the chemical and pharmacological study of some species of *centaurea compositae*. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*,13(1), 41-45.
- Medjroubi K., Benayache F., Bermejo J., (2005). Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum* Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*,76(7-8), 744-746.
- Medjroubi K., Bouderdara N., Benayache F., Akkal S., Seguin E., Tillequin F., (2003). Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*. *Chemistry of natural compounds*, 39(5), 506-507.
- Middleton M., Cox P.J., Jaspars M., Kumarasamy Y., Reid R., Sarker S.D., (2003). Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol*, 31, 653-656.
- Mishio T., Honma T., Iwashina T., (2006). Flavonoïdes jaunes de *Centaurea ruthenica* comme pigments floraux. *Systématiques Biochimique et Ecologie*, 34, 180-184.
- Moira M., Philip J.C., Marcel J., Yashodharan K., Lutfun N., Raymond., (2003). Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 653-656.
- Molyneux P., (2003). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Mouffok S., Haba H., Lavaud C., Long C., Benkhaled M., (2012). Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. *Rec. Nat. Prod*, 3, 292-295.
- Musa K.H., Abdullah A., Al-Haiqi A., (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks. *Food Chem*, 194, 705-711.

N

- Nacer A., Bernard A., Boustie J., Touzani R., Kabouche Z., (2006). Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* from algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 230-231.

O

- Oyaizu M., (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet*, 44(6), 307-315.

Ozenda P., (1991). Flor et végétation du Sahara. 3^{ème} Ed. C.N.R.S. Paris .662p.

P

Pelt J.M ., (2001). les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris.

Picher M.T., Seoane E., Amparo T., (1984). Cires, triterpènes, stéroïdes et acides libres et liés dans les feuilles et les tiges de *Centaurea aspera*. *Journal of naturale products*, 47, 184-185.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.

Q

Quezel P et Santa S., (1963). Nouvelle Flore de L'Algeria et des régions désertiques méridionales, Vol.2.Ed. CNRS. Paris France.

R

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., (1999). Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26 (9-10), 1231-1237.

Ricardo Da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S., (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agri. Food Chem*, 39, 549-1552.

S

Sandjo L.P., Kuete V., (2013). Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. *Scientific Researerch*.135-202.

Sarker D.S., Anuszk L., Lutfun N., Yashodharan K., Marcel J., (2001). Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 57, 1273-1276.

Sarker D.S., Savchenko T., Pensri W., Šik V., Laurence N. Dinan L ., (1997). Moschamine, CIS-Moschamine, Moschamindole and Moschamindolol: Four Novel Indole Alkaloids from *Centaurea Moschata*. *Natural Product Letters*, 9, 189-199.

Sarker D.S., Dinan L., Šik V., Underwood E., Peter G.Waterman., (1998). Moschamide: An unusual alkaloid from the seeds of *Centaurea moschata*. *Tetrahedron Letters*, 39, 1421-1424.

Sarni-Manchado P., Cheynier V., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire .Edition ;science et technologie.398.

- Seghiri R., Boumaza O., Mekkiou R., Benayache S., Mosset P., Quintana J., Leon F., Estevez F., Bermejo J., Benayache F., (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*. *Phytochemistry Letters*, 2, 114-118.
- Sharma O.P., Bhat T.K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chem*, 113 (4), 1202-88.
- Shoeb M., Celik S., Jaspars M., Kumarasamy Y., MacManus S.M., Nahar L., Thoo-Lin P.K., Sarker S.D., (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. *Tetrahedron*, 61, 9001-9006.
- Shoeb M., Jaspars M., MacManus S.M., Majinda R.R.T., Sarker S.D., (2004). Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(12), 1201-1204.
- Shoeb M., MacManus S.M., Jaspars M., Nahar L., Kong Thoo-Lin P., Celik S., Sarker S.D., (2007a). Lignans and Flavonoids from the seeds of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn, Ex. Bornm and *Centaurea huber-morathii* Wagenitz. *Polish. J. Chem*, 81, 39-44.
- Shoeb M., MacManus S.M., Jaspars M., Trevidu J., Nahar L., Paul Kong T., (2006). Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*, 62, 11172-11177.
- Shoeb M., MacManus S.M., Kumarasamy Y., Jaspars M., Nahar L., Kong Thoo-Lin P., Nazemiyeh H., Sarker S.D., (2006b). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan from the seeds of *Centaurea Americana*. *Phytochemistry*, 67, 2370-2375.
- Skaltsa H., Lazari D., Garcia B., Pedro J.R., Sokovic M., Constantinidis T., (2000a). Sesquiterpene Lactones from *Centaurea achaia*, a greek endemic species. Antifungal activity. *Z. Naturforsch. C*, 55, 534-539.
- Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M., (2000b). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica* antifungal activity. *Phytochemistry*, 55, 903-908.
- Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Vojtech A., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., and Rene Kizek., (2010). Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*, 15, 8618-8640.

Szydłowska-Czerniak A., Dianoczki C., Recseg K., Karlovits G., Szlyk E., (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76, 899-905.

Y

Vicki A., (2009). Funk, Alfonso Susanna, Tod F. Stuessy, Randall J. Bayer, Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae, Vienne (Autriche), *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*, 965 p.(ISBN 978-3-9501754-3-1, lire en ligne [archive]).

Y

Yesilada E., (2002). Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Sener, B. (Ed.).*biodiversity*. Springer. Boston. MA.

Z

Zater H., Huet J., Fontaine V., Duez P., Benayache F., (2016). Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(6), 554-561.