

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

Université Saad Dahlab de Blida

Faculté des sciences

Département de chimie

F.S.D.....N° D'ordre :



Mémoire présenté par

ZOUAOUI Amina

En vue d'obtenir le diplôme de Master en chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

THEME

Evaluation de l'activité biologique des extraits de deux plantes médicinales de la famille « Gentianaceae »

Soutenu le 27 juin 2016, devant le jury composé de :

M ^r M. El Hattab	Professeur à l'Université de Blida	Président
M ^r R. Zahi	MCB à l'Université de Blida	Membre
M ^{me} O. Touafek	MCB à l'Université de Blida	Promotrice

Promotion 2015-2016

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à : Ma très chère et douce mère
qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage ;*

*À Mon très cher père qui m'adresse au ciel les vœux les plus ardents pour la
conservation de leur santé et de leur vie ;*

*Pour mes chers frères MOHAMED, WASSIM, ANES et mon petit AMINE, à
ma grand-mère (manie MOUINA) qui je souhaite une long vie, à ma chère MERIEM
que je la compte comme ma grande sœur ;*

*Et par la même occasion je rends hommage à ma grand-mère « yama Fatiha »
qui ma soutenue, à mon grand-père et sa femme Fatiha, à mon oncle et son épouse
Samia et bien sur leurs enfants : MOHAMED, CHOROUK et la petite princesse
SOUNDOS, à ma tante et son époux, à leurs enfants KHALED, ZAKI, et les belles
CHAIMA & HADIL, à toutes mes tentes, mes cousines et cousins, à NAZIHA,
ZAHRA et ABOUBAKR et toute ma famille ;*

A mes chers amies SELMA, MADJEDA, FATIHA, KARIMA et OMAR ;

*A mes collègues et spécialement tout les étudiants du master II chimie des substances
naturelles, je n'oublierai jamais les moments quand a passé ensemble ;*

*À toute personnes que j'ai connus et j'ai aimé et ceux qui m'ont aidé par le moindre
effort.*

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant pour m'avoir donnée la force et la patience tout le long de mes études.

Ma haute gratitude, mon profonds respects et mes sincères remerciements et reconnaissances à notre promotrice Madame TOUAFEK Ouassila, Maitre de Conférences à l'université de Blida, qui ma guidée avec grande patience tout au long de l'élaboration de ce travail, je la remercie pour la qualité du sujet qu'elle a su ma prodiguer et pour la lecture et l'analyse attentive de mon mémoire. Je la remercie aussi pour ses qualités humaines qu'elle trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Mr M. EL HATTAB, Professeur à l'université de Blida, pour son aide, ses conseils et ses encouragements, ainsi que pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance

J'adresse mes sincères remerciements à Mr R. Zahi, Maitre de Conférences à l'université de Blida, qui m'a fait l'honneur de juger ce modeste travail.

Notre gratitude va à titre particulier à tous nos enseignants qui ont donné le meilleur d'eux-mêmes durant le cycle de notre formation de ce master. Qu'ils en soient chaleureusement remerciés en amont et en aval pour leur généreux don de savoir sans lequel le privilège de savoir-faire serait pour nous inaccessible.

Je remercie sincèrement Monsieur D. TEFFAHI, biologiste au laboratoire d'hygiène de wilaya de BLIDA, M^{me} F. BENAYACHE microbiologiste à l'entreprise Saidal, M^{elle} S. Hamiche et tout les membres du laboratoire de chimie des substances naturelles, pour leur aide considérable, afin de réalisé ce travail.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude chimique et biologique des extraits bruts de *Centaurium erythrae* et *Blackstonia perfolita* deux plantes appartenant à la même famille *Gentianaceae* récoltées à Bouaarfa dans la région de Blida. Les extraits hydrométhanoliques, éthanoliques et chloroformiques des deux plantes ont été obtenue par extraction à froid et les extraits méthanoliques et acétoniques ont été obtenu par extraction à chaud avec de bon rendements.

Le screening phytochimique a montré la présence de nombreuses familles de substances chimiques : flavonoides, stérols, terpènes, triterpènes et phénols.

Le dosage des polyphénols a été effectué pour mesuré la teneur en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques et éthanolique des deux plantes étudiées.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage de radical libre DPPH des extraits hydrométhanoliques, méthanoliques et acétoniques des espèces étudiées a montré que ces extraits possèdent un pouvoir antioxydant.

L'activité antimicrobienne des extraits éthanolique, chlorofomique et acétonique des deux plantes étudiées par la méthode de l'antibiogramme (diffusion sur disque) a été détermine en utilisant un panel de microorganismes comprenant 11 bactéries, deux levures et une moisissure.

Mots clés : *Centaurium erythrae*, *Blackstonia perfolita*, screening phytochimique, dosage des polyphénols, activité antimicrobienne, activité antioxydant.

Abstract

This work focuses on the chemical and biological study of crude extracts of *Centaurium erythrae* and *Blackstonia perfolita*, two plants belonging to the same family “*Gentianaceae*” cultivated in Bouaarfa region of Blida. The hydrométhanolic, ethanolic and chloroformic extracts, of two plants were obtained by cold extraction, Methanolic and acetic extracts are obtained by hot extraction with good yields.

The phytochemical screening showed the presence of many chemical families: flavonoids, sterols, terpenes, triterpenes and phenols.

The dosage of polyphenols is carried out to measure the total of polyphenols content in méthaniques and ethanol extracts of both plants studied.

The study of antioxidant activity using the DPPH• method of hydrométhanolic, methanolic and acetic extracts of species studied showed that these extracts have a good antioxidant activity.

The antimicrobial activity of ethanolic, chloroformic and acetic extracts of two plants studied by the method of susceptibility testing (disk diffusion) was determined using a micro panel comprising 11 bacteria's, two yeasts and molds.

Keywords: *Centaurium erythrae*, *Blackstonia perfolita*, phytochemical screening, dosing polyphenols, antimicrobial activity, antioxidant activity.

ملخص

يرتكز هذا العمل اساسا على الدراسة الكيميائية والبيولوجية لمستخلصات نبتة "*Centaurium erythrae*" و نبتة "*Blackstonia perfolita*" اللتان تنتميان لنفس العائلة "*Gentianaceae*".

تم الحصول على المستخلصات محل الدراسة بطريقتين: طريقة الاستخراج البارد طريقة الاستخراج الساخن مع عوائد جيدة.

أظهر الفحص الفيتو كيميائي النباتي وجود العديد من الأسر الكيميائية: الفلافونويد، السترول، التربين، التريتربينات والفينولات.

لقد تم تقدير متعدد الفينول لقياس محتوى متعدد الفينول الكلي في المستخلص الميثانولي و الاثنانولي للنبتين المدروستين. أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة عن طريق DPPH للمستخلص الهيدروميثانولي، الاثنانولي و الاسيتوني للنبتين المدروستين، نشاطا فعالا مضادا للأكسدة.

بالنسبة للنشاط المضادة للفطريات و الجراثيم فقد بينت ان المستخلص الاثنانولي، الكلوروفورمي و الاسيتوني للنبتين المدروستين، بطريقة antibiogramme (النشر على القرص) فقد تم تحديدها باستعمال 11 بكتيريا، خميرتين و فطر.

الكلمات المفتاحية: *Blackstonia perfolita*, *Centaurium erythrae*, الفحص الفيتو كيميائي النباتي، تقدير متعدد الفينول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضادة للفطريات و الجراثيم.

Liste des abréviations

Abs :	Absorbance
AcOEt :	acétate d'éthyle
ATCC :	American Type Culture Collection
ARP :	Puissance Anti-Radicalaire(ou puissance antioxydante)
Bp :	<i>Blackstonia perfolita</i>
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CE₅₀ :	Concentration Efficace
Ce :	<i>Centaurium erythrae</i>
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
CHCl₃ :	Chloroforme
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
Cycl :	Cyclohexane
DMSO :	Dimethylsulfoxyd
DPPH :	2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle
EAG :	Equivalent en acide gallique
EtOH :	Ethanol
Hex :	Héxane
HCl :	Acide Chlorhydrique
MeOH :	Méthanol
mg :	Milligramme
MH :	Muller Hinton
NH₄OH :	Hydroxyde d'ammonium
R² :	Coefficient de corrélation
Rf :	Rapport Frontal
Sb :	Sabouraud
UV :	Ultra-Violet
µg :	Microgramme

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les propriétés pharmacologiques de quelques espèces de la famille <i>Gentianaceae</i>	3
Tableau 2 :	Distribution des méthylxanthones dans <i>Centaurium erythraea</i>	11
Tableau 3 :	Distribution des secoiridoïdes dans <i>Centaurium erythraea</i>	12
Tableau 4 :	Métabolites secondaires isolés de <i>B. perfoliata</i>	16
Tableau 5 :	Aspect et couleur de différents extraits obtenus par Macération.....	19
Tableau 6 :	Masses et rendements de différents extraits obtenus par Macération.....	20
Tableau 7 :	Aspect, couleur de différents extraits obtenu par extraction par Soxhlet.	21
Tableau 8 :	Masses et rendements de différents extraits obtenus par Soxhlet	21
Tableau 9 :	Résultats du test phytochimique pour les terpènes et les triterpènes.....	23
Tableau 10 :	Résultats du test phytochimique pour les stérols et les stéroïdes.....	23
Tableau 11 :	Résultats du test phytochimique pour les phénols.....	24
Tableau 12 :	Résultats du test phytochimique pour les tanins.....	25
Tableau 13 :	Résultats du test phytochimique pour les flavonoïdes.....	26
Tableau 14 :	Résultats du test phytochimique pour les coumarines.....	27
Tableau 15 :	Résultats du test phytochimique pour les saponosides.....	27
Tableau 16 :	Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de <i>B.Perfoliata</i>	30
Tableau 17 :	Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de <i>C.Erythraea</i>	31
Tableau 18 :	Les résultats de la chromatographie sur couche mince des composés phénoliques établis par Markham.....	32
Tableau 19 :	Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	34
Tableau 20 :	Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanolique et éthanolique des deux plantes étudiées.....	35
Tableau 21 :	Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Centaurium erythraea</i>	39
Tableau 22 :	Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Blackstonia perfolita</i>	40
Tableau 23 :	Valeurs CE ₅₀ et ARP des extraits de <i>Centaurium erythraea</i>	41
Tableau 24 :	Valeurs CE ₅₀ et ARP des extraits de <i>Blackstonia perfolita</i>	42
Tableau 25 :	Valeurs CE ₅₀ des extraits hydrométhanolique de <i>B. perfolita</i> et <i>C. erythraea</i>	43
Tableau 26 :	Valeurs CE ₅₀ des extraits méthanoliques de <i>B. perfolita</i> et <i>C. erythraea</i> ..	44
Tableau 27 :	Valeurs CE ₅₀ des extraits acétonique de <i>B. perfolita</i> et <i>C. erythraea</i>	45
Tableau 28 :	Pouvoir antibactérien en fonction du diamètre de la zone d'inhibition....	48
Tableau 29 :	Microorganisme utilisées dans le présent travail.....	49
Tableau 30 :	Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aux différentes	

	souches bactériennes	51
Tableau 31 :	Les CMI (mg/ml) des extraits aux différentes souches microbiennes.....	53
Tableau 32 :	Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aux différentes souches fongiques.....	53

Liste des figures

Figure 1 :	Distribution des <i>Gentianaceae</i>	2
Figure 2 :	Principales xanthones isolées de la famille <i>Gentianaceae</i>	5
Figure 3 :	Principales Secoiridoids appartient à la famille <i>Gentianaceae</i>	7
Figure 4 :	Structure des Flavane et Flavone.....	7
Figure 5 :	Principales Flavonoids appartient de la famille <i>Gentianaceae</i>	8
Figure 6 :	<i>Centaurium erythraea</i>	10
Figure 7 :	Principales méthylxanthones isolées de l'espèce <i>Centaurium erythraea</i>	12
Figure 8 :	Structure des secoiridoides isolés de l'espèce <i>Centaurium erythraea</i>	13
Figure 9 :	Structure de quelques acides phénoliques isolés de l'espèce <i>Centaurium erythraea</i>	13
Figure 10 :	Structure de quelques phytostérols isolés de l'espèce <i>Centaurium erythraea</i>	14
Figure 11 :	Structure des alcaloïdes isolés de l'espèce <i>Centaurium erythraea</i>	14
Figure 12 :	<i>Blackstoia Perfoliata</i>	16
Figure 13 :	Structure des métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>Blackstoia Perfoliata</i>	17
Figure 14 :	Protocole de préparation des extraits par Macération	18
Figure 15 :	Protocole de préparation des extraits par Soxhlet.....	20
Figure 16 :	Structure des flavonoides.....	25
Figure 17 :	Structure de base des coumarines	26
Figure 18 :	Profile de la CCM des extraits de <i>B.Perfoliata</i> sous UV	28
Figure 19 :	Profile de la CCM des extraits de <i>C.Erythraea</i> sous UV	28
Figure 20 :	Profile de la CCM des extraits de <i>B.Perfoliata</i> après pulvérisation	29
Figure 21 :	Profile de la CCM des extraits de <i>C.Erythraea</i> après pulvérisation	29
Figure 22 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	34
Figure 23 :	Réaction d'un antioxydant donneur d'hydrogène avec le radical DPPH●.....	36
Figure 24 :	Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits de <i>Centaurium erythraea</i>	39
Figure 25 :	Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits de <i>Blackstonia perfolita</i>	41
Figure 26 :	Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_{HM} et Bp_{HM}	43
Figure 27 :	Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_M et Bp_M	44
Figure 28 :	Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_A et Bp_A	44
Figure 29 :	Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion à partir d'un disque imprégné d'extrait	48
Figure 30 :	Les diamètres des zones d'inhibition des extraits relatives aux différentes souches bactériennes.....	52
Figure 31 :	Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et de l'antibiotique (Cp) relatives aux différentes souches bactériennes.....	52
Figure 32 :	Les diamètres des zones d'inhibition des extraits relatives aux différentes souches fongiques.....	54

Figure 33 : Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et des antifongiques (Mr et ApB) relatives aux différentes souches fongique..... **55**

SOMMAIRE

Dédicaces	I
Remerciements.....	II
Résumé.....	II
Liste des abréviations.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VII
Introduction générale.....	1

Partie théorique : Recherche bibliographique

I. Aperçu bibliographique sur la famille <i>Gentianaceae</i>	2
I-1 Présentation botanique.....	2
I-2 Propriétés pharmacologiques.....	3
I-3 Composition chimique.....	3
I-3.1 Les Xanthones.....	4
I-3.2 Les Iridoïdes.....	6
I-3.3 Les Flavonoïdes.....	7
II. Aperçu bibliographique sur l'espèce « <i>Centaurium erythraea</i> »	9
II-1 Présentation botanique.....	9
II-2 Classification dans la systématique botanique.....	9
II-3 Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	10
II-4 Aspects pharmacologiques et thérapeutiques.....	10
II-5 Composition chimique.....	11
III. Aperçu bibliographique sur l'espèce « <i>Blackstonia perfoliata</i> ».....	15
III-1 Présentation de l'espèce.....	15
III-2 Classification dans la systématique botanique.....	15
III-3 Aspects pharmacologiques et thérapeutiques.....	16
III-4 Composition chimique.....	16

Partie expérimentale : Travaux personnel

Chapitre I : Description des travaux

I. Extraction des métabolites secondaires des espèces « <i>Centaurium erythraea</i> » et « <i>Blackstonia perfolita</i> ».....	18
I-1 Matériel végétal.....	18
I-2 Préparation des extraits.....	18
I-2-1 Extraction à froid.....	18

I-2-2	Extraction à chaude	20
II.	Screening phytochimique.....	22
III.	Chromatographie sur couche mince CCM.....	28
IV.	Dosage des polyphénols.....	33
	IV-1 Principe.....	33
	IV-2 Protocole.....	33
	IV-3 Détermination du taux des polyphéols.....	34

Chapitre II : Etude de l'activité biologique

I.	Etude de l'activité antioxydant de « <i>Centaurium erythrae</i> » et « <i>Blackstonia perfolita</i> ».....	36
	I-1 Définition.....	36
	I-2 Principe du test au DPPH.....	36
	I-3 Protocole expérimental.....	37
	I-3-1 Préparation des échantillons.....	37
	I-3-2 Préparation de la solution DPPH.....	37
	I-3-3 Préparation de la solution d'acide ascorbique.....	38
	I-3-4 Protocole réalisé.....	38
	I-4 Résultats de l'activité anti-oxydante testée par la méthode du DPPH.....	38
	I-5 Discussion des résultats.....	42
II.	Etude de l'activité antimicrobienne des espèces « <i>Centaurium erythrae</i> » et « <i>Blackstonia perfolita</i> ».....	47
	II-1 Introduction.....	47
	II-2 Protocole expérimental.....	47
	II-3 Détermination des CMI.....	50
	II-4 Résultats et discussion.....	51
	Conclusion générale.....	56
	Références bibliographiques.....	58

Introduction générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir de ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux.

Au cours du temps, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicament. Ainsi, jusqu'au début du XXème siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétales.

De nos jours, malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs population, notamment celle des pays en voie de développement, ont recours aux plantes pour se soigner.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ... etc. [1]

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique et l'activité biologique de deux plantes médicinales appartenant à la même famille botanique « *Gentianaceae* »: « *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfoliata* », il est subdivisé en deux parties :

- La première partie rassemble des recherches bibliographiques sur la famille de *Gentianaceae* notamment les espèces *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfoliata*.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude chimique et la détermination de l'activité antioxydante et antimicrobienne des deux plantes *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfolita*. Elle est scindée deux chapitre, le premier renferme la préparation des extraits bruts de *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfolita*, le screening phytochimique et la détermination de la composition chimique par CCM. Le deuxième compte le dosage des polyphénols et l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne (antibactérienne et antifongique).

En fin, ce travail est achevé par une conclusion générale.

synthèse bibliographique

I. Aperçu bibliographique sur la famille *Gentianaceae*

I.1. Présentation botanique

Les *Gentianaceae* sont une vaste famille de dicotylédones comprenant environ 1736 espèces réparties dans 99 genres cosmopolites.

Les *Gentianaceae* sont le plus souvent des plantes herbacées annuelles ou pérennes, plus rarement des arbustes (*Macropaea* spp). Il existe quelques rares plantes saprophytiques dépourvues de chlorophylle (*Voyria*, *Voyrella*). La plupart sont rhizomateuses. Les feuilles sont habituellement opposées-décussées, rarement alternes (*Swertia*) ou verticillées, pétiolées ou sessiles, parfois connues, sans stipule, simples à marges généralement entières, parfois disposées en rosettes. L'inflorescence est sous forme de cymes terminales ou axillaires, ou de fleurs solitaires. Les fleurs sont régulières, actinomorphes, rarement zygomorphes, hermaphrodites ou unisexuées. Le calice est formé de 4 à 5 sépales soudés entre eux, plus rarement libres. Les pétales, au nombre de 4 ou 5, sont également soudés, et forment une corolle en forme de cloche ou de plateau plus ou moins profondément fendue. Les étamines sont insérées à la base du tube de la corolle. Les ovules sont généralement anatropes, parfois orthotropes, et nombreux. Le style est simple, le stigmate simple ou bilobé. Le fruit est généralement une capsule déhiscente, rarement une baie, avec de petites graines albuminées [2].

La classification phylogénétique rattache les *Gentianaceae* à la sous-classe des Asteridae et distingue 6 tribus : les *Chironieae*, les *Exaceae*, les *Helieae*, les *Potalieae*, les *Saccifolieae* et les *Gentianeae*.

La distribution de la famille de *Gentianaceae* dans le monde [3] est représentée dans la figure ci-dessous :

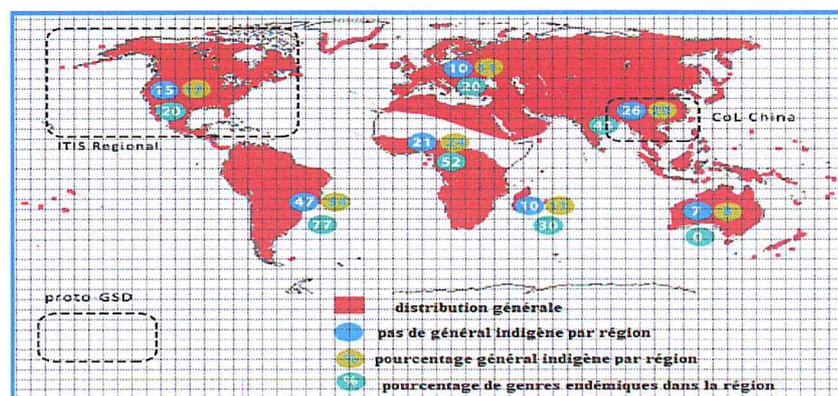


Figure 1. Distribution des *Gentianaceae*

I.2. Propriétés pharmacologiques

L'étymologie du nom *Gentiana* viendrait du roi d'Illyrie, Gentius (2^{ème} siècle avant J.C), qui aurait découvert les propriétés fébrifuges des gentianes [4]. Les racines sont toujours utilisées à cet effet dans certaines régions montagnardes, sans qu'aucun effet antipyrétique n'ait été cependant clairement mis en évidence.

Les propriétés pharmacologiques de quelques espèces de la famille *Gentianaceae* sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 1. Les propriétés pharmacologiques de quelques espèces de la famille *Gentianaceae*

Espèces	Propriétés pharmacologiques	Référence
<i>Anthocleista djalonensis</i> <i>Anthocleista vogelii</i>	Diabète, Hypertension, Antidiurétique (traitement de constipation), Fertilité, Fièvre de paludisme, Typhoïde, douleur d'estomac.	[5], [6]
<i>Gentianella campestris</i> <i>Gentianella amarella</i>	Anticancéreux, Anti malarique, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires.	[7]
<i>Gentiana lutea</i>	Action positive sur le système nerveux central, apéritifs et liqueurs.	[8]
<i>Centaurium erythraea</i>	Diabète, stimuler les sécrétions du foie et de l'estomac (digestions difficiles, dyspepsie, insuffisance hépatique).	[9]
<i>Centaurium muehlenbergii</i>	Activité antimicrobienne, anti tumeur, effet protecteur gastrique, hépatique, sédatif.	[10]

I.3. Composition chimique

La famille *Gentianaceae* est caractérisée par la présence d'un groupe de pigments polyphénoliques rares jaunes (xanthones) dans la plupart de ses membres [11]. Les espèces de cette famille ont été également connus depuis longtemps pour leur amertume prononcée. Ce caractère amer est dû aux glycosides mono-terpéniques (de sécoïridoïdes) présents dans la plupart des espèces. Les xanthones, les sécoïridoïdes et les C-

glucoflavones, ainsi que des flavonoïdes C-glycosylés [1], sont les principaux métabolites secondaires du genre [11].

I.3.1. Les Xanthonnes

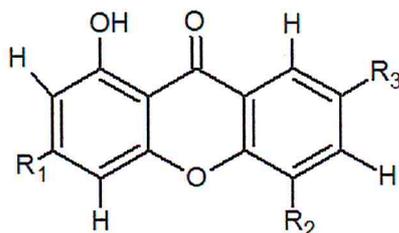
Les xanthonnes sont des pigments jaunes dont la distribution est relativement limitée. Elles ont été identifiées dans une vingtaine de familles de plantes supérieures, ainsi que dans des fougères [12, 13], essentiellement dans les *Clusiaceae* (ex *Guttiferae*) et les *Gentianaceae* [14,15]. Quelques xanthonnes ont également été isolées à partir de champignons [16, 17] et de lichens [18-21].

Les xanthonnes sont des composés hétérocycliques caractérisés par un noyau dibenzopyrone dont la biosynthèse diffère selon les organismes. Chez les végétaux supérieurs, les xanthonnes résultent de la condensation du 3-hydroxybenzoyl-CoA issu de la voie de l'acide shikimique avec 3 molécules de malonyl-CoA, précurseur de la voie acétate-malonate [22, 23]. Cette biosynthèse conduit à deux schémas de substitution de base, selon que l'hydroxyle sur le cycle issu du shikimate est en position ortho ou para au moment du couplage oxydatif : on obtient alors des xanthonnes tri-substituées en 1, 3,5 et 1, 3,7.

Les xanthonnes possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques et biologiques. La plupart sont des antioxydantes et anti-inflammatoires [24, 25]; ces propriétés sont particulièrement intéressantes dans la prévention de certaines maladies, notamment celle d'Alzheimer, ou encore dans le cadre des maladies cardiovasculaires. Elles sont également hépatoprotectrices [26], cytotoxiques et antitumorales [27] ou encore hypoglycémiques [28]. Les xanthonnes possèdent également des propriétés antifongiques et antimicrobiennes [39, 30].

En 1977, la littérature compte 93 Xanthonnes obtenus à partir de 7 genres (43 espèces) appartiennent à la famille *Gentianaceae*.

Exemples de quelques xanthonnes isolés de la famille *Gentianaceae* sont représentés dans la figure ci-dessous :



(1) ($R_1=OH$; $R_2=OH$; $R_3=H$) 1,3,5-trihydroxyxanthone

isolé de l'espèce *Centaurium erythraea*

(2) ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=OH$) 1,3,7-trihydroxyxanthone « Gentisein »

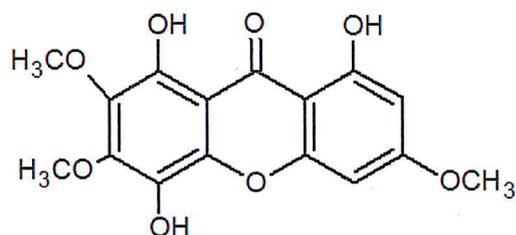
isolé de l'espèce *Frasera albicaulis*

(3) ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=OCH_3$) 1,3-dihydroxy-7-méthoxyxanthone « Gentisin »

isolé de l'espèce *Gentiana asclepiadea*

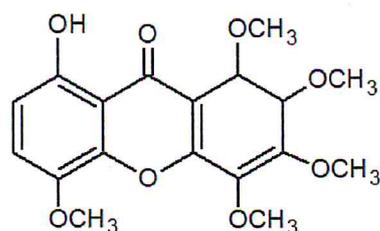
(4) ($R_1=OCH_3$; $R_2=H$; $R_3=OH$) 1,7-dihydroxy-3-méthoxyxanthone « Isogentisin »

isolé de l'espèce *Gentiana lutea*



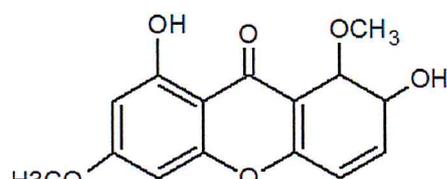
(5) 1,5,8-trihydroxy-,3,6,7-triméthoxyxanthone

isolé de l'espèce *Centaurium erythraea*



(6) 1-hydroxy-4,5,6,7,8-pentaméthoxyxanthone « Eustamine »

isolé de l'espèce *Centaurium erythraea*



(7) 1,7-dihydroxy-3,8-diméthoxyxanthone

« Genticanlein »

Figure 2 : Principales xanthes isolées de la famille Gentianaceae

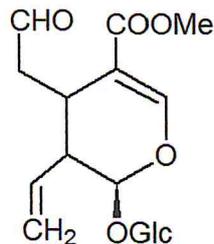
I.3.2. Les Iridoïdes

Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyranique appelé iridane, très répandus chez les *Gentianaceae*.

Les iridoïdes rencontrés dans les gentianes sont principalement des sécoiridoïdes glycosylés, issus de la rupture de la liaison 7,8 du noyau cyclopentanique [31]. Les iridoïdes sont responsables de l'amertume des gentianes : en activant les récepteurs gustatifs correspondants, ils favorisent les sécrétions salivaires et gastriques, et stimulent ainsi l'appétit. De plus, ils facilitent la digestion grâce à leur activité cholagogue.

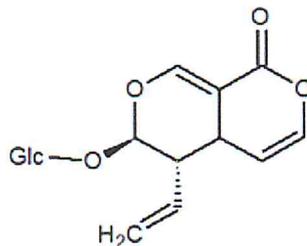
Les iridoïdes possèdent de nombreuses autres activités pharmacologiques : ils sont hépato- et cardio-protecteurs, antispasmodiques, anti-inflammatoires, antiviraux et antitumoraux [32]. Le gentiopicroside (8), le swéroside (9) et la swertiamarine (10) isolés de *Gentiana lutea* présentent des effets cytoprotecteurs, ainsi qu'une action positive sur le système nerveux central [33, 34], bien que certaines études indiquent le contraire [35].

Par ailleurs, le gentiopicroside protégerait des hépatites en inhibant la production de TNF (Tumor Necrosis Factor) [36]. Le swéroside et la swertiamarine présentent quant à eux une activité antibactérienne marquée [37].



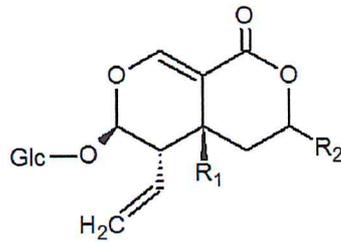
(8) « Secologanin »

isolé de l'espèce *Anthocleista vogelii*



(9) « Gentiopicroside »

isolé de l'espèce *Gentiana affinis*



(10) ($R_1=H, R_2=H$) « Swéroside »

isolé de l'espèce *Centaurium chilense*

(11) ($R_1=OH, R_2=H$) « Swertiamarine »

isolé de l'espèce *Coutoubea spicata*

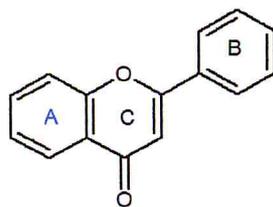
(12) ($R_1=H, R_2=OCH_3$) « Vogelioside »

isolé de l'espèce *Curtia tenuifolia*

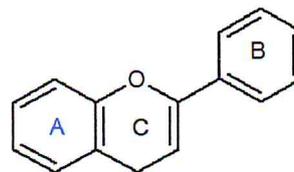
Figure 3: Principales Secoiridoids appartient à la famille Gentianaceae

I.3.3. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau Flavone (13) ou 2-Phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau Flavone est lui même un dérivé du noyau Flavane (14) de base [38].



(13) noyau Flavone



(14) noyau Flavane

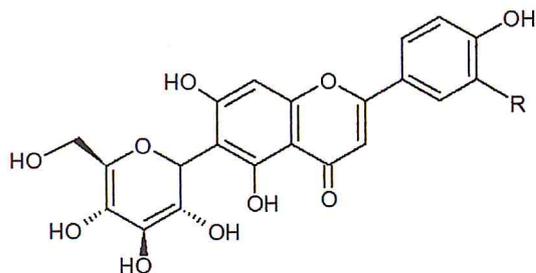
Figure 4: Structure des Flavane et Flavone

Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné, cycle C [6].

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (jaune et blanc).

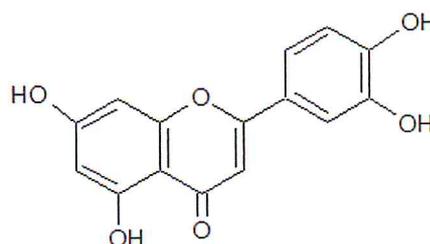
Bien qu'il existe des flavonoïdes O-glycosylés chez les *Gentianaceae*, ceux rencontrés sont souvent des C-glycoflavones, tels que l'isoorientine (15), l'isovitexine (16), le luteolin

(17) et leurs dérivés [39, 40]. Des fractions enrichies en isoorientine et isovitexine ont montré des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, et antinociceptives [41-43]. Des propriétés sédatives [44] ainsi qu'hypoglycémiantes ont également été [45]. Ces flavonoïdes C-glucosylés ont été détectés dans près de 80 espèces réparties dans 9 genres, notamment *Gentiana*, *Gentianella* et *Swertia* [46].



(15) (R=OH) Isoorientine

(16) (R=H) Isovitexine



(17) Luteolin

Figure 5 : Principales Flavonoïdes appartient de la famille Gentianaceae

II. Aperçu bibliographique sur l'espèce « *Centaurium erythraea* »

II.1. Présentation botanique

Le nom de *Centaurium*, qui rappelle la légende d'après laquelle le centaure Chiron fut guéri d'une blessure au pied par l'emploi de cette plante, est fort ancien et elle était déjà utilisée par divers auteurs comme Fuchs, Dodoens, de Tournefort et d'autres. Actuellement elle est utilisée dans la pharmacopée de 23 différents pays.

Dans la médecine populaire, plusieurs plantes parmi lesquelles se trouve la petite centaurée sont préconisées pour le traitement du diabète de type 2 chez l'homme.

La petite centaurée est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle qui pousse en Europe, en Afrique du Nord, dans l'Ouest de l'Asie et acclimatée en Amérique du Nord. La tige dressée de 30 cm de hauteur, grêle et quadrangulaire porte à la base des feuilles obovales en rosette et les feuilles du haut opposées, sessiles et oblongues. Ramifiée au sommet, elle montre des cimes corymbiformes de fleurs de type 5, à corolle rose vif. Le fruit est une capsule allongée bivalve avec de nombreuses graines [47, 48].

II.2. Classification dans la systématique botanique

Règne :	<i>Plantae</i> ;
Embranchement :	<i>Spermatophytae (Phanérogames)</i> ;
Sous embranchement :	<i>Angiospermes</i> ;
Classe :	<i>Magnoliopsida (Dicotylédone)</i> ;
Ordre :	<i>Gentianales</i> ;
Famille :	<i>Gentianaceae</i> ;
Genre :	<i>Centaurium</i> ;
Espèce :	<i>Erythraea</i> ;
Noms vernaculaires :	Algérien: Mraret lahnache, Quanttarium Français : Petite centaurée.
Synonyme :	Herbe à la fièvre, herbe amère ;

Floraison: de juin à septembre [48].

Parties utilisées: Sommités fleuries.



Figure 6 : *Centaurium erythraea*

II.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle

Pour les herboristes allemandes, la petite centaurée était recommandée pour traiter la mélancolie et comme calmant nerveux. Aujourd'hui, c'est un ingrédient dans le médicament de la goutte « Portland Powder ». En Europe, elle est traditionnellement utilisée pour faciliter la prise de poids et dans les troubles dyspeptiques. En Egypte, la plante est utilisée pour traiter l'hypertension et les calculs rénaux. En Algérie, elle est utilisée comme fébrifuge, tonique, cholérétique, stimulant de l'appétit, stomachique et stimulant du pancréas dans certains cas de diabète [49].

II.4. Aspects pharmacologiques et thérapeutiques

La petite centaurée est l'une des plus utiles plantes amères. Son intérêt réside donc dans ses principes amers qui permettent de stimuler les sécrétions du foie et de l'estomac et purifier le sang et d'exciter les terminaisons nerveuses des papilles gustatives de la langue. On l'utilisera donc pour des problèmes d'estomac, digestions difficiles, dyspepsie, insuffisance hépatique.

Elle est antipyrétique, anti-inflammatoire [50], et antibactérienne [51], antioxydante [52], diurétique [53], hépatoprotectrice, insecticide [54]. Comme beaucoup de toniques amers, elle est antipyrétique. Son pouvoir fébrifuge est presque égal à celui du quinquina, ce qui l'a fait utiliser contre le paludisme et les autres états fébriles. Cette action est due en partie aux acides phénoliques.

La petite centaurée est utilisée dans certains cas de diabète comme stimulant du pancréas [9, 55], partant du principe que la petite centaurée est utilisée comme remède contre le

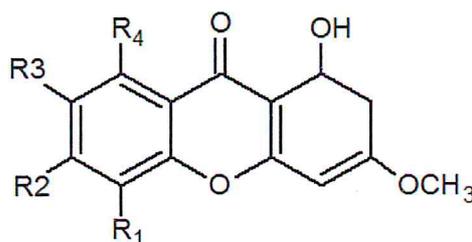
diabète en Algérie. Et elle est utilisée pour traiter certaines plaies et dermites. En lotion, compresses pour les ulcères de jambes, plaies atones, chute des cheveux.

II.5. Composition chimique

L'espèce *Centaurium erythraea* présente une source riche de xanthones, de glycosides secoiridoïdes (GS) et d'acides phénoliques et leurs dérivés. En plus des 3 xanthones, 1,3,5 trihydroxyxanthone (1), 1,3,7 trihydroxyxanthone (2) et 1,5,8-trihydroxy-3,6,7-triméthoxyxanthone (5), 8 méthylxanthones ont été isolé de cette espèce [51], qui sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Distribution des méthylxanthones dans *Centaurium erythraea* [56].

Composé	Composé
1,6-dihydroxy- 3,5-diméthoxyxanthone (18)	1-hydroxy-3,5,6,7-tétraméthoxyxanthone (ou 8-déméthyl-eusomin) (23)
3-hydroxy-1,5,6-triméthoxyxanthone (19)	1-hydroxy-3,5,6,7,8-pentaméthoxyxanthone (ou eustomine)(6)
1,3,5-trihydroxy-2-méthoxyxanthone (20)	
1-hydroxy-3,5,6-triméthoxyxanthone (21)	
1,8-dihydroxy-3,5,6,7-tétraméthoxyxanthone (22)	1-hydroxy-3,7,8-triméthoxyxanthone (24)



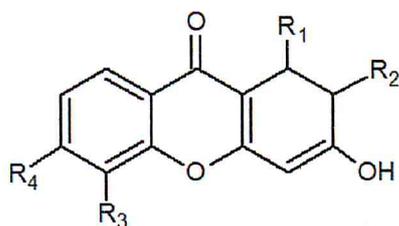
(18) ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{H}$) 1,6-dihydroxy- 3,5-diméthoxyxanthone

(21) ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$) 1-hydroxy-3,5,6-triméthoxyxanthone

(22) ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OH}$) 1,8-dihydroxy-3,5,6,7-tétraméthoxyxanthone

(23) ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{H}$) 1-hydroxy-3,5,6,7-tétraméthoxyxanthone
(ou 8-déméthyl-eusomin)

(24) ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OCH}_3$) 1-hydroxy-3,7,8-triméthoxyxanthone



(19) ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OCH}_3$) 3-hydroxy-1,5,6-triméthoxyxanthone

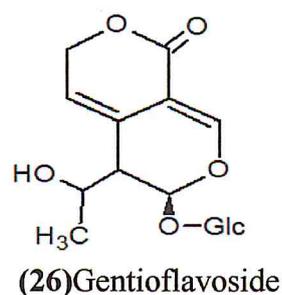
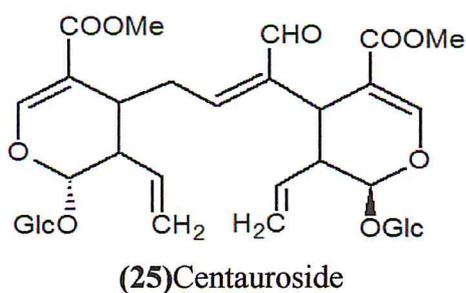
(20) ($R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$) 1,3,5-trihydroxy-2- méthoxyxanthone

Figure 7 : Principales méthylxanthones isolées de l'espèce *Centaurium erythraea*

Cette espèce renferme également des hétérosides secoiridoidiques très amers en faible quantité : le gentiopicoside [57], le swéroside, la swertiamarine [58], le gentioflavoside [59], la centapicrine et la déacétylcentapicrine [60].

Tableau 3: Distrubution des secoiridoids dans *Centaurium erythraea*

Composé et N° de structure	Référence	Composé et N° de structure	Référence
Secologanin (8)	[61]	Gentioflavoside (26)	[59]
Gentiopicoside(Gentiopicrin)(9)	[57]	Centapicrine(27)	[60]
Sweroside (10)	[58]	Deacetylcentapicrin (28)	[60]
Swertiamarin (11)	[58]	Dihydrocornine (29)	[63]
Centauroside (25)	[62]	Loganic acide (30)	[61]



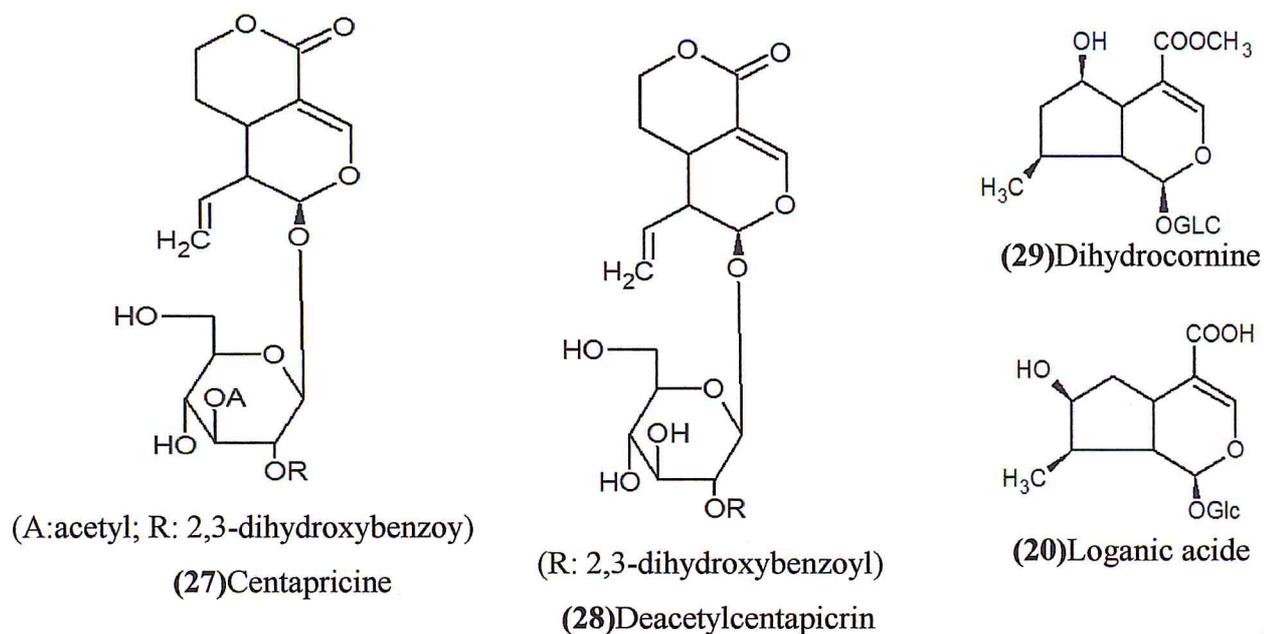


Figure 8 : Structure des secoiridoïdes isolés de l'espèce *Centaurium erythraea*

Des acides phénoliques tels que l'acide sinapique **(31)**, l'acide férulique **(32)**, l'acide para-coumarique **(33)** et l'acide vanillique **(34)** [64], ont été également présent dans cette espèce.

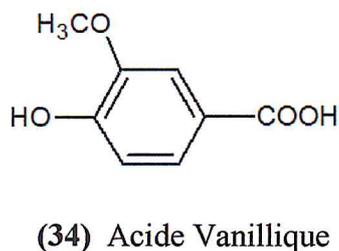
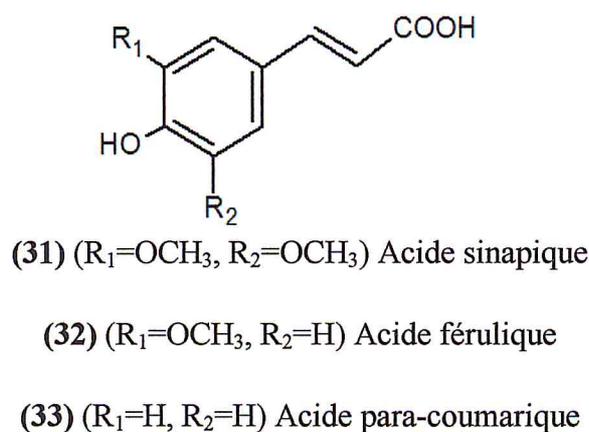


Figure 9: Structure de quelques acides phénoliques isolés de l'espèce *Centaurium erythraea*

Cette espèce contient aussi des phytostérols tels que β -sitistérol (35), Stigmastérol (36), Campestérol (37) [64].

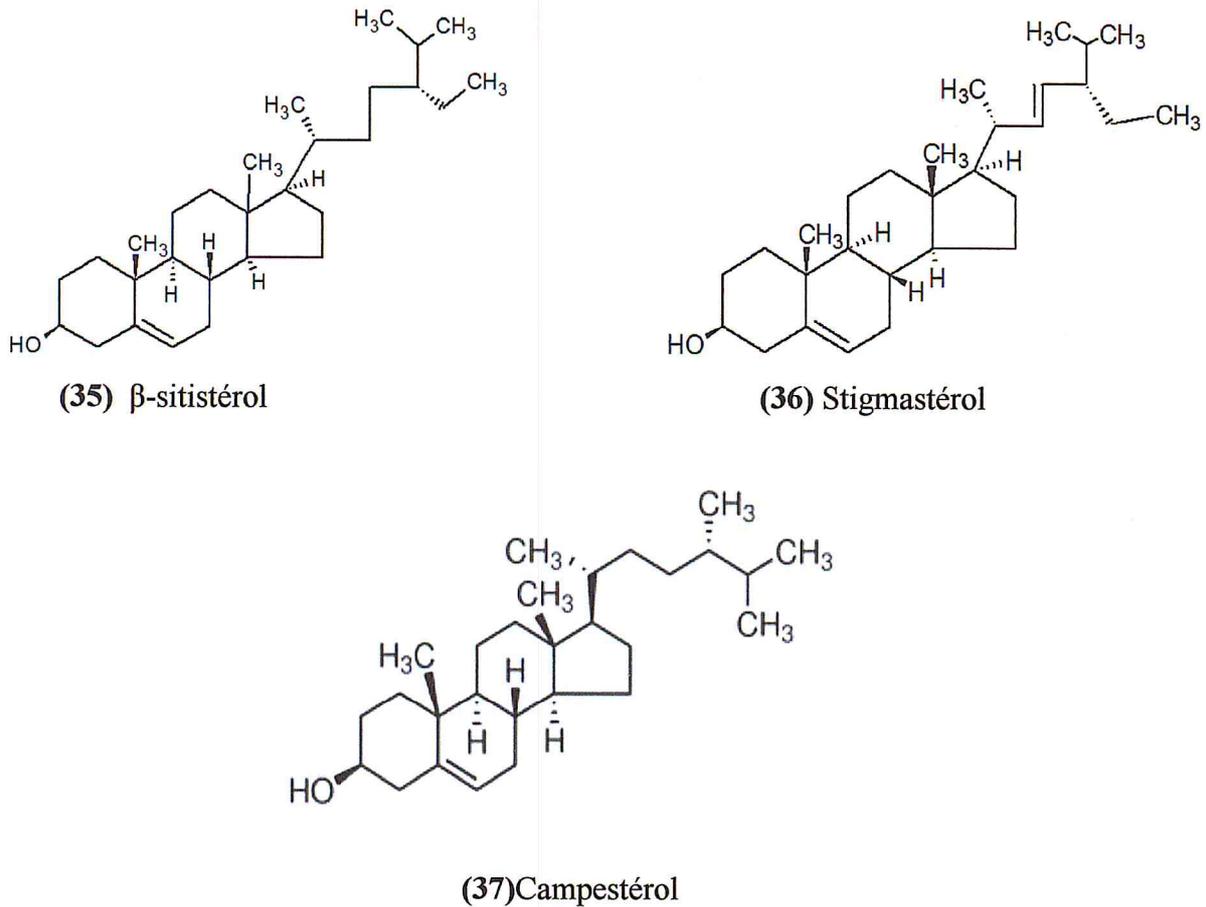


Figure 10: Structure de quelques phytostérols isolés de l'espèce *Centaurium erythraea*

Trois alcaloïdes, Gentianine (38), Gentianidine(39), Gentioflavine(40), ont été isolés de cette espèce par Kaldas .M [65].

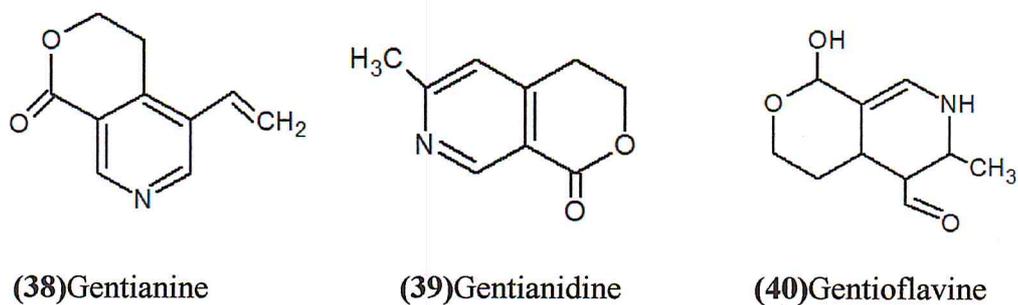


Figure 11: Structure des alcaloïdes isolés de l'espèce *Centaurium erythraea*

III. Aperçu bibliographique sur l'espèce « *Blackstonia perfoliata* »

III.1 Présentation de l'espèce

Blackstonie Perfoliée (*Chlora perfoliata* L., *Gentiana perfoliata* L., *Sequeira perfoliata*) appelé aussi moût jaune ou, centaurée jaune de la couleur de ses fleurs, appartient à la famille *Gentianaceae* de genre *Blackstonia* qui est associé au nom de l'auteur (J. Blackstone 1737). Dans la Flora Européen Tutin [66] mentionné une seule espèce avec quatre sous-espèces : *Perfoliata*, *Serotina*, *Volemann*, *Imperfoliata*, tandis que Zeltner [67] distingue quatre espèces du genre *Blackstonia*.

Blackstonia Perfoliata est une plante annuelle, 10-60cm de hauteur, et des feuilles triangulaires, réduisant parfois vers la base [68]. La corolle jaune des fleurs et des linéaires ou lancéolées calices sont divisés en 6-12 lobes. La taille et le nombre de lobes représentent les seules différences entre les sous-espèces. La période de floraison de la plante est de Juin à Septembre. Cette espèce est une plante thermophile initialement trouvé autour du bassin méditerranéen (les régions européennes et africaines de la Méditerranée) et en Europe occidentale [66]. Elle pousse sur les prairies herbeuses, les pâturages, les forêts marges, également sur les bancs de sable, généralement près de niveau de la mer, mais parfois jusqu'à une altitude d'environ 1500 m.

III.2 Classification dans la systématique botanique

Règne :	<i>Plantae</i> ;
Embranchement :	<i>Spermatophytæ (Phamérogames)</i> ;
Sous embranchement :	<i>Angiospermes</i> ;
Classe :	<i>Magnoliopsida (Dicotulédone)</i> ;
Ordre :	<i>Gentianales</i> ;
Famille :	<i>Gentianaceae</i> ;
Genre :	<i>Blackstoia</i> ;
Espèce :	<i>Perfoliata</i> (ou <i>Chlora Perfoliata</i>);



Figure 12 : *Blackstoia Perfoliata*

III.3 Aspects pharmacologiques et thérapeutiques

Les parties aériennes séchées de *B. perfoliata* ont été décrits comme un substitut de *Centaurii Herba* un remède amer pour le traitement des troubles du système digestif (par exemple, la dyspepsie, anorexie), agissant par l'intermédiaire de la stimulation de la sécrétion gastrique et un effet tonique général [69]. La plante peut contenir jusqu'à 3% de gentiopicrin, un principe actif amer présent dans *Centaurii Herba* et aussi dans *Radix Gentianae* [70, 71].

III.4. Composition chimique

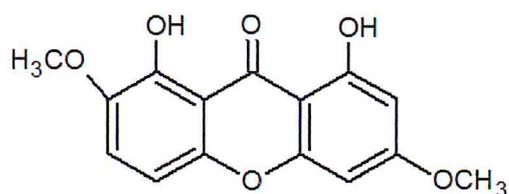
Selon Van Der Sluis [72], les Sécoiridoïdes et les Xanthones sont des composés dominants dans les espèces de Gentianaceae. Le Sweroside est le secoiridoïdes majoritaire présent dans les parties aériennes de *Centaurium pulchellum* [73], alors qu'il est un composé mineur dans les parties aériennes de *B. perfoliata* [74].

Les métabolites secondaires de *B. perfoliata* sont présentés dans le tableau suivant :

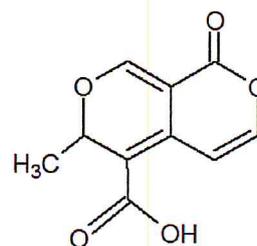
Tableau 4 : Métabolites secondaires isolés de *B. perfoliata*

Classe de métabolite secondaire	Composé et N° de structure	Référence
Xanthones	1,8-dihydroxy-3,6-diméthoxyxanthone (41)	[72]
	1,3,7-trihydroxyxanthone « Gentisein » (2)	
Iridoides	Gentiopicroside (9)	[74]
	Sweroside (10)	

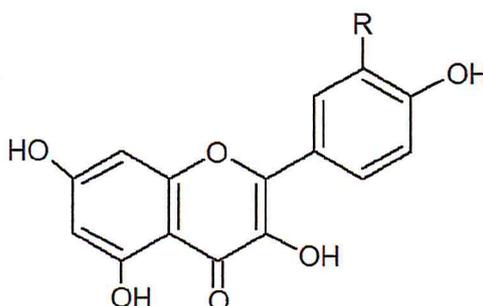
	Swertiamarin (11)	
	Gentiogenal (Gentiopical) (42)	
Flavonoïdes	Kaempferol (43)	[75], [76]
	Quercetin (44)	
	Isorhamnetin (45)	



(41) 1,8-dihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone



(42) gentiopicral



(43) (R=H) « Kaempferol »

(44) (R=OH) « Quercetin »

(45) (R=OCH₃) « Isorhamnetin »Figure 13: Structure des métabolites secondaires isolés de l'espèce *Blackstoia perfoliata*

Travaux personnel

Chapitre I

description des travaux

I. Extraction des métabolites secondaires des espèces « *Centaurium erythraea* » et « *Blackstonia perfoliata* »

I-1 Matériel végétal

Les plantes de notre étude, ont été récoltées à Bouaarfa dans la région de Blida, en mois de juin 2015. Le matériel végétal est séché à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, puis broyé et conservé jusqu'à l'utilisation.

Les deux espèces ont été identifiées par le Pr Méttail, professeur au département de pharmacie, Université de Blida1, comme *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfoliata*.

I-2 Préparation des extraits

Les métabolites secondaires des deux plantes ont été obtenus en adoptant le même protocole d'extraction.

I-2-1 Extraction à froid (Macération)

20g de la partie aérienne de la plante sèche et broyée sont mises à macération dans 150ml de différents solvants (Chloroforme, Ethanol et mélange Méthanol/Eau (5/1)) pendant 24 heures. Les extraits sont filtrés sur papier filtre puis évaporés à sec sous pression réduite à une température inférieure à 45°C, à l'aide d'un évaporateur rotatif.

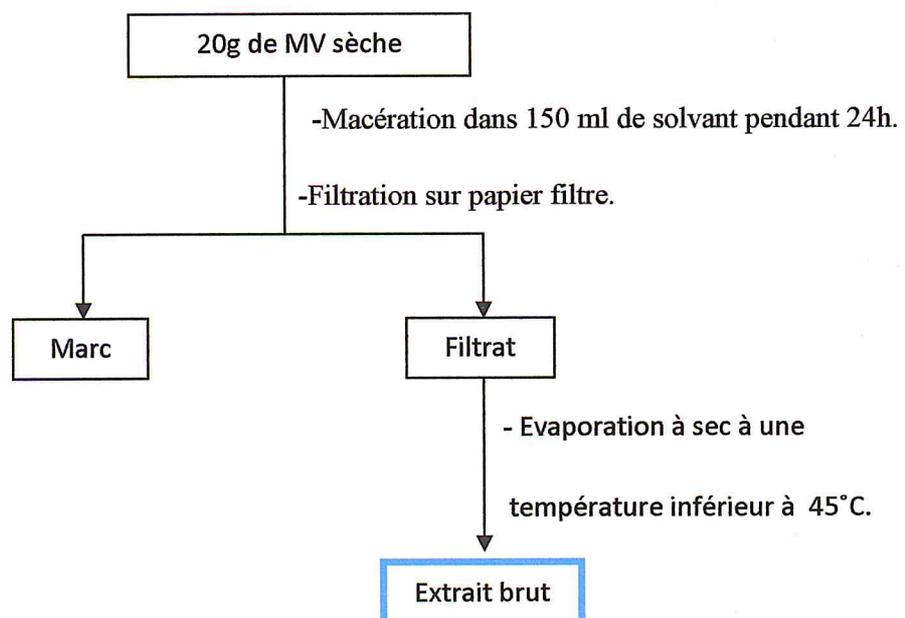


Figure 14: Protocole de préparation des extraits par Macération

❖ **Caractéristiques organoleptiques des extraits**

L'opération de l'extraction par macération de la partie aérienne des plantes étudiés dans des solvants de polarités différentes a permis d'obtenir un résidu sec des extraits bruts qui ont des caractéristiques différentes (aspect et couleur) représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5: Aspect et couleur de différents extraits obtenus par Macération

Extrait	Ce_C	Ce_E	Ce_{HM}	Bp_C	Bp_E	Bp_{HM}
Aspect	Pâteux	Visqueux	Visqueux	Pâteux	Visqueux	Visqueux
Couleur	Vert	Verdâtre	Vert jaunâtre	Jaune	Vert militaire	Vert olive

Ce_C : Extrait chloroformique de *Centaurium erytheraea* ;

Ce_E : Extrait éthanolique de *Centaurium erytheraea* ;

Ce_{HM} : Extrait hydrométhanolique de *Centaurium erytheraea* ;

Bp_C : Extrait chloroformique de *Blackstonia perfoliata* ;

Bp_E : Extrait éthanolique de *Blackstonia perfoliata* ;

Bp_{HM} : Extrait hydrométhanolique de *Blackstonia perfoliata*.

❖ **Calcul du rendement**

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter. Il est calculé par la formule suivante:

$$R\% = PE/PA \times 100$$

Où **R**= Rendement de l'extrait en pourcentage;

PE= Poids de l'extrait en gramme;

PA= Poids de la plante en gramme.

Le rendement calculé pour les extraits des deux plantes est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Masses et rendements de différents extraits obtenus par Macération

Extrait	Ce_C	Ce_E	Ce_{HM}	Bp_C	Bp_E	Bp_{HM}
Masse (g)	1.22	3.08	5.62	0.91	1.66	2.72
Rendement %	6.1	15.4	28.1	4.55	8.3	13.6

I-2-2 Extraction à chaud

30 g de la partie aérienne des plantes broyées, sont placés dans une cartouche du Soxhlet exposée au 300 ml d'acétone portée à ébullition. Après environ 6 h, l'acétone chargée des métabolites secondaires est récupérée puis évaporée à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'opération est aussi répétée avec le méthanol.

Le protocole de l'extraction par le Soxhlet est schématisé ci-dessous :

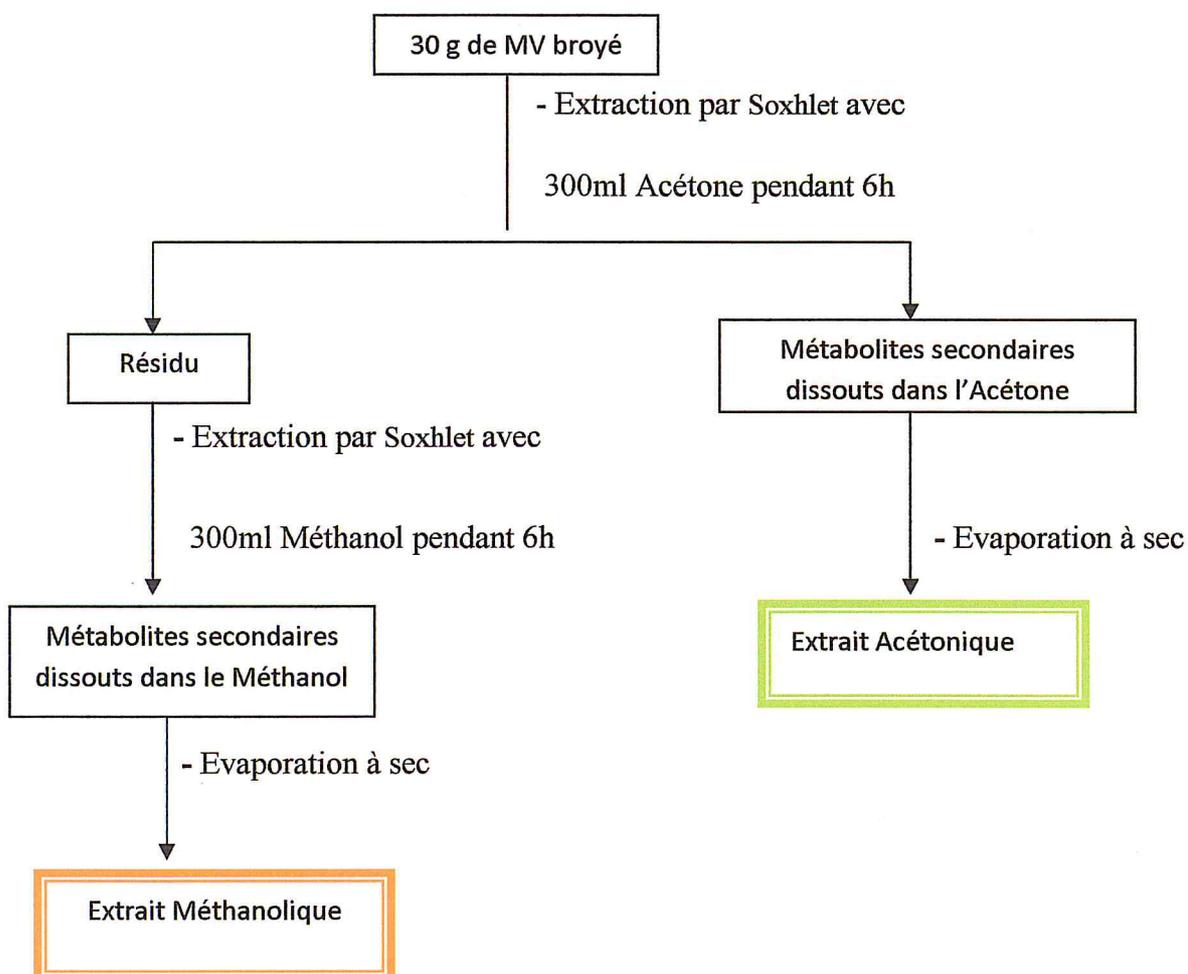


Figure 15: Protocole de préparation des extraits par Soxhlet

Les différentes caractéristiques (aspect et couleur) des extraits obtenus de l'extraction par Soxhlet sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Aspect, couleur de différents extraits obtenu par extraction par Soxhlet

Extrait	<i>Ce_A</i>	<i>Ce_M</i>	<i>Bp_A</i>	<i>Bp_M</i>
Aspect	Pâteux	Pâteux	Pâteux	Pâteux
Couleur	Miel	Vert jaunâtre	Jaune	Jaune verdâtre

Ce_A : Extrait acétonique de *Centaurium erytheraea* ;

Ce_M : Extrait méthanolique de *Centaurium erytheraea* ;

Bp_A : Extrait acétonique de *Blackstonia perfoliata* ;

Bp_M : Extrait méthanolique de *Blackstonia perfoliata*.

Les masses et les rendements obtenus d'extraits des deux plantes étudiées sont regroupés dans le tableau 4 :

Tableau 8: Masses et rendements de différents extraits obtenus par Soxhlet

Extrait	<i>Ce_A</i>	<i>Ce_M</i>	<i>Bp_A</i>	<i>Bp_M</i>
Masse (g)	5.08	4.89	6.41	7.6
Rendement %	25.4	24.4	18.31	21.71

D'après les résultats mentionnés dans les tableaux 6 et 8, on remarque que l'extraction par macération et par Soxhlet ont donnés le même résultat en rendements des extraits de l'espèce *Centaurium erytheraea* ce sont supérieur à ceux de l'espèce *Blackstonia perfoliata*.

Tableau 9 : Résultats du test phytochimique pour les terpènes et les triterpènes.

	<i>Ce_{HM}</i>	<i>Ce_E</i>	<i>Bp_{HM}</i>	<i>Bp_E</i>
Terpènes	++	+	++	+
Triterpènes	++	+	++	+

L'apparition de la coloration verte-violette plus ou moins intense indique la présence des terpènes et des triterpènes dans tous nos extraits avec une teneur plus au moins important.

II-3 Les stérols et les stéroïdes

Les stérols sont des 3-monohydroxystéroïdes ayant des squelettes de 27 à 30 atomes de carbone. Ils sont tous solides et largement distribués dans la nature, et se trouve à l'état libre ou estérifié.

Les stéroïdes sont un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), hydrophobes partiellement ou totalement hydrogénés. Habituellement, les carbones C₁₀, C₁₃ sont liés à un groupe méthyle -CH₃ et le carbone C₁₇ à un groupe alkyle [79].

❖ Recherche des stéroïdes et des stérols

5g de plante est mise dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute l'anhydride acétique, puis 1ml d'H₂SO₄ au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèle la présence des stérols.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Résultats du test phytochimique pour les stérols et les stéroïdes.

	<i>Centaurium erythraea</i>	<i>Blackstonia Perfoliata</i>
Stérols et Stéroïdes	++	++

Les extraits des deux plantes ont une teneur importante en stérols et stéroïdes.

II-4 Les phénols

Les phénols ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal, étant trouvés dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais, avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus [6].

❖ Recherche des phénols

10mg de l'extrait brut a été mélangé avec 1ml de la solution de FeCl₃ à 2%. le changement de couleur noir ou bleu-vert suggère la présence des phénols.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11 : Résultats du test phytochimique pour les phénols

<i>Centaurium erythraea</i>					
Extrait	<i>Ce_{HM}</i>	<i>Ce_E</i>	<i>Ce_C</i>	<i>Ce_A</i>	<i>Ce_M</i>
Phénols	++	++	-	-	++
<i>Blackstonia Perfoliata</i>					
Extrait	<i>Bp_{HM}</i>	<i>Bp_E</i>	<i>Bp_C</i>	<i>Bp_A</i>	<i>Bp_M</i>
Phénols	++	+	-	-	++

D'après les résultats obtenus, les phénols sont présents dans les extraits polaires (hydrométhanoliques, méthanoliques et éthanoliques) des deux plantes étudiées et absents dans les extraits apolaires (chloroformiques et acétoniques).

II-5 Les tannins

Les tanins sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses. Ce sont des métabolites secondaires des plantes supérieures que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, fruits, etc.) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites [80].

❖ Recherche des tanins

1ml de chlorure ferrique FeCl₃ (1%) est ajouté à 5ml de l'extrait hydrométhanolique solubilisé dans l'eau distillée. Cette réaction permet de détecter la présence ou non des

tannins. Le virage vers la couleur bleue noirâtre indique la présence des tanins galliques, et vers la couleur brune verdâtre indique la présence des tanins cathéchiques.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12 : Résultats du test phytochimique pour les tanins

<i>Centaurium erytheraea</i>					
Extrait	Ce_{HM}	Ce_E	Ce_C	Ce_A	Ce_M
tannins	++	++	-	-	++
<i>Blackstonia Perfoliata</i>					
Extrait	Bp_{HM}	Bp_E	Bp_C	Bp_A	Bp_M
tannins	++	+	-	-	++

Les résultats obtenus montrent que seule les extraits polaires des deux espèces *Centaurium erytheraea* et *Blackstonia perfoliata* contiennent des tanins.

II-6 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On attribue à ces flavonoïdes des propriétés variées : veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, anti-allergique, antispasmodique, anti-bactérienne, hépatoprotectrice, oestrogénique et/ou anti-oestrogénique, anti-virale etc... Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires [81].

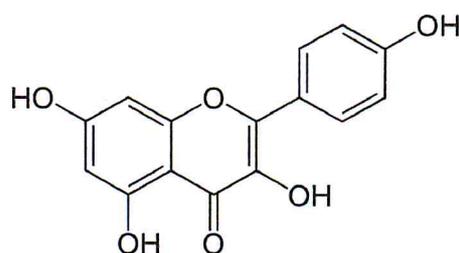


Figure 16: Structure des flavonoïdes

❖ Recherche des flavonoïdes

1g de plante, sous forme de poudre, est pesé puis mélangé à 10ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24h. Après filtration on ajoute au filtrat l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire indique la présence des flavonoïdes.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 13 : Résultats du test phytochimique pour les flavonoïdes

	<i>Centaurium erythraea</i>	<i>Blackstonia Perfoliata</i>
Flavonoïdes	+	+

Les résultats obtenus montrent que les flavonoïdes sont présents dans les deux plantes étudiées.

II-7 Les Coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes.

Les coumarines donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. Elles présentent un intérêt physiologique, inhibant la croissance des graines en germination [82].

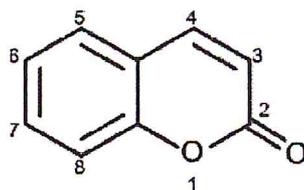


Figure 17: Structure de base des coumarines

❖ Recherche des coumarines

Dans un tube à essai, on introduit 0.5g de l'extrait et on le couvre avec du papier filtre traité avec une solution de NaOH (1N). Ensuite, le tube est placé dans l'eau chaude durant quelques minutes. Enfin, le papier filtre est examiné sous UV. La fluorescence jaune indique la présence des coumarines.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 14 : Résultats du test phytochimique pour les coumarines.

<i>Centaurium erythraea</i>					
Extrait	Ce_{HM}	Ce_E	Ce_C	Ce_A	Ce_M
Coumarines	++	++	-	-	++
<i>Blackstonia Perfoliata</i>					
Extrait	Bp_{HM}	Bp_E	Bp_C	Bp_A	Bp_M
Coumarines	++	+	-	-	++

Les résultats obtenus montrent que les coumarines sont fortement caractérisées dans les extraits polaires (hydrométhanoliques, méthanoliques et éthanologiques) et totalement absents dans les extraits apolaires (chloroformiques et acétoniques) des deux plantes.

II-8 Les saponosides

On entend par saponosides (mot latin « sapon », savon ; saponaire », l'herbe à savon), les saponosides sont des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpénique. Ils sont des substances naturelles à large spectre d'activité biologiques, ils sont caractérisé par leurs propriétés tensioactives, certains sont utilisés en thérapeutique comme: anti-inflammatoire, stimulant diurétique, anti-tumoral, anti-oedémateuse, antimicrobiens, hémolytiques, antitussive et/ou expectorante et cicatrisants notamment au niveau des plaies cutanées [83].

❖ Recherche des saponosides

2 g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 15 : Résultats du test phytochimique pour les saponosides

	<i>Centaurium erythraea</i>	<i>Blackstonia Perfoliata</i>
Saponines	±	±

La hauteur de la mousse persistante est de 4mm pour *Blackstonia perfoliata* et de 2.5mm pour *Centaurium erythraea*.

III- Chromatographie sur couche mince CCM

La Chromatographie sur Couche Mince est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. Dans le but de connaître la composition de nos extraits en métabolites secondaires, nous avons réalisés, pour chaque extrait, une chromatographie sur couche mince sur des plaques de gel de silice.

La révélation des plaques a été faite sous une lampe UV (à 365 nm).

Dans le but d'une recherche de la composition des extraits obtenus en métabolites secondaires par CCM nous avons réalisé plusieurs essais, en utilisant différents éluants.

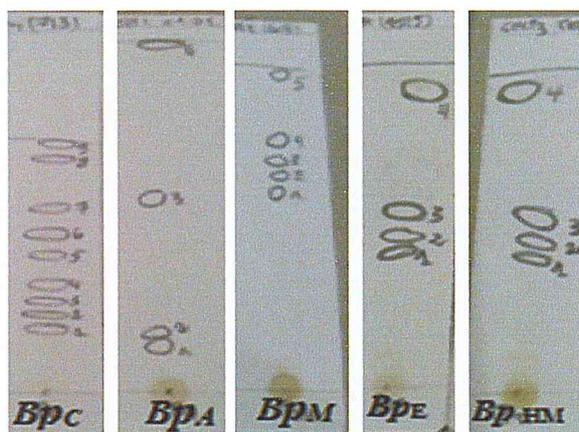


Figure 18: Profile de la CCM des extraits de *B.perfoliata* sous UV

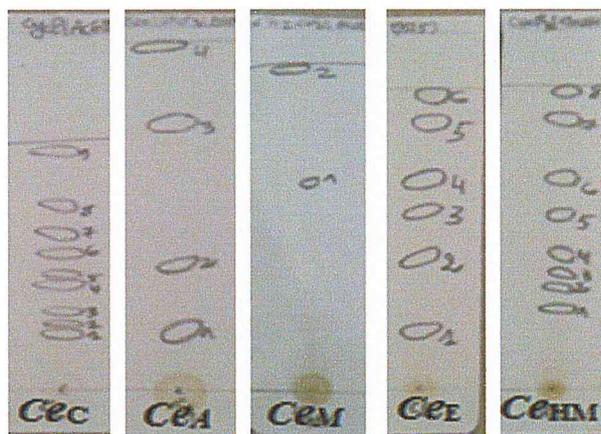


Figure 19: Profile de la CCM des extraits de *C.erythraea* sous UV

D'après les Chromatogrammes des extraits sous UV on peut constater que :

- L'extraits hydrométhanolique et l'extrait éthanolique de *B.perfoliata* ont la même composition, car les spots sont identiques, ils ont la même couleur et les mêmes Rfs ;
- Pour chaque plante, l'extrait chloroformique contient plus de composés que l'extrait acétonique ;
- L'extrait hydrométhanolique de *C.erythraea* est plus riche en métabolites secondaires que celui du *B.perfoliata* ;
- Les extraits polaires (hydrométhanoliques, méthanoliques et éthanoliques) de *C.erythraea* sont riches en métabolites secondaires par rapport aux extraits polaires de *B.perfoliata*, par contre, l'extrait méthanolique de *B.perfoliata* est plus riche que le même extrait de *C.erythraea*.

La présence des composés phénoliques a été mise en évidence par l'apparition de la couleur jaune après pulvérisation de la plaque par une solution éthanolique saturée de NaOH.

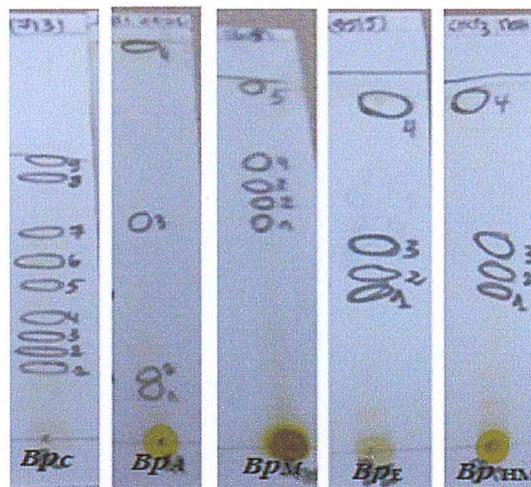


Figure 20: Profile de la CCM des extraits de *B.perfoliata* après pulvérisation

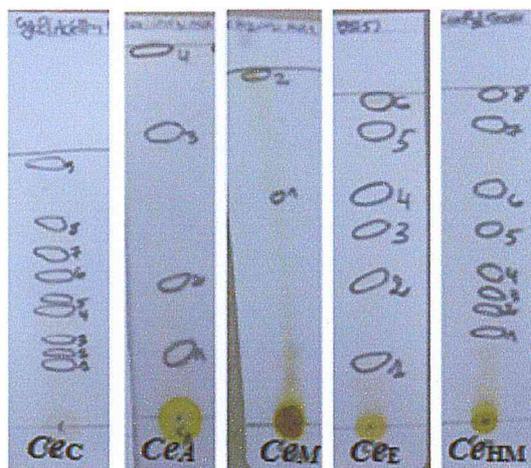


Figure 21: Profile de la CCM des extraits de *C.erythraea* après pulvérisation

Les R_f sont calculés à l'aide de la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de la tache}}{\text{Hauteur du front du solvant}}$$

Les résultats sont résumés dans les tableaux (8,9) ci-dessous :

Tableau 16: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de *B.perfoliata*

Extraits étudiées	Système de solvants v/v (ml) (Eluant)	Rf	Couleur des taches	
			sous UV	Après révélation
<i>Bp_{HM}</i> , <i>Bp_E</i>	CHCl ₃ /MeOH (95/5)	0.43	Bleu	Violet
		0.49	Rouge	Violet
		0.56	Jaune	Bleu
		0.97	Orange	Jaune
<i>Bp_M</i>	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (6/4)	0.56	Violet	Bleu
		0.69	Violet	Bleu
		0.75	Rouge	Violet
		0.82	Violet	Bleu
		0.97	Orange	Jaune
<i>Bp_A</i>	Hex/CHCl ₃ /AcOEt (1/1/0.5)	0.12	Violet	Bleu
		0.16	Rouge	Violet
		0.53	Jaune	Bleu
		0.98	Orange	Jaune
<i>Bp_C</i>	Cyclohexane/Acétone (7/3)	0.24	Violet	Bleu
		0.29	Rouge	Violet
		0.34	Jaune	Bleu
		0.41	Violet	Bleu
		0.53	Rouge	Violet
		0.61	Rouge	Violet
		0.71	Rouge	Violet
		0.92	Orange	Jaune
		0.98	Orange	Jaune

Tableau 17: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de *C. erythraea*

Extraits étudiées	Système de solvants v/v (ml) (Eluant)	Rf	Couleur des taches sous UV	Couleur des taches Après pulvérisation
<i>Ce_{HM}</i>	CHCl ₃ /MeOH (95/5)	0.25	Jaune claire	Violet
		0.32	Violet	Violet
		0.37	Violet	Violet
		0.44	Violet foncé	Bleu
		0.56	Rouge	Bleu
		0.69	Jaune	Bleu
		0.89	Jaune	Bleu
		0.98	Orange	Jaune
<i>Ce_E</i>	CHCl ₃ /MeOH (95/5)	0.18	Violet foncé	Bleu
		0.42	Violet foncé	Bleu
		0.58	Rouge	Bleu
		0.69	Bleu	Bleu
		0.89	Bleu	Bleu
		0.98	Orange	Jaune
<i>Ce_M</i>	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (6/4)	0.62	Rouge	Bleu
		0.98	Orange	Jaune
<i>Ce_A</i>	Hex/CHCl ₃ /AcOEt (1/1/0.5)	0.16	Rouge	Bleu
		0.35	Bleu	Bleu
		0.75	Jaune	Bleu
		0.98	Orange	Jaune
<i>Ce_C</i>	Cyclohexane/Acétone (7/3)	0.22	Jaune	Bleu
		0.25	Rouge	Bleu
		0.31	Rouge	Bleu
		0.41	Jaune	Jaune
		0.44	Jaune	Jaune
		0.53	Violet	Bleu
		0.61	Rouge	Bleu
		0.73	Rouge	Bleu
0.95	Orange	Jaune		

Par comparaison avec la littérature [35] (Tableau 18), on peut déduire que la présence des spots de coloration jaune et violette dans les chromatogrammes de nos extraits, est attribuée à la présence dans les espèces étudiées, des flavonols, des flavonones et des flavones.

L'étude de la coloration des spots de la chromatographie sur couche mince des composés phénoliques réalisés par Markham [84] sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des composés phénoliques établis par Markham.

Couleurs des spots	Composés phénoliques
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 di glucoside
Orange	Anthocyanidine 3 glucoside
Jaune	Flavonols
Jaune pale	Flavonols
Bleu sombre	Flavonols, flavonones, aurones
Bleu vif	Hydroquinones
Bleu blanc fluo	Acide phenol
Mauve	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavones
Violet	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavone

IV. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu [85].

IV-1 Principe

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait à analyser qui donne un maximum d'absorption à 765 nm

IV -2 Protocole

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie UV-Visible, 1 ml de l'extrait de la plante (2mg d'extrait + 1ml MeOH + 6.5ml H_2O) est mélangé avec 0.5 ml de folin ciocalteu. On ajoute par la suite 5ml H_2O et 4ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 75g/l. A la fin l'absorbance est mesurée à 765 nm, après incubation pendant 1 heure à température ambiante.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique 2mg/ml, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c.V/m$$

C : contenu des polyphénols totaux (mg équivalent acide gallique /g d'extrait de plante).

c : concentration de l'acide gallique (mg/ml).

V : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait pur de plante (g).

❖ Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les absorbances de l'acide gallique correspondantes aux solutions de concentrations citées ci-dessus sont enregistrées et représentées dans le tableau.4:

Tableau 19 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique

Concentration massique (mg/ml)	0	0.0156	0.0312	0.05	0.07	0.125
Absorbance à 765nm	0.05	0.24	0.392	0.504	0.65	0.744

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 22) (Absorbance en fonction de la concentration (mg/ml)) est représentée ci-dessous :

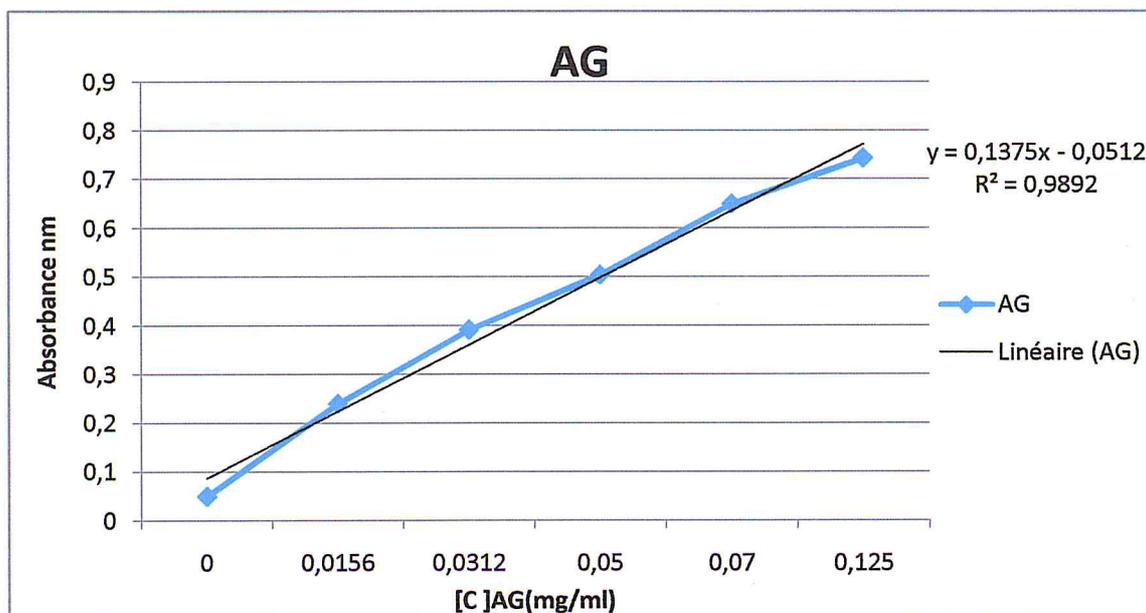


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

IV-3 Détermination du taux des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide gallique et déterminé par l'équation de type : $y = 0,1375x - 0,0512$ sachant que le coefficient de corrélation $R^2 = 0,9892$ (Fig. 22).

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfoliata*

Tableau 20 : Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanolique et éthanolique des deux plantes étudiées

Extrait	<i>Centaurium erythraea</i>		<i>Blackstonia perfoliata</i>	
	Ce_M	Ce_E	Bp_M	Bp_E
Contenu en polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	15.6 ± 1.21	15.06 ± 1.15	18.1 ± 1.06	16.55 ± 1.19

D'après le tableau 20, on peut conclure que la teneur en polyphénols totaux pour les extraits méthanolique et éthanolique de *Blackstonia perfoliata* est plus élevée que la teneur des extraits méthanolique et éthanolique de *Centaurium erythraea*.

Chapitre II

Etude de l'activité biologique

I-Etude de l'activité antioxydante de « *Centaurium erythrae* » et « *Blackstonia perfolita* »

I-1 Définition

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont la β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le Picnogénol. La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures 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 ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) [86].

I-2 Principe du test au DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H^+ , il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm [87].

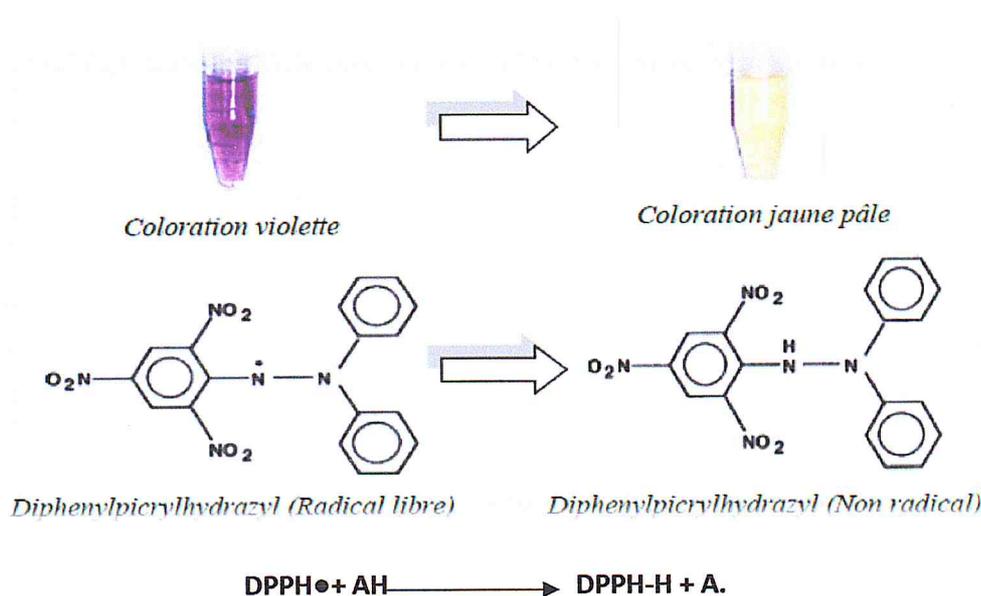


Figure23 : Réaction d'un antioxydant donneur d'hydrogène avec le radical $\text{DPPH}\cdot$.

L'activité antioxydant, qui exprime les capacités de piéger le radicale libre est estimé par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol (% Inhibition ou I%) suivant la formule:

$$\% \text{Inhibition} = (\text{Abs control} - \text{Abs ext}) \times 100 / \text{Abs control}.$$

Où:

Abs control : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm;

Abs ext : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm.

Calcul des CE₅₀:

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur CE₅₀ (Concentration Efficace) aussi appelée CI₅₀ (Concentration Inhibitrice de 50 %), est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les CE₅₀ ont été calculées par la régression linéaire où l'abscisse est représenté par la concentration des composés testés et l'ordonné par le pourcentage d'inhibition (I%) [88].

Calcul de l'activité antiradicalaire :

Nous pouvons déduire l'activité anti-radicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE₅₀ trouvées [89].

$$\text{ARP} = 1 / \text{CE}_{50}$$

ARP : Puissance anti-radicalaire

CE₅₀ : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

I-3 Protocol expérimental

I-3-1 Préparation des échantillons

Pour tous les extraits, on prépare des solutions dans du méthanol absolu (0.05g de l'extrait dans 10ml de MeOH). Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml

I-3-2- Préparation de la solution DPPH

La solution de DPPH a été préparée avec 4mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol absolu, a une concentration de 0.004% (100µmol/l).

I-3-3 Préparation de la solution d'acide ascorbique

Elle est préparée par dissolution de 0.4 mg de l'acide ascorbique dans 10ml de méthanol et en fait des dilutions. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

I-3-4 Protocole réalisé

Dans des tubes à essai secs et stériles, on introduit 1.5ml de l'échantillon à tester, et on ajoute 1.5 ml de la solution DPPH. Les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C) pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est mesurée contre un blanc (1.5ml d'extrait +1.5ml MeOH) préparé pour chaque concentration à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

I-4 Résultats de l'activité anti-oxydante testée par la méthode du DPPH

L'activité antioxydante des extraits des plantes *Centaurium erythrae* et *Blackstonia perfolita* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie UV-Visible, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire de ces extraits a été faite en comparaison avec celle d'antioxydant : l'acide ascorbique (on a préparé une gamme de dilutions). Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 21 et 22, et illustrés par les figures 24 et 25.

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant.

Le tableau 21 regroupe aux différentes concentrations, l'absorbance et le pourcentage d'inhibition des extraits étudiés de l'espèce *Centaurium erythrae* et du standard (Acide ascorbique)

Tableau 21 : Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits de *Centaurium erythrae*

C(mg/ml)	CE _{HM}		CE _M		CE _A		Ac Ascq	
	Abs	%inh	Abs	%inh	Abs	%inh	Abs	%inh
5	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	0.27	97.61
3	ANM	ANM	ANM	ANM	0.075	86.511	0.043	96.2
2	0.038	90.594	ANM	ANM	0.178	67.986	0.051	95.49
1	0.042	89.728	0.037	92.673	0.263	52.698	0.052	95.41
0.7	0.058	87.58	ANM	ANM	0.335	39.748	ANM	ANM
0.5	0.104	74.381	0.051	89.901	ANM	ANM	0.113	90.02
0.4	ANM	ANM	0.073	85.544	0.405	27.158	ANM	ANM
0.3	ANM	ANM	0.206	59.208	0.470	18.468	ANM	ANM
0.35	0.155	66.809	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM
0.25	0.280	30.693	0.283	45.960	ANM	ANM	0.584	48.45
0.15	ANM	ANM	ANM	ANM	0.480	14.748	ANM	ANM
0.125	0.368	8.911	0.291	39.376	ANM	ANM	0.669	40.95
0.1	ANM	ANM	0.335	33.663	0.489	12.050	0.692	38.9
0.05	ANM	ANM	0.347	31.287	ANM	ANM	ANM	ANM

ANM (Absorbance Non Mesurée)

Le pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits de *Centaurium erythrae* est illustre par la figure ci-dessous :

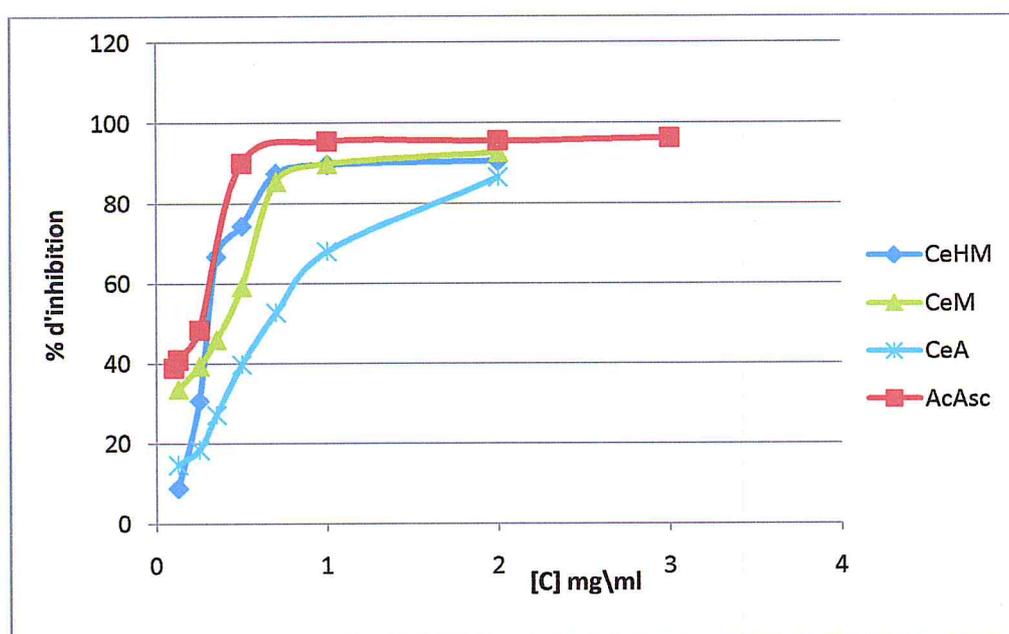


Figure 24 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits de *Centaurium erythrae*

Le tableau 22 regroupe aux différentes concentrations, l'absorbance et le pourcentage d'inhibition des extraits étudiés de l'espèce *Blackstonia perfolita* et du standard (Acide ascorbique).

Tableau 22 : Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits de *Blackstonia perfolita*

C(mg/ml)	BP _{HM}		BP _M		BP _A		Ac Ascq	
	Abs	%inh	Abs	%inh	Abs	%inh	Abs	%inh
5	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	0.027	97.61
3	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	0.043	96.2
2	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	ANM	0.051	95.49
1	0.0295	92.875	0.052	88.866	ANM	ANM	0.052	95.41
0.7	ANM	ANM	ANM	ANM	0.045	89.583	ANM	ANM
0.5	0.0485	89.855	0.064	86.403	0.091	78.935	0.113	90.02
0.4	ANM	ANM	ANM	ANM	0.132	69.44	ANM	ANM
0.3	0.057	86.232	ANM	ANM	0.187	56.713	ANM	ANM
0.35	ANM	ANM	0.104	77.73	ANM	ANM	ANM	ANM
0.25	0.0825	80.073	0.147	68.630	0.283	44.491	0.584	48.45
0.15	0.149	64.010	0.262	43.897	ANM	ANM	ANM	ANM
0.125	0.296	38.344	ANM	ANM	ANM	ANM	0.669	40.95
0.1	0.337	29.043	0.279	40.257	0.290	32.870	0.692	38.9
0.05	0.418	12.118	0.298	36.296	0.362	16.204	ANM	ANM

ANM (Absorbance Non Mésurée)

Le pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits de *Blackstonia perfolita* est illustre par la figure ci-dessous :

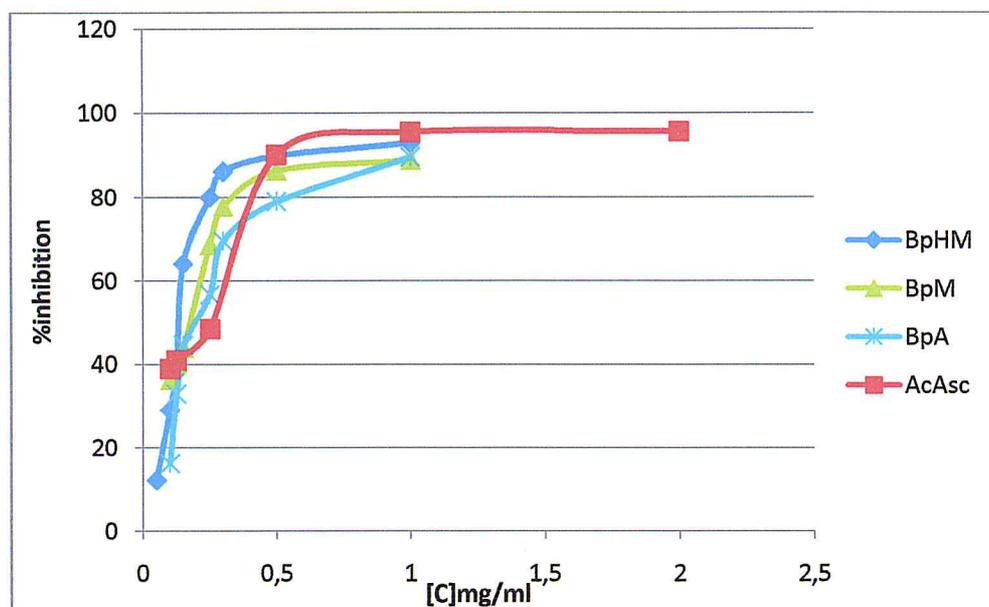


Figure 25 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits de *Blackstonia perfolita*

D'une manière générale, les extraits testés des plantes étudiées ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517nm selon leurs concentrations.

L'activité antioxydant des extraits est exprimée en CE_{50} (Tableaux 23 et 24), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces CE_{50} sont déterminées à partir des graphes (figures 24 et 25.) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Un autre paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier est noté : "ARP" (pouvoir anti-radicalaire, égale à $1/CE_{50}$) [88, 90].

Tableau 23: Valeurs CE_{50} et ARP des extraits de *Centaurium erythraeae*

Composés	CE_{HM}	CE_M	CE_A	Vit C
CE_{50} (mg.ml ⁻¹)	0.26	0.27	0.9	0.27
ARP	3.85	3.70	1.1	3.70

Tableau 24: Valeurs CE₅₀ et ARP des extraits de *Blackstonia perfolita*

Composés	Bp _{HM}	Bp _M	Bp _A	Vit C
CE ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	0.15	0.19	0.28	0.27
ARP	6.67	5.26	3.57	3.70

I-5 Discussion des résultats

Comme figurant dans les tableaux précédant (23 et 24), l'antioxydant standard (Acide ascorbique) a montré une activité antioxydante puissante avec une CE₅₀ de l'ordre de 0.27mg/ml.

D'après le tableau 23, nous remarquons les valeurs des CE₅₀ des extraits s'échelonnent entre 0.26, 0.27, 0.9 mg/ml, pour l'extrait hydroalcoolique, méthanolique, acétonique respectivement de *C. erythrae*. Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour l'extrait hydroalcoolique se traduisant par un CE₅₀ égale à celui du composé standard l'acide ascorbique (0.27 mg/ml).

Plus la valeur de la CE₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Les extraits de l'espèce végétale *Centaurium erythrae* peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir anti-radicalaire, comme suit : Extrait hydroalcoolique > méthanolique > acétonique.

Pour les extraits de *B. perfolita*, leurs valeurs de CE₅₀ s'échelonnent entre 0.15, 0.19, 0.28 mg/ml, pour l'extrait hydroalcoolique, méthanolique, acétonique respectivement (tableau 24). Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour l'extrait hydroalcoolique se traduisant par un CE₅₀ assez bas à celui du composé standard l'acide ascorbique (0.27 mg/ml).

Les extraits de l'espèce végétale *Blackstonia perfolita* peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir anti-radicalaire, comme suit : Extrait hydroalcoolique > méthanolique > acétonique.

❖ Comparaison de l'activité antioxydante des extraits des deux plantes étudiées

On récapitule les résultats obtenus par des courbes de comparaison des mêmes extraits des deux plantes étudiées avec les CE_{50} correspond pour chaque extrait.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits hydrométhanolique de chaque plante est illustre par la figure ci-dessous :

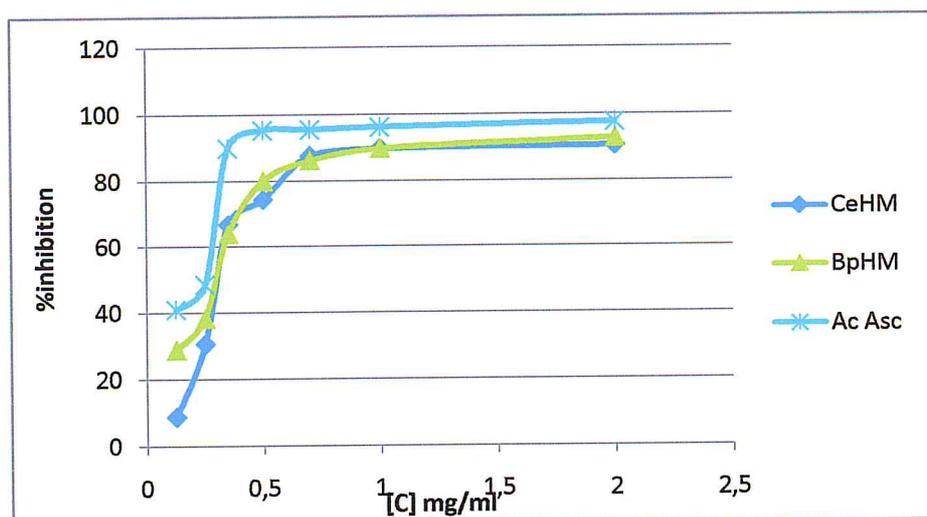


Figure 26 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_{HM} et Bp_{HM}

Les valeurs de la CE_{50} des extraits hydrométhanoliques de chaque plante sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Valeurs CE_{50} des extraits hydrométhanolique de *B. perfolita* et *C. erythraea*

Composés	Ce_{HM}	Bp_{HM}	Vit C
CE_{50} (mg.ml ⁻¹)	0.26	0.15	0.27

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits méthanolique de chaque plante est illustre par la figure ci-dessous :

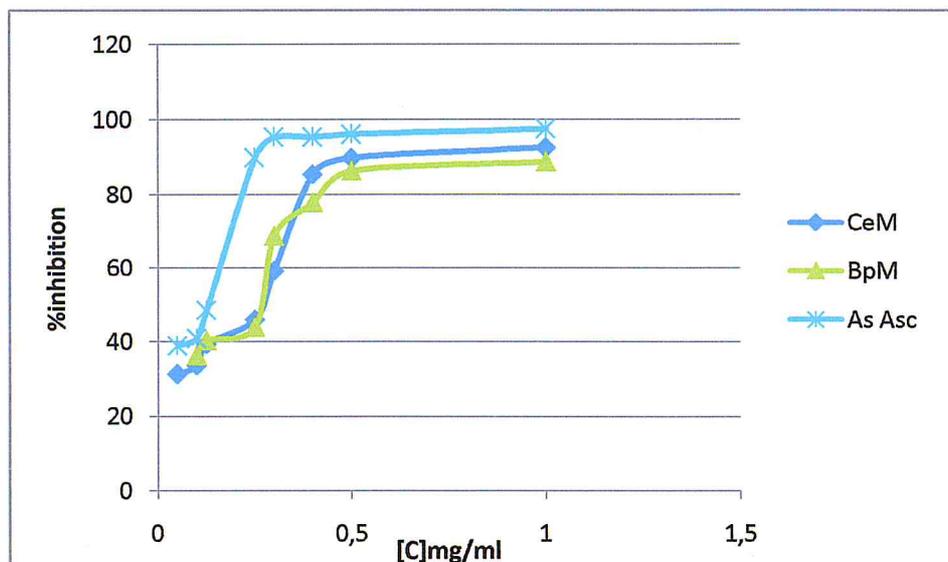


Figure 27 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_M et Bp_M

Les valeurs de la CE_{50} des extraits méthanoliques de chaque plante sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Valeurs CE_{50} des extraits méthanoliques de *B. perfolita* et *C. erythraea*

Composés	Ce_M	Bp_M	Vit C
CE_{50} (mg.ml ⁻¹)	0.27	0.19	0.27

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits acétoniques de chaque plante est illustre par la figure ci-dessous :

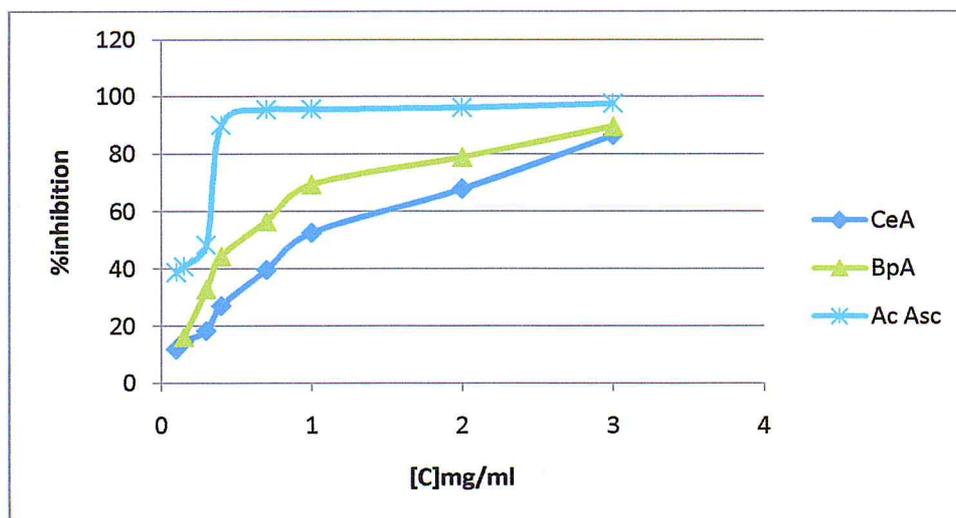


Figure 28: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de Ce_A et Bp_A

Les valeurs de la CE₅₀ des extraits acétoniques de chaque plante sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 27: Valeurs CE₅₀ des extraits acétonique de *B. perfolita* et *C. erythraea*

Composés	Ce _A	Bp _A	Vit C
CE ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	0.9	0.28	0.27

Les résultats montrent que tous les extraits étudiés ont une activité antioxydante considérable.

Les extraits hydrométhanolique et méthanolique de *C. erythraea* ont des valeurs de CE₅₀ identiques à celle du standard (l'acide ascorbique). Ils sont considérés comme des antioxydants puissants par rapport à l'extrait acétonique (0.9 mg/ml).

Par ailleurs, les valeurs de CE₅₀ pour extraits hydrométhanolique et méthanolique et acétonique de *B. perfolita* sont très proches à celle du standard (l'acide ascorbique) (0.27 mg/ml), aussi ces extraits sont considérés comme des antioxydants puissants.

On conclut aussi que les extraits hydrométhanolique et méthanolique des deux plantes étudiées présentent ont une bonne activité antioxydante par rapport à celle des extraits acétoniques.

❖ Comparaison des CE₅₀ avec les teneurs en polyphénols

L'étude de menée par Siler [91] sur les différentes parties de l'espèce *C. erythraea* a montré que l'activité antioxydante de la partie aérienne est 13 fois élevée que celle des racines, cela peut être lié à une teneur plus élevée de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, dans les organes végétaux verts.

Dans l'extrait méthanolique de *C. erythraea*, la teneur en polyphénols est égale à 15.6 mg EAG/g d'extrait, c'est-à-dire elle représente 60 fois la CE₅₀. D'autre part dans l'extrait méthanolique de *B. perfolita* la teneur en polyphénols est égale à 18.1mg EAG/g d'extrait, c'est-à-dire elle représente presque 120 fois la CE₅₀.

D'après ces résultats, on peut conclure que l'effet scavenger augmente avec l'augmentation de la concentration des polyphénols dans l'extrait ce qui mène à suggérer que l'effet

antioxydant d'un extrait de plante est en relation avec la quantité des polyphénols présents. Cette hypothèse a été déjà démontré par de nombreux chercheurs [92, 94].

En général, les activités de nos extraits sont moyenne, malgré que le contenu en composés phénoliques est assez important, cela est due généralement à la synergie entre les différents composés antioxydants existants.

II- Etude de l'activité antimicrobienne des espèces « *Centaurium erythraea* » et « *Blackstonia perfolita* »

II-1 Introduction

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques.

Dans ce contexte nous avons met en évidence le pouvoir antimicrobien des extraits ethanoiliques, chlorofomiques et acétoniques des deux plantes étudiées par la méthode d'aromatogramme, en procédant à des tests sur un panel de microorganismes d'origine connues, identifiés avec un numéro ATCC.

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes étudiées a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [95].

II-2 Protocol expérimental

Les teste d'activité antimicrobienne ont été réalisés au niveau de laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Blida.

❖ Principe de l'aromatogramme

La méthode utilisée est celle de l'aromatogramme (méthode de diffusion sur milieu gélosé), il s'agit d'un test réalisé en milieux solide dans une boîte Pétrie, pour la détermination de la sensibilité d'une bactérie aux substrats utilisés. Cette méthode consiste à déposer un disque stérile de 9mm de diamètre préalablement imprégné d'extraits sur une géloseensemencée avec l'inoculum microbienne. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a peu de croissance, indique la présence des molécules actives à l'égard du microorganisme testé (sensible), inversement, si les colonies se développent, le produit n'a pas d'activité antimicrobienne (résistant).

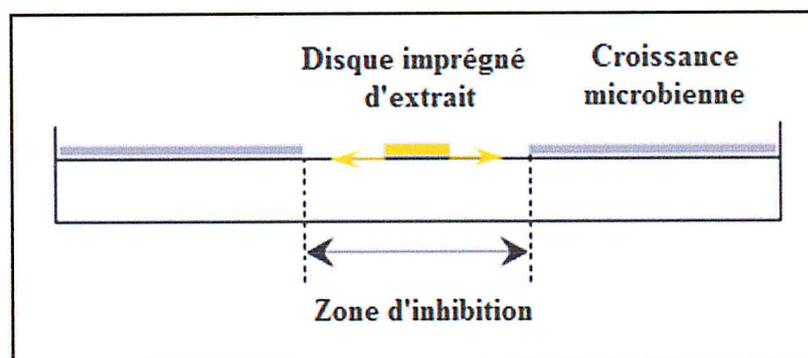


Figure 29 : Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion à partir d'un disque imprégné d'extrait

La sensibilité des microorganismes aux différents agents antimicrobiens est classée par les diamètres des halos d'inhibition représentée dans le tableau suivant :

Tableau 28: Pouvoir antibactérien en fonction du diamètre de la zone d'inhibition [96].

Diamètre	Sensibilité
$D > 30\text{mm}$	Très fortement inhibitrice
$21\text{mm} < D < 30\text{mm}$	Fortement inhibitrice
$16\text{mm} < D < 21\text{mm}$	Modérément inhibitrice
$11\text{mm} < D < 16\text{mm}$	Légèrement inhibitrice
$D < 11\text{mm}$	Non inhibitrice

II-2-1 Préparation des milieux de culture

Dans un bain Marie infuser les milieux gélosée : Mueller Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud (SAB) pour les levures et les champignons.

Couler les milieux dans des boîtes de pétri de 90mm avec une profondeur de 3 à 4mm.

Sécher les boîtes avant utilisation pendant 30mn à 32°C.

II-2-2 Préparation des dilutions des extraits de plantes étudiées

Les extraits de *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfolita* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO), pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 100 mg/ml.

II-2-3 Les souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance. Ces souches microbiennes utilisées dans notre étude sont de référence ATCC (American Type Culture Collection) (Tableau 29).

Tableau 29 : Microorganisme utilisées dans le présent travail

Souches	Symboles	Nature de souches	Gram	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	Bactéries	+	ATCC 6538
<i>Bacillus cerus</i>	BC		+	ATCC 14975
<i>Micrococcus luteus</i>	ML		+	LB 14110
<i>Listeria monocytogenes</i>	List		+	ATCC 49594
<i>Agrobacterium rumefaciens</i>	AR		-	ATCC 23308
<i>Salmonella enterica</i>	Sal		-	CIP 80.39
<i>Escherichia coli</i>	EC		-	ATCC 43300
<i>Pseudomonas aeogenosa</i>	PA		-	ATCC 9027
<i>Klebsiella pneumoniae BLSE</i>	Klb		-	hospitalizes
<i>Proteus vulgaris</i>	PV		-	hospitalizes
<i>Citrobacter freundii</i>	Cf		-	hospitalizes
<i>Candida albicans</i>	CA	Levure (Non filamenteux)	/	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cervisiae</i>	SS		/	ATCC 9763
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Asp	moisissures (Filamenteux)	/	ATCC 16404

II-2-4 Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

II-2-5 Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

II-2-6 Incubation

Les boîtes Pétri sont incubées pendant 24h à 37 °C pour les bactéries et 72h à 28 °C pour les levures et les moisissures.

II-2-7 Lecture des antibiogrammes

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour de chaque disque à l'aide d'une règle en mm sur le fond de la boîte fermée.

II-3 Détermination des CMI

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 100 à 5 mg/ml pour les extraits, en effet de chaque dilution on refait les mêmes opérations.

II-4 Résultats et discussion

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de *Centaurium erythraea* et de *Blackstonia perfolita* sur les souches de références par mesure de diamètre d'inhibition de la croissance des microorganismes sont donnés dans les tableaux 30 et 32.

Tableau 30: les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aux différentes souches bactériennes

Souches bactériennes	<i>Centaurium erythrae</i>			<i>Blackstonia perfolita</i>			Atibiotique
	<i>Ce_E</i>	<i>Ce_C</i>	<i>Ce_A</i>	<i>Bp_E</i>	<i>Bp_C</i>	<i>Bp_A</i>	Cp
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	12	12	11	34	13	30	36
<i>Bacillus cerus</i> (BC)	12	14	10	11	15	R	37
<i>Micrococcus luteus</i> (ML)	R	R	R	R	R	R	DNM
<i>Listeria monocytogenes</i> (List)	11	R	10	25	11	32	DNM
<i>Agrobacterium rumefaciens</i> (AR)	15	10	14	11	14	15	DNM
<i>Salmonella enteric</i> (Sal)	R	R	R	11	R	R	DNM
<i>Escherichia coli</i> (EC)	11	11	R	10	11	R	31
<i>Pseudomonas aeogenosa</i> (PA)	11	10	R	13	10	R	44
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE (Klb)	R	10	11	12	R	12	DNM
<i>Proteus vulgaris</i> (PV)	R	10	10	10	R	R	DNM
<i>Citrobacter freundii</i> (Cf)	11	19	10	15	29	10	DNM

DNM : Diamètre Non Mesurée

[Ciprofloxacin =Cp]

A l'aide des résultats mentionnés dans le tableau 30, on a put tracer les histogrammes

Suivant:

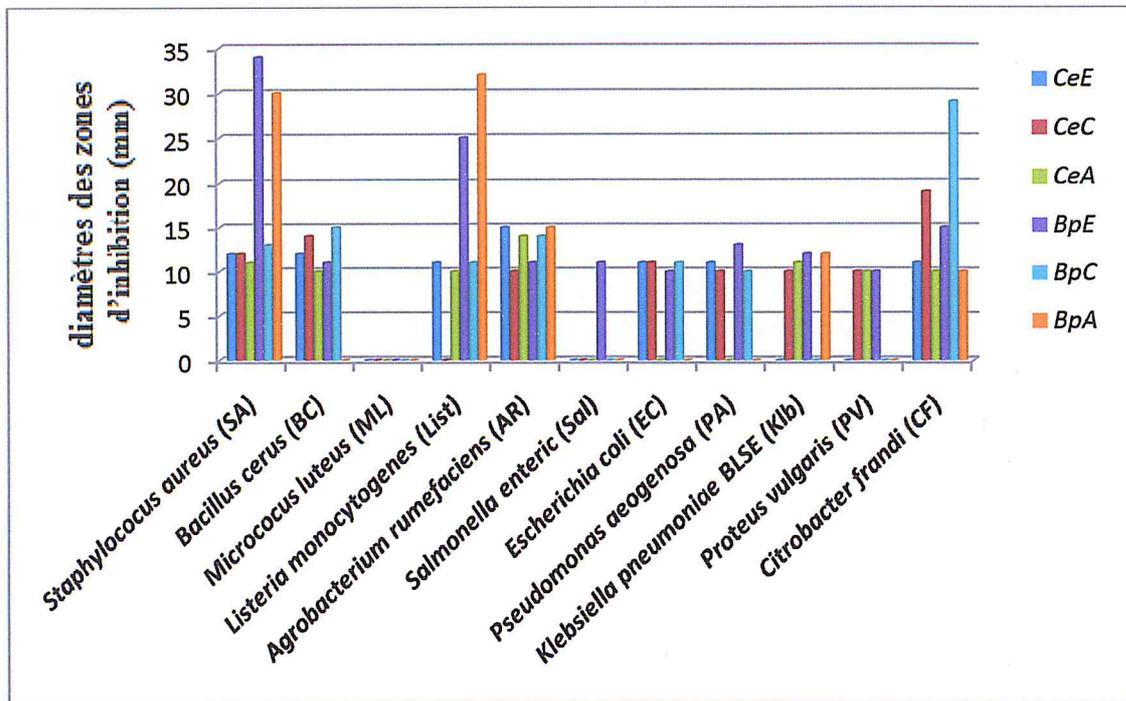


Figure 30 : Les diamètres des zones d'inhibition des extraits relatives aux différentes souches bactériennes.

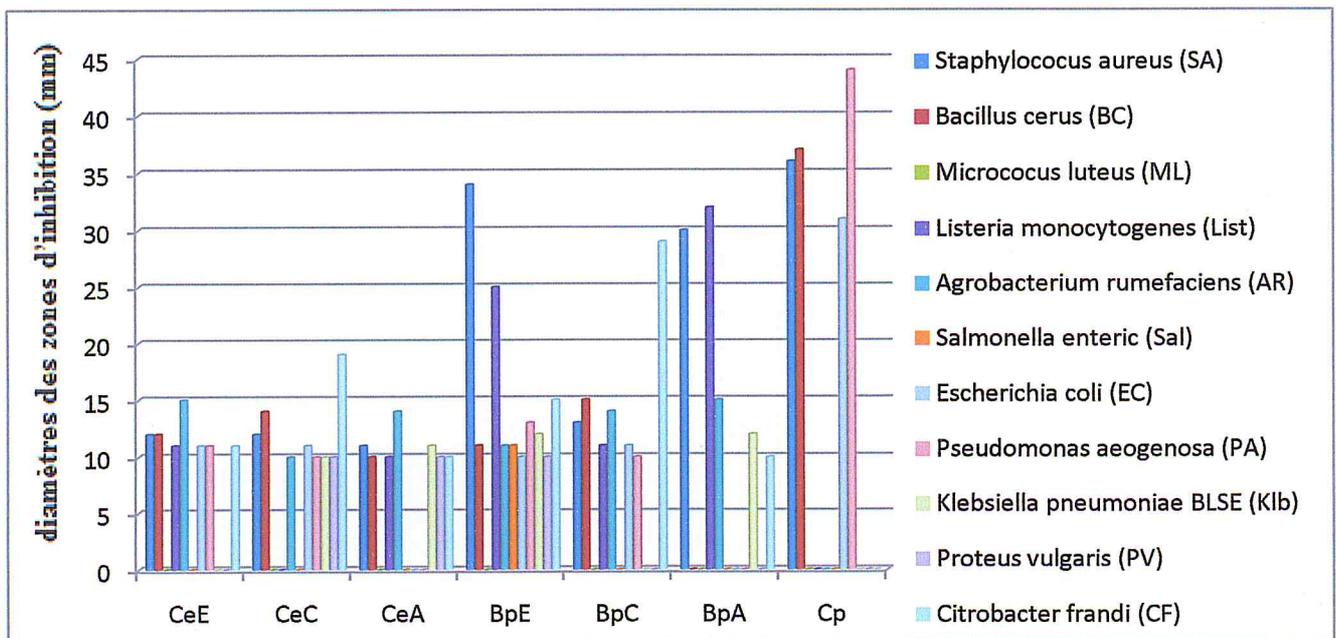


Figure 31: Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et de l'antibiotique (Cp) relatives aux différentes souches bactériennes.

Après 24h d'incubation à 37°C nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

On peut constater d'après les résultats représentés dans le tableau 30 que le diamètre d'inhibition le plus élevé pour l'extrait chloroformique de *Centaurium erythrae* et de *Blackstonia perfolita* est vis-à-vis la souche *Citrobacter freundii*.

Les extraits éthanolique et acétonique de *Blackstonia perfolita* ont le diamètre d'inhibition le plus élevé 34 et 30 respectivement vis-à-vis *Staphylococcus aureus*. Ces diamètres sont très proches de l'antibiotique de référence Ciprofloxacine (Cp) (diamètre d'inhibition égale 36mm).

Les résultats de l'activité antibactérienne ont révélé l'inefficacité de tous les extraits contre *Micrococcus luteus*.

A l'exception de l'extrait chloroformique de *Centaurium erythrae* la souche *Listeria monocytogenes* a manifesté une sensibilité vis-à-vis tous les extraits, cette effet est plus important pour les extraits éthanolique et acétonique de *Blackstonia perfolita*, avec un diamètre d'inhibition de 25 et 32 mm respectivement.

Les autres souches bactériennes ont montrés une activité antibactérienne moyenne avec une zone d'inhibition de 10 à 15 mm.

La CMI a été déterminée pour les souches bactériennes les plus sensibles, pour chaque des extraits Bp_C , Bp_E , Bp_A et Ce_C .

Tableau 31 : la CMI (mg/ml) des extraits pour les souches bactériennes les plus sensibles

	Ce_C	Bp_C	Bp_E	Bp_A
<i>Staphylococcus aureus (SA)</i>	CNM	CNM	10	10
<i>Listeria monocytogenes (List)</i>	CNM	CNM	50	10
<i>Citrobacter frandi (CF)</i>	50	25	CNM	CNM

CNM : (Concentration Non Mesurée)

D'après les résultats représentés dans le tableau 31 on peut noter que les extraits éthanolique et acétonique de *Blackstonia perfolita* présents les CMI les plus faibles pour la souche *Staphylococcus aureus*.

Ce résultat est en accord avec la littérature, dont il a été démontré que l'espèce *Centaurium erythrae* est active contre *Staphylococcus aureus*.

D'après la littérature l'activité antibactérienne a pu être observée pour swertiamarin et sweroside (secoiridoides), ces deux composés ont inhibé la croissance de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* et d'*Escherichia coli* [57].

Dans une autre étude, l'activité anti-microbienne pour *C. erythraea* a été trouvée être dépendante du solvant d'extraction utilisé: l'extrait éthanolique a montré des zones d'inhibition contre *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, l'extrait d'hexane a montré des zones d'inhibition contre *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* et l'extrait du n-butanol a montré des zones d'inhibition contre *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* et *A. actinomycetecomitans* [97].

Tableau 32: les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aux différentes souches fongiques

Souches fongiques	<i>Centaurium erythraea</i>			<i>Blackstonia perfolita</i>			Atifongiques	
	Ce _E	Ce _C	Ce _A	Bp _E	Bp _C	Bp _A	Mr	ApB
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (Asp)	R	R	R	R	R	R	13	17
<i>Candida albicans</i> (CA)	15	R	R	12	12	15	0	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SS)	12	11	10	13	14	14	DNM	DNM

DNM : Diamètre Non Mesurée

A l'aide des résultats mentionnés dans le tableau 32, on a pu tracer les histogrammes Suivant:

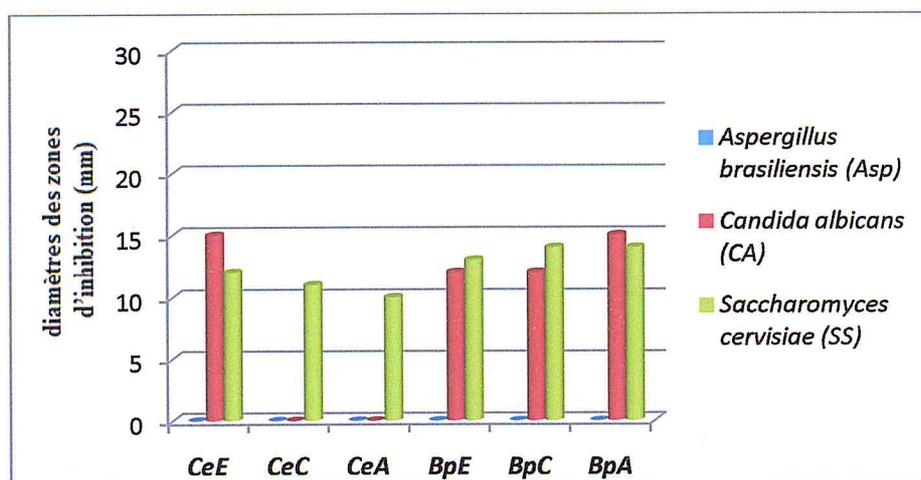


Figure 32 : Les diamètres des zones d'inhibition des extraits relatives aux différentes souches fongiques.

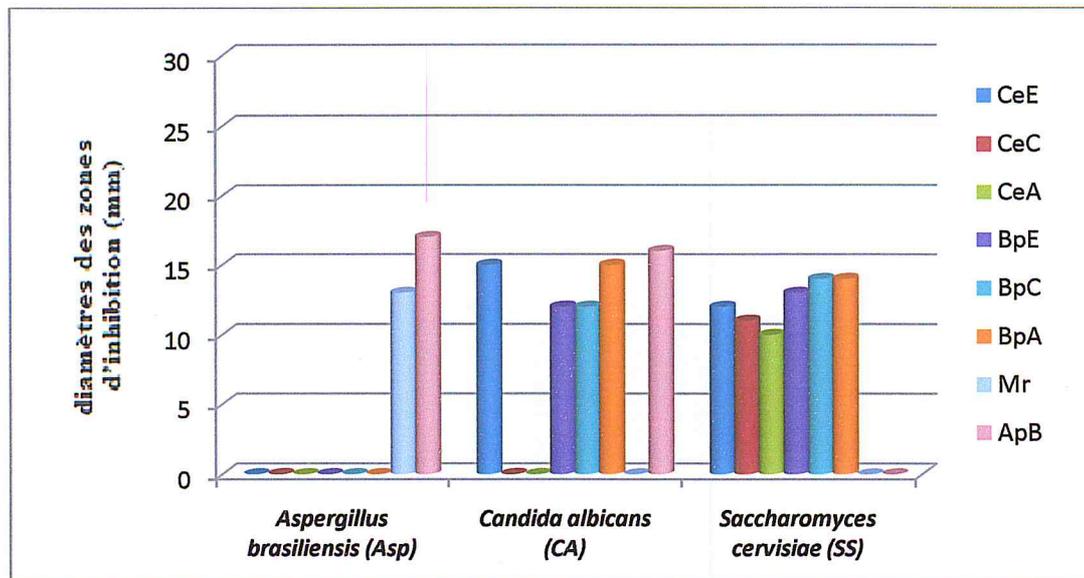


Figure 33: Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et des antifongiques (Mr et ApB) relatives aux différentes souches fongiques.

Après 72 d'incubation à 28°C, nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

D'après les résultats représentés dans le tableau 32, on peut constater que les extraits étudiés pour les deux plantes sont légèrement sensible vis-à-vis *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

L'*Aspergillus brasiliensis* montre une résistance pour tous les extraits étudiés des deux plantes *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfolita* (absence totale de zone d'inhibition).

En conclusion, Selon les résultats représentés dans les tableaux 30 et 32, tous les extraits ont présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram négatives, à savoir : *Citrobacter freundii* et *Agrobacterium rumefaciens*, tandis que les bactéries à Grams positives *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* ont une activité antibactérienne très importante mais la bactérie *Micrococcus luteus* n'a présenté aucune activité antibactérienne.

Par ailleurs, tous les extraits ont montré une résistance vis-à-vis la souche fongique *Aspergillus Braziliensis*.

Les autres souches microbiennes ont montrés une activité antimicrobienne moyenne avec une zone d'inhibition de 10 à 15 mm.

Conclusion générale

Conclusion générale

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce accroissement d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inexhaustible de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du nécessité de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires.

La présente étude a porté sur l'étude chimique et biologique des extraits bruts de *Centaurium erythraea* et *Blackstonia perfolita* deux plantes appartenant à la même famille Gentianaceae, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne. De différents aspects ont été étudiés.

Le screening phytochimique a montré la présence de nombreuses familles de substances chimiques : flavonoïdes, stérols, terpènes, triterpènes et phénols.

Le dosage des polyphénols est effectué pour mesurer la teneur en polyphénols totaux dans les extraits méthanliques et éthanolique des deux plantes étudiées.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage de radical libre DPPH des extraits hydrométhanoliques, méthanoliques et acétoniques des espèces étudiées a montré que ces extraits possèdent un pouvoir antioxydant.

L'activité antimicrobienne des extraits éthanolique, chlorofomique et acétonique des deux plantes étudiées par la méthode de l'antibiogramme (diffusion sur disque) a été déterminée en utilisant un panel de microorganismes comprenant 11 bactéries, deux levures et une moisissure.

Les résultats ont montré que tous les extraits ont présentés une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram négatives, à savoir : *Citrobacter freundii* et *Agrobacterium rumefaciens*, tandis que les bactéries à Grams positives *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* ont une activité antibactérienne très importante, mais la bactérie *Micrococcus luteus* n'a présenté aucune activité antibactérienne.

Par ailleurs, tous les extraits ont montré une résistance vis-à-vis la souche fongique *Aspergillus Braziliensis*.

Les autres souches microbiennes ont montrés une activité antimicrobienne moyenne.

Les performances antibactérienne et antifongique mises en évidence ainsi que d'autres activités biologiques méritent d'être étudiées avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application plus larges de ces extraits avec une recherche plus poussée de ses principes actifs.

Références bibliographiques

- [1] Jensen S.R., and Schripsema J.; 2002; Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae; Gentianaceae – Systematics and Natural History; Editor, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.573–631.
- [2] Heywood V. H. ; 2006 ; Les plantes à fleurs, 306 familles de la flore mondiale ; Nathan ; Paris ; 335 p.
- [3] Ghosal S., Biswas K.; 1979; Description of Gentianaceae; Part XXVI; Phytochemistry 18: 1029-1031.
- [4] Corneliuson J.; 2007; Växternas namn - Vetenskapliga växtnamns etymology. Wahlström & Widstrand, Stockholm.
- [5] Basnet P., Kadota S., Shimizu M., Namba T.; 1994; Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent induced diabetic rats from *Anthocleista djalonensis*; Planta Medica 60: 507-511.
- [6] Bruneton J. ; 1999 ; Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ; 3ème édition. Technique & Documentation ; Paris ;France ; 1120 p.
- [7] Fabris H. A.; 1955 ; Nuevas especies de " *Gentianella* " del Peru ; Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica ; 6: 45-50.
- [8] Hiermann A., Schantl D. ; 1998; Action of central system nervous of *Gentiana lutea*; Planta Medica; 64: 400-403.
- [9] El Hilaly J. and Lyoussi B.; 2002; Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats; J Ethnopharmacol; 80: 109–113.
- [10] Ioset J. R., Marston A., Gupta M. P., Hostettmann K.; 1998; Antimicrobial activity ;*Centaurium muehlenbergii*; Pharmaceutical Biology; 36: 103-106.
- [11] Struwe. L., Kadereit. J.W., Klackenberg. J., Nilsson. S., Thiv. M., von Hagen. K.B., Albert. V.A.; 2002; Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification; Gentianaceae – Systematics and Natural

Références bibliographiques

History, Editor,: L. Struwe and V.A. Albert, Cambridge University Press, Cambridge, UK., pp.21–309.

[12] Richardson P. M.; 2003; C-Glycosylxanthenes in the fern genera *Davallia*; *Humata*; and *Nephrolepis*; *Phytochemistry* ; pp 22: 309-311.

[13] Imperato F.; 2001; Xanthone 2,4-di-C-glycosides from *Asplenium adiantum-nigrum*; *Phytochemistry*; pp 30: 3839-3840.

[14] Mandal S., Das P. C., Joshi P. C.; 2002; Naturally occurring xanthenes from terrestrial flora; *Journal of the Indian Chemical Society*; pp 69: 611-636.

[15] Vieira L. M. M., Kijjoa A.; 2005; Naturally-occurring xanthenes: Recent developments; *Current Medicinal Chemistry*; pp 12: 2413-2446.

[16] Ondeyka J.G., Dombrowski A.W., Polishook J.P., Felcetto T., Shoop Wesley L.; 2006; Isolation and insecticidal / anthelmintic activity of xanthonol, a novel bis-xanthone, from a non-sporulating fungal species; *The Journal of antibiotics*; pp 59: 288-292.

[17] Pornpakakul S., Liangsakul J., Ngamrojanavanich N., Roengsumran S., Sihanonth P., Piapukiew J., Sangvichien E. et al.; 2006; Cytotoxic activity of four xanthenes from *Emericella varicolor* ; an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*; *Archives of Pharmacal Research*; pp 29: 140-144.

[18] Santesson J.; 1999; Chemical studies on lichens; XX. Xanthenes of some crustaceous lichens; *Arkiv foer Kemi* pp 31: 57-64.

[19] Elix J. A., Chappell H. M., Jiang H.; 2001 ; Four new lichen xanthenes; *Bryologist*; pp 94: 304- 307.

[20] Elix J. A., Robertson F., Wardlaw J. H., Willis A.C.; 2004; Isolation and structure determination of demethylchodatin; a new lichen xanthone; *Australian Journal of Chemistry*; pp 47: 2291-2295.

[21] Rezanka T., Jachymova J., Dembitsky V. M.; 2003; Prenylated xanthone glucosides from Ural's lichen *Umbilicaria proboscidea*; *Phytochemistry*; pp 62: 607-612.

Références bibliographiques

- [22] Beerhues L., Barillas W., Peters S., Schmidt W.; 2000; Biosynthesis of plant xanthenes; Bioorganic Chemistry-Highlights and New Aspects; Diederichsen U., Lindhorst T. K., Westermann B., Wessjohann L., Editor; pp 322-328.
- [23] Wang C.-Z., Maier U. H., Keil M., Zenk M. H., Bacher A., Rohdich F., Eisenreich W.; 2003; Phenylalanine-independent biosynthesis of 1,3,5,8-tetrahydroxyxanthone; A retrobiosynthetic NMR study with root cultures of *Swertia chirata*; European Journal of Biochemistry; pp 270: 2950-2958.
- [24] Jung H.A., Su B.N., Keller W. J., Mehta R. G., Kinghorn A.D.; 2006; Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (mangosteen); Journal of Agricultural and Food Chemistry; pp54: 2077-2082.
- [25] Park K. H., Park Y. D., Han J.M., Im K.R., Lee B.W., Jeong I.Y., Jeong T.S. et al.; 2006; Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*; Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters; pp 16: 5580-5583.
- [26] Jiang D.J., Dai Z., Li Y.J.; 2004; Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents; Cardiovascular Drug Reviews; pp 22: 91-102.
- [27] Lee B. W., Lee J. H., Lee S.T., Lee H. S., Lee W. S., Jeong T.S., Park K. H.; 2005; Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata* ; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; pp 15: 5548-5552.
- [28] Basnet P., Kadota S., Shimizu M., Namba T.; 2004; Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*; Planta Medica; pp 60: 507-511.
- [29] Gopalakrishnan G., Banumathi B., Suresh G.; 2007; Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives; Journal of Natural Products; pp 60: 519-524.
- [30] Ioset J. R., Marston A., Gupta M. P., Hostettmann K. 2008. Antifungal xanthenes from roots of *Marila laxiflora* . Pharmaceutical Biology 36: 103-106.
- [31] Rodriguez S., Marston A., Wolfender J. L., Hostettmann K.; 2008; Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae; Current Organic Chemistry; pp 2: 627-648.

Références bibliographiques

- [32] Ghisalberti E. L.; 2008; Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids; *Phytomedicine*; pp 5: 157-173.
- [33] Ozturk N., Korkmaz S., Ozturk Y., Baser K. H. C.; 2006; Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea ssp. symphyandra*); on cultured chicken embryonic fibroblasts; *Planta Medica*; pp 72: 289-294.
- [34] Ozturk N., Baser K. H. C., Aydin S., Ozturk Y., Calis I.; 2002; Effects of *Gentiana lutea ssp. symphyandra* on the central nervous system in mice; *Phytotherapy Research*; pp 16: 627- 631.
- [35] Bhattacharya S. K., Reddy P. K. S. P., Ghosal S., Singh A. K., Sharma P. V.; 1996; Chemical constituents of Gentianaceae; XIX; CNS-depressant effects of swertiamarin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; pp 65: 1547-1549.
- [36] Kondo Y., Takano F., Hojo H.; 2004; Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice; *Planta Medica*; pp 60: 414-416.
- [37] Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P. J., Jaspars M., Sarker S. D.; 2003; Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea* ; *Phytomedicine*; pp; 10: 344-347.
- [38] Hostettmann-Kaldas M., Jacot-Guillarmod A.; 1978; Contribution to the phytochemistry of the genus *Gentiana*; XXIII; Xanthonés and flavone C-glucosides of the genus *Gentiana* (*subgenus Gentianella*); *Phytochemistry*; pp 17: 2083-2086.
- [39] Hostettmann-K.M., Hostettmann K., Sticher O.; 1981; Xanthonés, flavones and secoiridoids of American *Gentiana* species; *Phytochemistry*; pp 20: 443-446.
- [40] Chulia A. J., Vercauteren J., Mariotte A.M.; 1996; Iridoids and flavones from *Gentiana depressa*; *Phytochemistry*; pp 42: 139-143.
- [41] Kuepeli E., Aslan M., Guerbuez I., Yesilada E.; 2004; Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin; *Zeitschrift fuer Naturforschung*; pp C 59: 787-790.
- [42] Tunalier Z., Ko şar M., Küpeli E., ali Ő Đ., H sn  Can Ba Őer K.; 2007; Antioxidant, anti- inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts; *Journal of Ethnopharmacology*; pp 110: 539-547.

Références bibliographiques

- [43] Yesilada E., Küpeli E.; 2007; *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects; *Journal of Ethnopharmacology*; pp 110: 504-515.
- [44] Cheng G., Bai Y., Zhao Y., Tao J., Liu Y., Tu G., Ma L. et al.; 2000 ; Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*; *Tetrahedron*; pp 56: 8915-8920.
- [45] Sezik E., Aslan M., Yesilada E., Ito S.; 2005; Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay- directed fractionation techniques; *Life Sciences*; pp 76: 1223-1238.
- [46] Jensen S. R., Schripsema J.; 2002; Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae; *Gentianaceae - Systematics and Natural History*; Struwe L., Albert V., editor; Cambridge: Cambridge University Press; pp 573-631.
- [47] Myers, J.H., et D. Bazely.; 2003 ; *Ecology and Control of Introduced Plants*; Cambridge University Press; Cambridge.
- [48] Khafagy, S.M., et H.K. Mnajed.; 2002 ; Phytochemical investigation of *Centaurium erythraea*, *Acta Pharmaceutica Suecica*; pp 7(6):667-672.
- [49] Newall. C.A., Anderson. L.A and Phillipson. J.D.; 1996; *Herbal Medicines; A Guide For Health-Care Professionals*; The Pharmaceutical Press, London, UK; p 67.
- [50] Berkan, T., L. Ustunes, F. Lermioglu et A. Ozer. ; 1991 ; Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Centaurium erythraea*; *Planta Medica*; pp 57:34-3
- [51] Essawi T, Srour M.; 2000; Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity; *Journal Of Ethnopharmacology*; pp 70: 343-349.
- [52] Tunalier Z., Ko şar M., Küpeli E., Çali ş Đ., Hüsnü Can Ba şer K.; 2007; Antioxidant, anti- inflammatory, anti-nociceptive, diurétique activities and composition of *Centaurium erythraea* extracts; *Journal of Ethnopharmacology*; pp 110: 539-547.
- [53] Gopalakrishnan G., Banumathi B., Suresh G.; 1997; Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives; *Journal of Natural Products*; pp 60: 519-524

Références bibliographiques

- [54] Yesilada E., Küpeli E.; 2007; *Centaurium erythraea*. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, hépatoprotectrice , insecticide and antipyretic effects; Journal of Ethnopharmacology; pp 110: 504-515.
- [55] Hamza N., Berke B., Cheze C., Agli A.N., Robinson P., Gin H. and Moore N.; 2010; Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. J Ethnopharmacol; pp 128: 513–518.
- [56] Ross. S. A., El-Shanawany. A., Mohamed. G. A., Nafady. A. M., Ibrahim. S. R and Radwan. M. M.; 2011; Isolation of xanthenes and méthylxanthenes from *Centaurium spicatum* (Gentianaceae) ; Planta Med ; P 43
- [57] Kumarasamy. Y., Nahar. L. and Sarker. S. D.; 2003; Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*; Fitoterapia; pp 74 , 151-154.
- [58] van der Sluis. W. G and Labadie. R. P.; 1981; Swéroside and swertiamarine in the genus *Centaurium*, Planta Med; pp41 , 221-231.
- [59] Kumarasamy. Y., Nahar. L., Cox. P. J., Jaspars. M. and Sarker. S. D.; 2003; Bioactivity of secoiridoid glycosides; gentioflavoside from *Centaurium erythraea* ; Phytomed; pp 10 , 344-347.
- [60] Van der Sluis. W. G and Labadie. R. P.; 1981; Fungitoxic activity of the centapicrin and déacétylcentapicrin in the genus *Centaurium* Planta Med; pp 42 139-140.
- [61] Ghosal S., Sharma P. V., Chaudhuri R. K.; 1975; Secologanin and Loganic acide of *Centaurium erythraea* ; Phytochemistry ; pp14: 1393-1396.
- [62] Fotie J., Bohle D. S.; 2006; Pharmacological and biological activities of Centauroside; Anti- Infective Agents in Medicinal Chemistry; pp 5: 15-31.
- [63] Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U.; 2006; Biosynthesis of coumarins in plants ; Phytochemistry Reviews; pp 5: 293-308.
- [64] Hiermann A., Schantl D., Schubert-Zsilavec M., Reiner J.; 1996; acids phenolics and phytostérols from *Centaurium erythraea*. Phytochemistry ; pp 43: 881-883.

Références bibliographiques

- [65] Kaldas M. ; 1977 ; Identification de trois alcaloïdes dans *Gentiana campestris* L., *Centaurium erythraea*. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel ; 130 p.
- [66] Tutin, T. G. Gentianales, C. X. L. Gentianaceae, 3. *Blackstonia* Hudson. 1972 ; Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Moore, D. A.; Valentin, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A., eds. *Flora Europea*, vol. 3. Cambridge: Cambridge University Press; 53 p.
- [67] Zeltner, L.; 1970; Recherches de biosystematique sur le genre *Blackstonia* Huds, et *Centaurium Hill* ; Bull. Soc; Neuchatel ; Sci. Nat. 93:4–164;.
- [68] Jovanovic 'Dunjić', R. Fm.Gentianaceae. In: Josifovic, M., ed. *Flora SR Srbije*, vol.5.Belgrade:SrpskaAkademijaNaukaiUmetnosti;1973:406–407.
- [69] Weiss, R. F.; 1991; *Herbal medicine*, 6th Beaconsfield: Beaconsfield Publishers; 37–42.
- [70] Steinegger, E.; Hansel, R.; 1988; *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer; 596–599.
- [71] Skrzypczak, L.; Wesolowska, M.; Krupinska, A.; Thiem, B.; 1992; In vitro cultures of *Blackstonia perfoliata* (L.) Hudson and an assay of the secoiridoid content; *Acta Soc; Bot;Pol*; pp 61:359–368.
- [72] Van Der Sluis, W. G.; 1985; Chemotaxonomical investigations of the genera *Blackstonia* and *Centaurium* (Gentianaceae); *Plant Syst; Evol*; pp 149:253–286.
- [73] Krstić, D.; Janković, T.; Savikin-Fodulović, K.; Menković, N.; Grubišić, D.; 2003; Secoiridoids and xanthenes in the shoots and roots of *Centaurium pulchellum*; cultured in vitro; *In Vitro Cell; Dev. Biol; Plant*; pp 39:203–207.
- [74] Hegnauer, R.; 1966; *Chemotaxonomie der Pflanzen* ; Basel-Stuttgart: Briskhauser; 182 p.
- [75] Kaouadji, M.; 1990; Flavonol diglycosides from *Blackstonia perfoliata*; *Phytochemistry*; pp 29:1345–1347.
- [76] Kaouadji, M.; Doucoure, A.; Maritotte, A. M.; Chulla, A. J.; Tomasson, F.; 1990 ; Flavonol triglycerides from *Blackstonia perfoliata* ; *Phytochemistry* ; pp 29:1283–1286.

Références bibliographiques

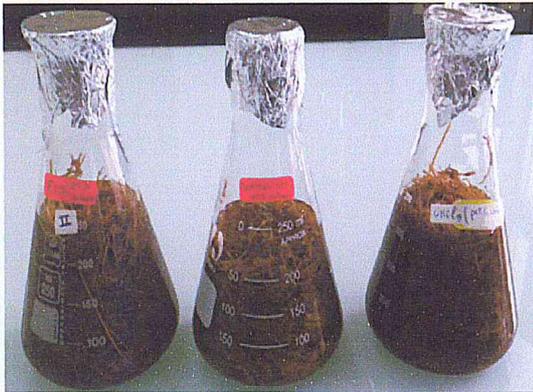
- [77] Hellal. Z.; 2010 ; contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydantes de certaines extraites des citrus ; application sur la sardine (*sardina pilchardus*) ; université Mouloud mammeri de tizi-ouzou.
- [78] kabera Nzeyumwami. J.; 2004 ; caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : *Hptis spicigera* *pluchea ovalis* et *laggera auritmémoire* en biologie et médecine ; université de Lome-togo.
- [79] Gaignautl. J.C, Bidet. D., Gaillard. M., Perronnet. J.; 1997 ; Stérols et steroïds ; paris ; Ellipses ; pp 11-31.
- [80] Paolini. V., Dorchies. P., Hoste. H. ; 2003 ; Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre, Ed Alter ; Agri ; pp 17-19.
- [81] Bruneton. J. ; 2009 ; Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales ; Editor Lavoisier ; Paris of flavonoids ; pp 273-277, 366-377, 502-506.
- [82] Hamimed. S. ; 2009 ; Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum L* ; université Mentouri Constantine.
- [83] Kansole. M.M.R.. ; 2009 ; Etude ethnobotanique ; phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth* ; Burkina Faso.
- [84] Markham, H.M., Beecher, G.R.; 2000; Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones; J. Chromatography A; pp 897: 177- 184.
- [85] Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., Chen, F.; 2006; A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay; Food Chem; pp 97: 705-711.
- [86] Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S.; 2006; Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) ; Lebanese Science Journal ; pp 7(1): 3-8.
- [87] Antolovich. M., Prenzler. P.D., Patsalides. E., Donald. M.C., Robards. S.K. ; 2002; Methods for testing antioxidant activity; J.Analyst; pp 183-198.
- [88] Samarth. R.M. , Panwar. M., Soni A, Kumar. M., Kumar A.; 2008; Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract; Food Chemistry; pp 106,868-873.
- [89] Bozin. B, Mimica-Dukic. N., Samojlik. I., Goran. A, Igetic R. ; 2008 ; Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L.*, Alliaceae); Food Chemistry; pp 111, 925–929.

Références bibliographiques

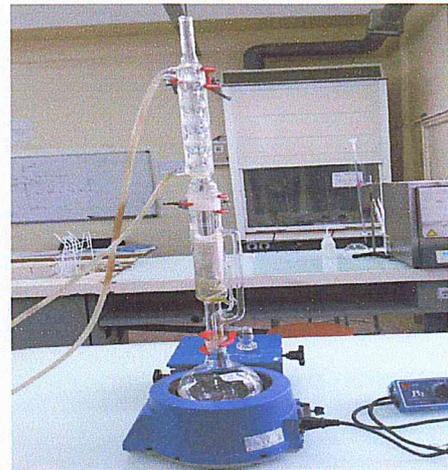
- [90] Tepe. B., Daferera. D., Tepe. A.S., Polissiou. M., Sokmen. A. ; 2009; Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor; From Turkey; Food Chemistry; pp 103,1358–1364.
- [91] Šiler. B., Avramov. S., Banjanac. T., Cvetković. J., Nestorovi. ć J. Živkovi ć, Patenkovi ć A. and Miši ć D.; 2012; Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaureum erythraea Rafn* from the Balkan Peninsula; Ind; Crops; Prod; pp 40 , 336-344.
- [92] Agbor, G.A., Kuate, D., Oben, J.E., 2007. Medicinal plants can be good source of antioxidants: case study in Cameroon. Pakistan Journal of Biological Sciences ; pp 10, 537-544.
- [93] Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M., Poljakovic, M., 2009; The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. European Journal of Scientific Research; pp 28 (3), 471-477.
- [94] Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2007; In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange; Food; Chem ; pp 101, 410–418.
- [95] Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C.; 2007; Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*; depending on location and seasonal variations; Food Chem; pp 100: 553- 559.
- [96] Mutai. C., Vagias. C., Abatis. D., Rouissis.V.; 2009; “ Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extract and lupine triterpenes” ;Ethnopharmacol. J; pp 10 1016-1050.
- [97] Schimmer, O. et Mauthner, H. ; 1996 ; Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaureum erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhmuri*um. Planta Med; pp 62(6) :561-4.

Annexe 1 :

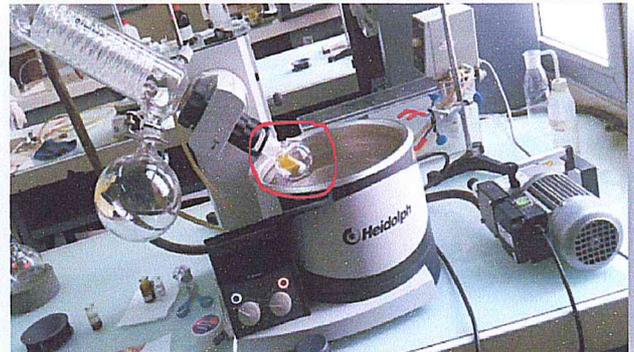
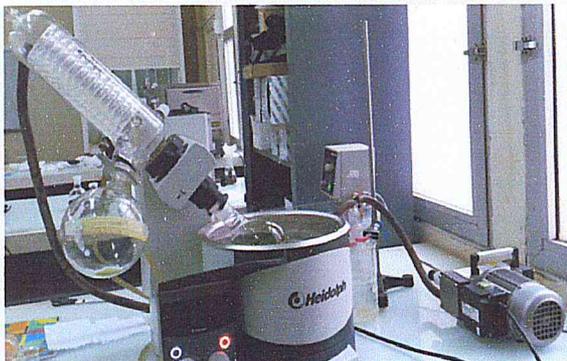
- Macération de la MV



-Extraction par soxhlet



-Evaporateur rotatif



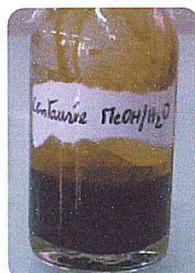
-Extraits obtenus par Macération



Extr Ce_C



Extr Ce_E



Extr Ce_{HM}



Extr Bp_C



Extr Bp_E

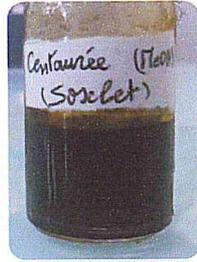


ExtBp_{HM}

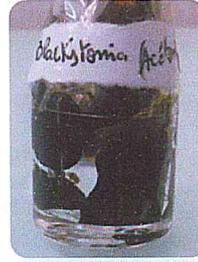
-Extraits obtenu par extraction par soxhlet



Extr Ce_A



Extr Ce_M



Extr Bp_A

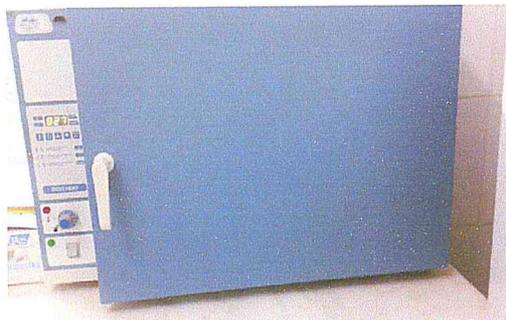


Extr Bp_M

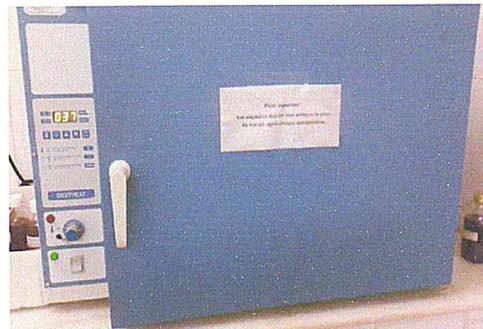
-Solution des extraits préparés à différents concentration, pour étudiée l'activité antioxydante



Annexe 2 :



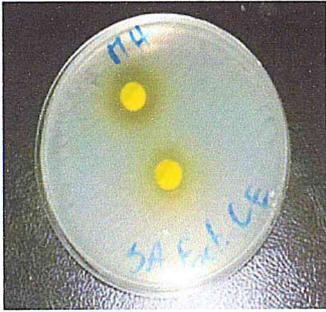
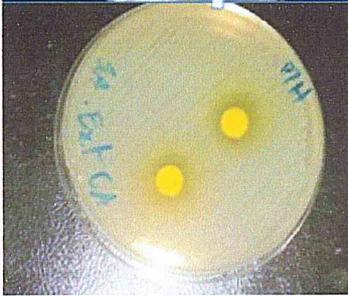
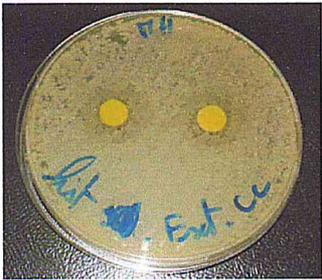
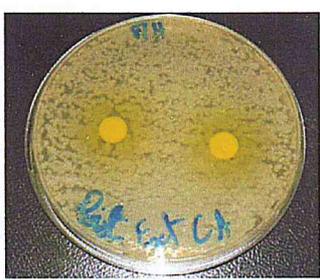
-Incubateur statistique à 27°C
Pour les souches bactériennes

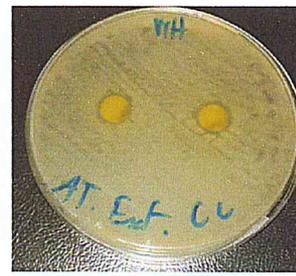
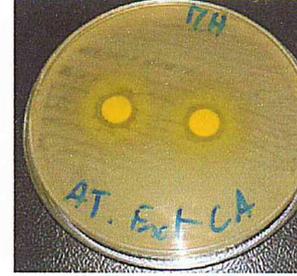
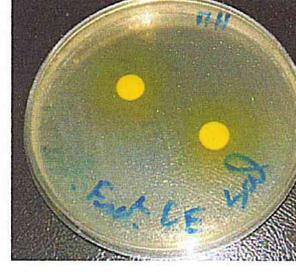
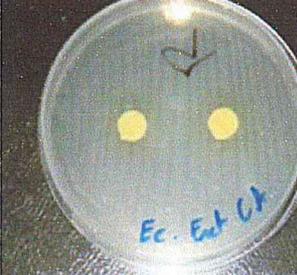
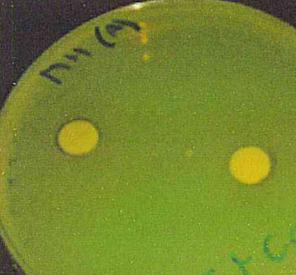
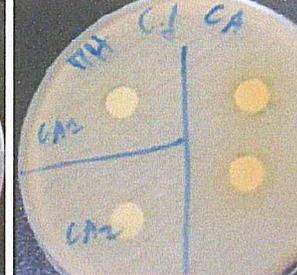


-Incubateur statistique à 27°C
pour les souches fongiques

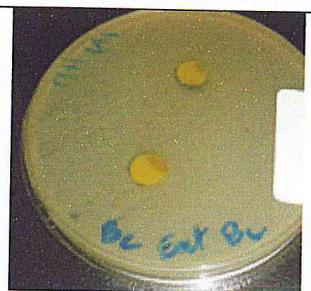
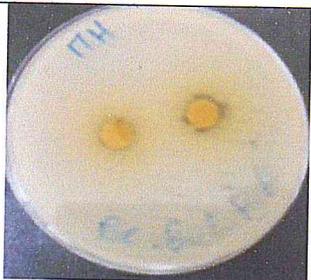
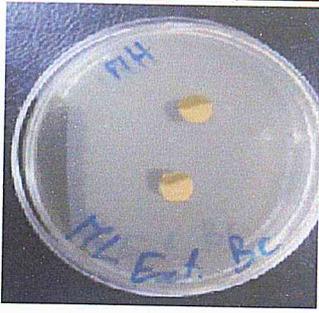
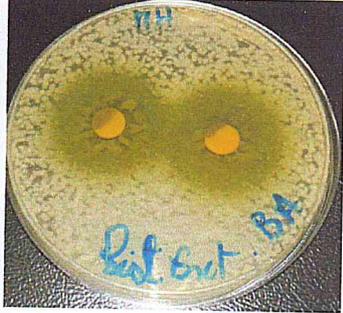
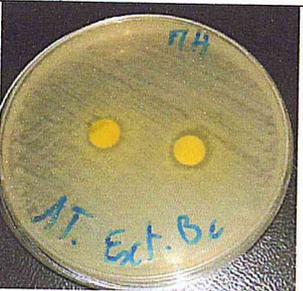
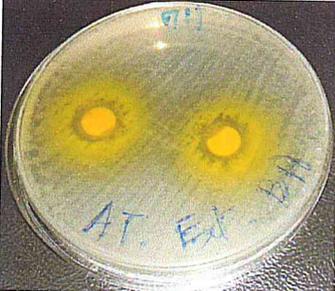
*Les photographies des résultats obtenus sur les boîtes de Pétri de l'activité antibactérienne des extraits testée sur les bactéries.

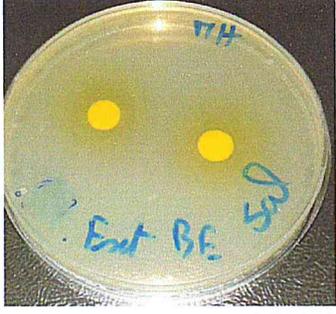
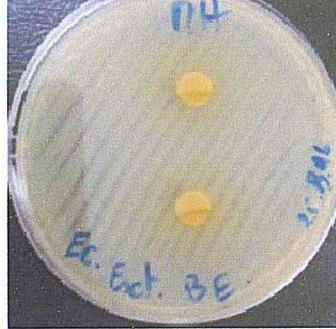
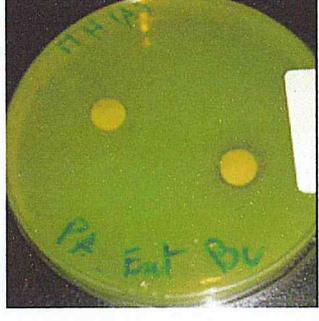
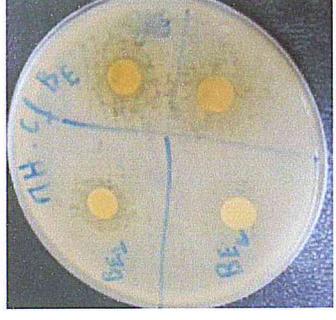
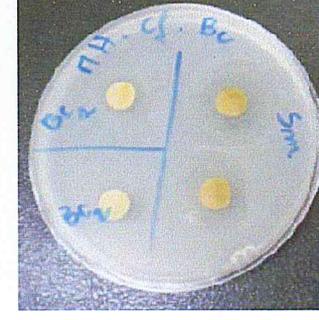
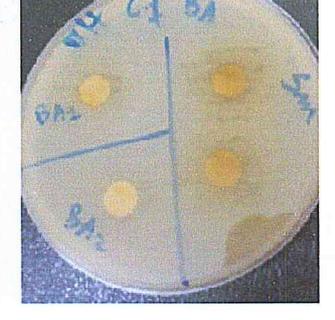
-Les extraits de *Centaurium erythraea*

Souches bactériennes	<i>Centaurium erythraea</i>		
	Ce _E	Ce _C	Ce _A
SA			
BC			
ML			
List			

<p><i>AR</i></p>	 <p>Handwritten: AT. Ext. VE</p>	 <p>Handwritten: AT. Ext. CU</p>	 <p>Handwritten: AT. Ext. CA</p>
<p><i>Sal</i></p>	 <p>Handwritten: Ext. VE</p>	 <p>Handwritten: Ext. CU</p>	 <p>Handwritten: Ext. CA</p>
<p><i>EC</i></p>	 <p>Handwritten: Ext. VE</p>	 <p>Handwritten: Ext. CU</p>	 <p>Handwritten: Ec. Ext. CA</p>
<p><i>PA</i></p>	 <p>Handwritten: PA Ext. VE</p>	 <p>Handwritten: PA Ext. CU</p>	 <p>Handwritten: PA Ext. CA</p>
<p><i>Cf</i></p>	 <p>Handwritten: Ext. VE</p>	 <p>Handwritten: Ext. CU</p>	 <p>Handwritten: Ext. CA</p>

-Les extraits de *Blackstonia perfolita*

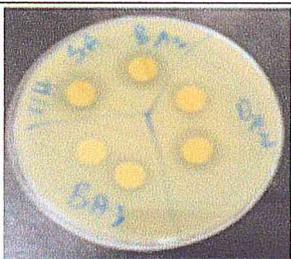
Souches bactériennes	<i>Blackstonia perfolita</i>		
	<i>Bp_E</i>	<i>Bp_C</i>	<i>Bp_A</i>
SA			
BC			
ML			
List			
AR			

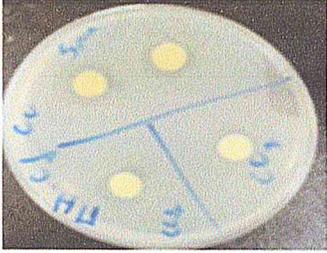
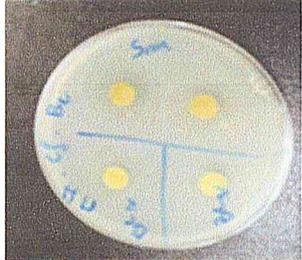
<p><i>Sal</i></p>			
<p><i>EC</i></p>			
<p><i>PA</i></p>			
<p><i>Cf</i></p>			

-Les extraits de *Centaurium erythraea* / *Blackstonia perfolita*

Souches bactériennes	<i>Centaurium erythraea</i> / <i>Blackstonia perfolita</i>		
	Ce_E / Bp_E	Ce_C / Bp_C	Ce_A / Bp_A
<i>K1b</i>			
<i>PV</i>			

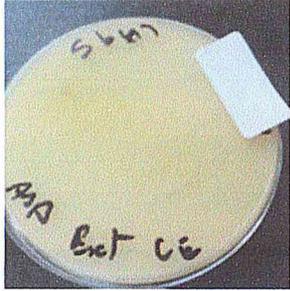
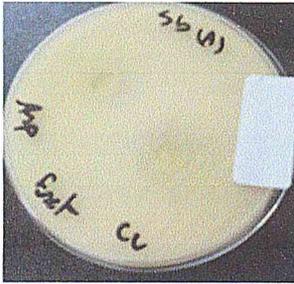
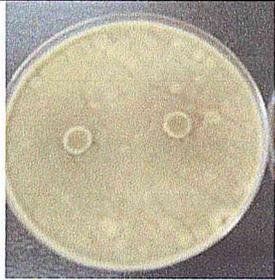
- la CMI des extraits pour les souches bactériennes les plus sensibles

	Bp_E	Bp_A
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)		
<i>Listeria monocytogenes</i> (List)		

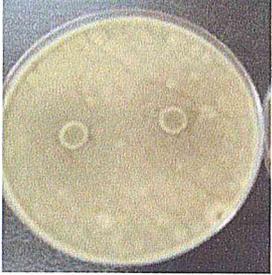
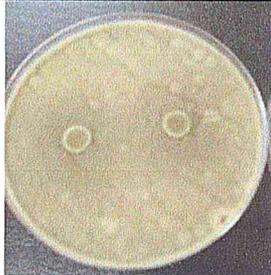
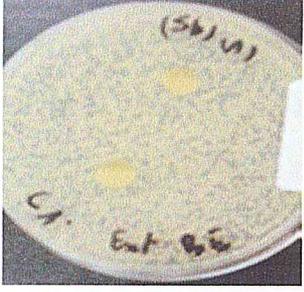
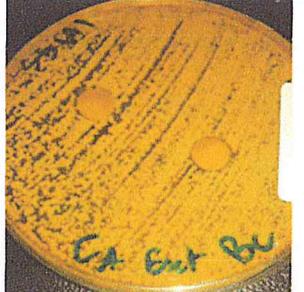
	<i>Cec</i>	<i>Bpc</i>
<i>Citrobacter frandi</i> (CF)		

*Les photographies des résultats obtenus sur les boîtes de Pétri de l'activité antifongique des extraits testée sur les fongiques.

-Les extraits de *Centaurea erythraea*

Souches fongiques	<i>Centaurea erythraea</i>		
	<i>Ce_E</i>	<i>Cec</i>	<i>Ce_A</i>
<i>Asp</i>			
<i>CA</i>			
<i>SS</i>			

-Les extraits de *Blackstonia perfolita*

Souches fongiques	<i>Blackstonia perfolita</i>		
	<i>Bp_E</i>	<i>Bp_C</i>	<i>Bp_A</i>
<i>Asp</i>			
<i>CA</i>			
<i>SS</i>			