



Université Blida 1
Saad DAHLEB

Faculté des Sciences & Technologies
Département « Génie des Procédés »
Pharmacie Industrielle

*Formulation d'une émulsion buvable de
Type ($W_1/O/W_2$) à base des molécules biactives
de CENTAUREA SP pour le traitement de
l'ulcère gastrique.*

Mémoire de Master 2 en « Pharmacie Industrielle »

Etudiantes :

BELATECHE Anaïs Lydia

KHIDER Roumaïssa

Promoteur :

NAIT BACHIR Yacine

Année : 2020 – 2021

REMERCIEMENT

Ce mémoire est le fruit d'un long chemin de travail et d'études, je tiens pour cela à remercier avant tout le bon Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé assez d'énergie et de confiance et d'être à notre côté à chaque pas dans la vie. Nous exprimons notre profonde reconnaissance à « Mr NAIT BACHIR Yacine », d'avoir accepté de nous encadrer pour la réalisation de ce projet de fin d'étude et pour tous les conseils et orientations qu'ils ont su nous promulguer durant l'évolution de notre projet.

Nous remercions également les membres des laboratoires du département de génie de procédé, pour leur aide et leur disponibilité dans la réalisation de la partie pratique «Mdm Karima » « Mdm Zahira ».

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury qui ont accepté de bien vouloir examiner ce modeste travail.

Je tiens aussi à remercier tous les professeurs qui ont contribué à ma formation, avec beaucoup de dévouement et de compétence.

En fin je remercie toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à cette réalisation

DEDICACE

Avec les sentiments d'amour, je dédie ce modeste travail à : à la lumière de mon coeur, ma très chère mère « MALEK Faiza » qui m'a guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, pour son amour, ses prières et qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, qui a sacrifié toute sa vie pour que je devienne ce que je suis c'est à toi que je dois ce travail, Tous les mots ne peuvent traduire ce que je ressens pour toi « Merci maman».

A ma grand-mère Pour le soutien moral que tu m'apporte, Merci de m'avoir écoutée, entendue, soutenue, fortifiée et compris

A mes enseignants qui ont contribué à ma formation.

Merci !

BELATECHE Anais Lydia

DEDICACE

Je dédie ce travail ...

A vous, mes chers parents, votre existence illumine mes chemins, vos paroles clarifient mes doutes, vos prières guident mes pas, sans vous ce travail n'aurait pas vu la lumière.

A mes frères Redouane, Zoheir et son épouse Houda et leurs fille Hiba ma petite nièce chérie, pour leur apport considérable dans ce travail Et pour leurs soutien moral.

Merci !

KHIDER Romaissa

INTRODUCTION

Les émulsions doubles sont des systèmes encore peu utilisés en pharmacie mais dont l'intérêt grandit avec l'augmentation des principes actifs hydrosolubles et peu perméables. Ces émulsions sont composées d'une phase interne contenant généralement le principe actif, d'une phase intermédiaire agissant comme une membrane et d'une phase externe. Les plus intéressantes sont les émulsions eau dans huile dans eau (W/O/W) car elles permettent d'encapsuler des molécules solubles dans l'eau. De plus, leur phase externe aqueuse permet une utilisation et une administration facilitée par leur faible viscosité. A l'heure actuelle, il n'existe pas de médicament commercialisé sous la forme d'émulsion double.

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé. A l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques.

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des activités antioxydantes des extraits des racines de la *Centauria sp* pour la formulation d'une émulsion multiple. Cette plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle, car elle possède plusieurs activités thérapeutiques : **anti-ulcérogénique, allélochimique, anti-bactériennes, anti-Fungal, anti-Viral, antituberculeuse, antisciceptives, antipyrétiques, antilogistiques, de guérison des plaies, Anti-Platelet, hépatoprotectrice, de prévention, cytotoxique et antisyndicale.**

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

Etude *in vitro* qui comporte :

- Analyse quantitative du contenu en polyphénols totaux, des extraits des racines de la *Centauria*.
- Etude de l'activité antioxydante des extraits, en utilisant la méthode de diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH).

Etude in vivo:

- En explorant l'efficacité de l'émulsion multiple chez les souris *mus musculus*, et en évaluant les effets de la centaurea, afin d'établir si cette plante peut traiter les ulcères. Dans ce contexte, notre étude tend à mettre en évidence les effets guérissant de l'extrait éthanolique de la centaurea sur une provocation des ulcères par l'éthanol.

Résumé

La centaurea sp est une des sources végétales les plus riches en substances phénoliques antioxydantes et notamment en polyphénols. Nous nous sommes intéressés dans ce présent travail à optimiser les paramètres d'extraction des molécules bioactives de la Centaurea sp et évaluer son activité anti ulcérogique , en vue de la formulation d'une émulsion buvable.

La première partie concerne l'étude de l'effet des solvants sur l'extraction des molécules bioactives de la Centaurea sp, afin d'avoir un meilleur solvant qui est l'éthanol, on a utilisé un plan d'expérience.

La deuxième partie est la préformulation et formulation d'une émulsion buvable pour la délivrance de l'extrait de la Centaurea sp.

Enfin, l'étude de l'activité anti ulcerogene in vivo de la Centaurea sp des souris, en gavant l'éthanol pour provoqué l'ulcère. Les résultats de cette étude révèlent aussi que les molécules bioactives de Centaurea et la double émulsion présentent une action anti ulcérogène qui résulte la réduction des ulcères.

Mots clés : Centaurea, , l'activité anti ulcérogène, in vivo, DPPH, polyphénols totaux, émulsions.

Abstract

Centaurea sp is one of the richest vegetable sources of antioxidant phenolic substances, especially polyphenols. In this present work, we are interested in optimizing the extraction parameters of the bioactive molecules of Centaurea sp and evaluating its anti ulcerogenic activity, with a view to formulating a drinkable emulsion.

The first part concerns the study of the effect of solvents on the extraction of bioactive molecules from Centaurea sp, in order to have a better solvent which is ethanol, an experimental design was used.

The second part is the performing and formulation of a drinkable emulsion for the delivery of the extract of Centaurea sp.

Finally, the study of the anti-ulcerogenic activity in vivo of Centaurea sp in mice, by giving ethanol to cause ulcer. The results of this study also reveal that the bioactive molecules of Centaurea and the double emulsion exhibit an anti ulcerogenic action resulting in the reduction of ulcers.

Key words: Centaurea sp, soxhlet, in vivo anti ulcerogenic activity, total polyphenols, emulsions.

ملخص

سونتوريا سب واحدة من أغنى المصادر النباتية في المواد الفينولية المضادة للأكسدة وخاصة في البوليفينول. في هذا العمل الحالي ، كنا مهتمين بتحسين المعلمات لاستخراج الجزيئات النشطة بيولوجيًا من سونتوريا سب وتقييم نشاطها المضاد للتسرع ، بهدف تكوين مستحلب صالح للشرب

يتعلق الجزء الأول بدراسة تأثير المذيبات على استخلاص الجزيئات النشطة بيولوجيًا من سونتوريا سب ، من أجل الحصول على مذيب أفضل وهو الإيثانول ، استخدمنا تصميمًا تجريبيًا.

الجزء الثاني هو تحضير مستحلب عن طريق الفم لإيصال خلاص سونتوريا سب.

أخيرًا ، دراسة النشاط المضاد للتقرح في الجسم الحي لـ سونتوريا سب في الفئران ، عن طريق تغذية الإيثانول بالقوة للحث على القرحة. تكشف نتائج هذه الدراسة أيضًا أن الجزيئات النشطة بيولوجيًا من سونتوريا سب والمستحلب المزوج تظهر تأثيرًا مضادًا للتقرح مما يؤدي إلى الحد من القرحة. سببها الإيثانول.

لكلمات أساسية: سونتوريا سب، النشاط المضاد للتقرح في الجسم الحي، البوليفينول الكلي، المستحلبات

Liste des abréviations

H/E	: Emulsion huile dans eau
O/W	: Emulsion oil in water.
E/ H	: Emulsion eau dans huile.
W/O	: Emulsion water in oil.
E/H/E	: Emulsion eau dans huile dans eau.
W/O/W	: Emulsion water in oil in water.
H/E/H	: Emulsion huile dans eau dans huile.
O/W/O	: Emulsion oil in water in oil.
UAE	: Extraction assistée par ultrasons
MAE	: Extraction assistée par micro-ondes
ASE	: Extraction accélérée par solvant
EFS	: Extraction par fluide supercritique
C	: Centaurea
SP	: abréviation de species au singulier utilisée pour indiquer que l'espèce (animal ou plante), dont on donne le nom de genre n'a pas été identifiée avec plus de précision
SPP	: abréviation de species au pluriel pour indiquer que l'auteur estime inutile d'être plus précis que le niveau du genre.
pH	: Potentiel d'hydrogène.
IC50	: Concentration inhibitrice de 50 % d'une activité
Ppt	: polyphénole totaux
DPPH	: diphényl picryl-hydrazyl

Liste des Figure

Figure 1.1	: Représentation schématiques, des EM H/L/M et L/H/L	4
Figure 1.2	: Formation transitoire d'une émulsion multiple H/L/H lors d'une inversion de phase	5
Figure 1.3	: Représentation schématique d'un diagramme de phases ternaire type eau/huile/émulsionnant.	6
Figure 1.4	: Représentation schématique des principales causes d'instabilité	10
Figure 1.5	: Rendement d'une émulsion multiple après l'introduction d'un traceur R= rendement	11
Figure 1.6	: Exemple de formule d'une émulsion multiple H/L/H crème recommandée Comme crème	16
Figure 2.1	: Dérivés d'acide hydroxybenzoïque	18
Figure 2.2	: Drivés d'acide hydroxycinnamiques	19
Figure 2.3	: Structure de l'enchaînement beyzo-x-pyrone	19
Figure 2.4	: Structure chimique de l'acide gallique	20
Figure 2.5	: Structure chimique des tanins condensés	20
Figure 2.6	: Structure des coumarines	21
Figure 2.7	: Structure d'isoprène	22
Figure 2.8	: Structure chimique de quelques alcaloïdes	22
Figure 2.9	: Représentation schématique d'un extracteur soxhlet	24
Figure 4.1	: Racine de CENTAUREA	47
Figure 4.2	: Réaction chimique du DPPH	51
Figure 4.3	: Forme réduite du radicale DPPH	52
Figure 4.4	: Procédé générale de la formulation de la double émulsion	53
Figure 4.5	: Gavage d'une souris	56
Figure 4.6	: Autopsie des souris et prélèvement de l'estomac	57
Figure 5.1	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	59

Figure 5.2	: Pourcentage d’Inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l’éthanol	61
Figure 5.3	: Pourcentage d’Inhibition du DPPH en fonction de la concentration Dichlorométhane	61
Figure 5.4	: Pourcentage d’Inhibition du DPPH en fonction de la concentration de n-Hexane	61
Figure 5.5	: Pourcentage d’Inhibition du DPPH en fonction de la concentration d’eau	61
Figure 5.6	: Microphotographie de l’émulsion F1	63
Figure 5.7	: Effets des facteurs et leurs interactions sur les réponses	66
Figure 5.8	: Surfaces des réponses permettant la prédiction des résultats	68
Figure 5.9	Histogramme représentant les coefficients de corrélation et de prédiction	69

Liste des Tableaux

Tableau 2.1	: les principales classes des composés phénolique	18
Tableau 3.1	: Lactones ses quite périques isolés de certaines espèces deCENTAUREA	33
Tableau 3.2	: Flavonoïdes isolés de certaines espèces de CENTAUREA	33
Tableau 3.3	: Lignines isolés de certaines espèces deCENTAUREA	34
Tableau 3.4	: Coumarines isolés de certaines espèces deCENTAUREA	35
Tableau 3.5	: Alcaloïdes isolés de certaines espèces deCENTAUREA	35
Tableau 4.1	: Réactives chimiques	47
Tableau 4.2	: Type de solvant pour l'extraction	49
Tableau 4.3	: Optimisation des paramètres de l'émulsion	
Tableau 4.4	: Tableau des souris traitées	56
Tableau 5.1	: Rendements des extraits à différents solvant	61
Tableau 5.2	: Teneurs en phénols totaux des extraits de plante étudiée exprimée en (mg EAG/g MS)	62
Tableau 5.3	: Les valeurs des CI50 ($\mu\text{g/ml}$) calculées pour les extraits étudiés	65
Tableau 5.4	: caractérisation physico-chimique	66
Tableau 5.5 :	: les formulations des doubles émulsions	66
Tableau 5.6 :	: résultats du plan d'expériences	67
Tableau 5.7 :	: les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé de formulation	67
Tableau 5.8:	: Détermination des pourcentages de l'ulcère et des pourcentages d'inhibition	72

Introduction

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Les doubles émulsions

1.1. Définition	3
1.2. Formation des doubles émulsions	4
1.3. Procédé de fabrication	5
(a) Procédé à deux étapes	5
(b) Procédé en continu en une étape	5
(c) Procédé par inversion de phase	6
(d) Procédé faisant appel aux diagrammes ternaireseau/agent de surface/l'huile.....	7
1.4. Matière première.....	7
a) Phase lipophile.....	7
b) Phase aqueuse.....	8
1.5. Stabilité : Aspect physico-chimique	9
a) Mécanisme de libération	11
1.6. Rupture de la membrane	12
1.7. Méthode d'étude	13

Chapitre 2 : Les molécules bioactives végétales

2.1. Métabolite primaire	17
2.2. Métabolite secondaire.....	17
A. Les composés phénoliques	17
i. Classification des composés phénolique	18
a. Acide phénolique	18
b. Les flavoïdes.....	19
c. Les Tanins	20
d. Les coumains.....	21
e. Les lignes	21
ii. Role antioxydant des polyphénols.....	21
B. Les terpènes	21
C. Les alcaloïdes.....	22
2.3. Les techniques d'extraction des molécules bioactive	23

i. Molécule bioactive non volatil.....	23
A. Macération.....	23
B. Extraction par soxhlet.....	23
C. Extraction par méthode d'extraction conventionnelle successive.....	24
a. Extraction assiste par ultrason (UAE).....	24
b. Extraction assiste par micro-onde (MAE).....	25
c. Extraction accéléré par solvant (ASE).....	25
d. Extraction par fluide supercritique (EFS)	25
ii. Molécule bioactive volatile	25
A. La distillation à l'eau	25
B. La distillation à la vapeur d'eau	25
C. L'hydro diffusion	26
D. L'extraction au dioxyde de carbone (CO ₂) hypercritique	26
E. L'extraction par pression ou expression purement mécanique	27
F. Extraction par solvant.....	27
a. L'extraction par solvant offre divers variation	27

Chapitre 3 : La plante étudiée « Centaurea »

3.1. Discription botanique générale du genre centaurea.....	28
3.2. Caractéristique	29
3.3. Utilisation traditionnelle des espèces de centaurea.....	29
3.4. Propriété phytochimique.....	35
3.5. Activité biologique	36

Chapitre 4 : Matériel et méthode

4.1. Matériel	47
A. Matériel.....	47
a. Matériel végétale	47
b. Réactif chimique	48
c. Animaux	48
4.2. Extraction des molécules bioactives	49
A. Préparation par extracteur soxhlet.....	49
a) Préparation par macération de l'extrait aqueux.....	49
i. Calcule du rendement	49

4.3. Caractérisation des extraits	50
A. Dosage des PPT	50
B. Evaluation de l'activité antioxydant DPPH.....	50
4.4. Préparation des doubles émulsions	52
4.1 Pré-formulation	52
a. Préparation de l'émulsion simple W_1/O	52
b. Préparation de la phase externe W_2	52
c. Préparation de la double émulsion $W_1/O/W_2$	52
4.2 Formulation	52
A. Procédé générale	52
a. Préparation de l'émulsion simple W_1/O	52
b. Préparation de la phase externe W_2	52
c. Préparation de la double émulsion $W_1/O/W_2$	52
B. Optimisation de procédé de formulation.....	53
4.5. Caractérisation physico-chimique des doubles émulsions.....	54
4.6. Evaluation de l'activité anti-ulcérologique.....	55
A. Choix du modèle expérimentale	55
B. Matériel biologique	55
C. Traitement des souris	55
d. Dissection des organes	57

Chapitre5 : Résultat et discussion

5.1. Extraction et caractérisations des molécules bioactive.....	59
A. Effet des solvants sur le rendement	59
B. Effet des solvants sur le PPT.....	59
C. Effet des solvants sur l'activité anti-oxydante DPPH	60
5.2. Formulation et caractérisation des doubles émulsions.....	63
5.2.1 Matrice des résultats.....	64
5.2.2 Effets des facteurs et leurs interactions sur les réponses.....	65
5.2.3 Modélisation mathématique.....	66
5.2.4 Prédiction des résultats.....	66
5.2.5 coefficient de corrélation (R^2) et coefficient de prédiction (Q^2).....	68
5.3. Discussion des mécanismes de stabilité des doubles émulsions	69
5.4. Evaluation de l'activité anti-ulcérologique in-vivo	69

Conclusion.....72

Référence.....73

Annexe1

Annexe2

Introduction

Les émulsions doubles sont des systèmes encore peu utilisés en pharmacie mais dont l'intérêt grandit avec l'augmentation des principes actifs hydrosolubles et peu perméables. Ces émulsions sont composées d'une phase interne contenant généralement le principe actif, d'une phase intermédiaire agissant comme une membrane et d'une phase externe. Les plus intéressantes sont les émulsions eau dans huile dans eau (W/O/W) car elles permettent d'encapsuler des molécules solubles dans l'eau. De plus, leur phase externe aqueuse permet une utilisation et une administration facilitée par leur faible viscosité. A l'heure actuelle, il n'existe pas de médicament commercialisé sous la forme d'émulsion double. [1]

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé. A l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments [2]. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques. [3] [4]

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des activités anti-oxydantes des extraits des racines de la *Centaurea sp* pour la formulation d'une émulsion multiple. Cette plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle, car elle possède plusieurs activités thérapeutiques : **anti-ulcérogénique, allélochimique, anti-bactériennes, anti-Fungal, anti-Viral, antituberculeuse, antisciceptives, antipyrétiques, antilogistiques, de guérison des plaies, Anti-Platelet, hépatoprotectrice, de prévention, cytotoxique et antisyndicale.** [5]

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

Etude *in vitro* qui comporte :

- Analyse quantitative du contenu en polyphénols totaux, des extraits des racines de la *Centaurea*.
- Etude de l'activité anti-oxydante des extraits, en utilisant la méthode de diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH).

Etude in vivo:

- En explorant l'efficacité de l'émulsion multiple chez les souris *mus musculus*, et en évaluant les effets de la centaurea, afin d'établir si cette plante peut traiter les ulcères. Dans ce contexte, notre étude tend à mettre en évidence les effets guérissant de l'extrait éthanolique de la centaurea sur une provocation des ulcères par l'éthanol.

Comment peut-on utiliser les vertus de la *Centaurea* sp pour la formulation d'un médicament bio anti-ulcérogique ?

Chapitre 1 : les doubles émulsions

1.1 Définition :

Pour la plupart des auteurs, une émulsion multiple est définie comme une émulsion d'émulsion, c'est-à-dire une émulsion dans laquelle deux types d'émulsion coexistent. Ceci signifie que, pour une émulsion multiple dite H/L/H, les particules huileuses dispersés dans la phase aqueuse renferment elles-mêmes une ou plusieurs gouttelettes d'eau. Pour une émulsion multiple dite L/H/L, les particules aqueuses dispersées dans la phase huileuse renferment elles-mêmes une ou plusieurs gouttelettes d'huile. Une émulsion multiple peut se présenter comme suit (**Figure 1.1**): chaque globule dispersé dans une émulsion multiple (H/L/H ou L/H/L) forme une structure vésiculaire avec un seul ou plusieurs compartiments aqueux (ou huileux) séparés de la phase dispersante aqueuse (ou huileuse) par les composants de la couche huileuse (ou aqueuse). Souvent le mot 'ordre' est employé pour caractériser de tels systèmes avec une valeur qui représente le nombre d'interfaces présentes dans l'émulsion [6]. Ainsi une émulsion simple est une émulsion de premier ordre car elle ne possède qu'une seule interface et une émulsion multiple est une émulsion de deuxième ordre car elle possède deux interfaces. Il est possible d'avoir des émulsions de troisième ou quatrième ordre voire plus. Une émulsion multiple H1/L/H1 est dite de deuxième ordre à deux composants, les deux phases aqueuses étant semblables; une émulsion multiple H1/L/H2 est dite de deuxième ordre à trois composants, les deux phases aqueuses étant différentes. Le terme multiple est souvent désigné pour la vésicule qui renferme les particules dispersées internes. Ces particules dispersées internes sont souvent appelées compartiments (aqueux ou huileux). Cependant il est courant de dire plus simplement phase interne, phase externe, phase intermédiaire, agent de surface primaire et agent de surface secondaire.

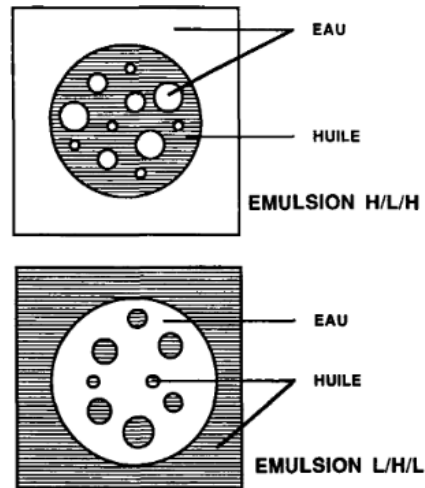


Figure 1.1 : Représentation schématique des émulsions multiples H/L/H et L/H/L

1.2 Formation des doubles émulsions :

La formation des émulsions multiples est assez fréquente puisque selon Sherman [7] ce type d'émulsion se forme spontanément au moment de l'inversion de phase, lors de la préparation d'une émulsion simple. Ainsi, lorsqu'un agent de surface est introduit dans l'huile et que de l'eau est ajoutée progressivement à ce mélange et à une certaine température, il se forme d'abord une émulsion H/L; pour une addition supplémentaire d'eau, il y a création d'une émulsion H/L/H et enfin pour une grande quantité d'eau, une émulsion L/H est obtenue (**Fig. 1.2**)[8]. Du fait de la migration de l'agent de surface hydrophile vers l'eau, il se produit une inversion totale de phase. Ces transformations successives peuvent être notées par l'évolution de consistance ou par l'examen de l'aspect des particules au microscope, à des temps différents. Toutefois, si l'observation n'est pas réalisée au moment même de sa formation, l'émulsion multiple formée ne sera pas mise en évidence, sa durée de vie étant courte. Cette constatation a également été réalisée par Becher [9] sur les émulsions L/H/L. Si les conditions de formulation et de fabrication le permettent, dans un premier temps, il se forme une émulsion de premier ordre L/H, puis dans un second temps, par addition progressive d'huile, une émulsion multiple L/H/L et une émulsion H/L suite à une inversion totale des phases.

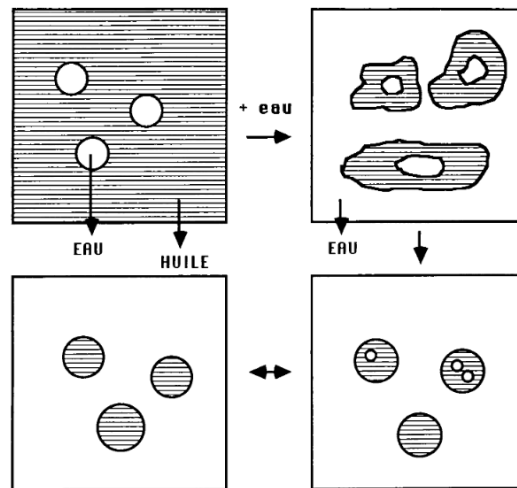


Figure 1.2. Formation transitoire d'une émulsion multiple H/L/H lors d'une inversion de phase.

1.3 Procédé de fabrication :

Est possible de faire appel à plusieurs procédés.

a) Procédé à deux étapes :

Le procédé à deux étapes est le plus souvent décrit. Dans un premier temps, une émulsion de premier ordre (H/L ou L/H selon l'émulsion multiple désirée) est réalisée, et dans un second temps, l'émulsion primaire obtenue est dispersée immédiatement soit dans une solution aqueuse additionnée d'agent de surface hydrophile pour obtenir une émulsion multiple H/L/H soit dans une solution huileuse additionnée d'agent de surface lipophile pour obtenir une émulsion multiple L/H/L. Il s'agit donc d'un procédé simple, facile à maîtriser dans lequel le point critique est constitué par la deuxième étape d'émulsification.

Pour certains auteurs [10], l'agent de surface lipophile, introduit dans l'émulsion H/L, constituant de l'interface interne eau-huile, s'orienterait en structure lamellaire et aurait ainsi un rôle prépondérant dans la stabilisation de la membrane huileuse, alors que l'agent de surface hydrophile, en s'adsorbant surtout au niveau de l'interface externe huile-eau, aurait un rôle important dans la dispersion des globules huileux.

b) Procédé en continu en une étape :

Ce procédé exige une formulation particulière ainsi qu'un matériel très performant. A titre d'exemple, Di Stefano et collègues [11] ainsi que Mackles [12] mélangent en quantités égales une solution aqueuse 0.1 M a 1 M d'agent de surface hydrophile et de la paraffine liquide contenant 15% d'agent de surface lipophile (oléate de sorbitane). Le matériel permet de travailler à température ambiante, a une vitesse de cisaillement supérieure 10000 tours par minute pendant seulement quelques minutes [13]. La formation de l'émulsion multiple serait due à la déformation des fractions huileuses injectées, sous l'influence du cisaillement élevé provoqué par l'apport d'eau en continu. Cette déformation, sous forme d'élongation des fractions huileuses, induirait une certaine concavité de leur surface entraînant la formation d'une structure vésiculaire avec emprisonnement d'eau.

L'obtention d'émulsion multiple H/L/H avec un tel procédé dépend, outre de la quantité d'agent de surface lipophile, de plusieurs autres facteurs tels que le taux de cisaillement de l'eau, la viscosité des deux liquides, la tension interfaciale, etc. Difficile à contrôler, ce procédé est de ce fait peu courant.

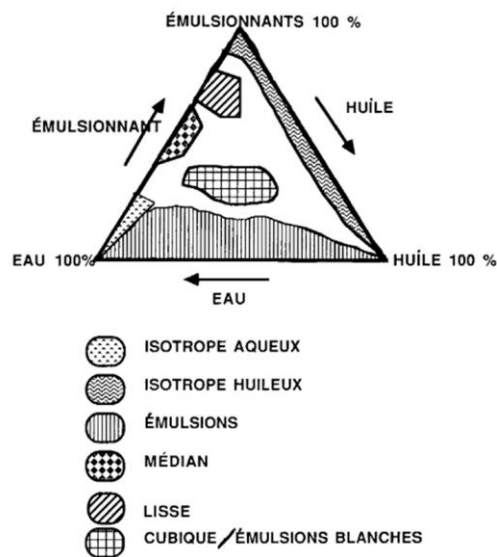


Figure 1.3. Représentation schématique d'un diagramme de phases ternaire type eau/huile/ émulsionnant.

c) Procédé par inversion de phase :

Cette méthode nécessite la encore un appareillage complexe et une formulation particulière. Sherman et collègues [14] préparent une émulsion simple H/L à laquelle ils ajoutent progressivement de l'eau additionne d'un agent de surface hydrophile. Lorsque le volume d'eau ajoutée est d'environ 70%, il se forme, si l'apport d'eau est stoppé à ce moment précis, une émulsion multiple H/L/H qui reste stable sans se transformer en émulsion L/H. Comme précédemment, ce procédé original est rarement employé car il est difficile à maîtriser.

d) Procédé faisant appel aux diagrammes ternaires eau/ l'agent de surface/ huile :

Il s'agit ici d'un procédé assez séduisant mais pas toujours facile à mettre en œuvre. Kavaliunas et Frank [10] préparent dans un premier temps un isotrope aqueux, un isotrope huileux et une mésophase cristalline, puis mélangent dans un deuxième temps ces trois phases en proportions définies et obtiennent une émulsion multiple H/L/H. Selon ces auteurs, le recours à un tel procédé présenterait un double intérêt: le nombre de mélanges réaliser lors de l'obtention de l'émulsion multiple est restreint grâce aux régions bien délimitées du diagramme, et la stabilité du système est renforcée de façon importante grâce à l'addition de la phase cristalline préalablement obtenue.

De même, il est possible d'obtenir [15] de tels systèmes, appelés microémulsions multiples, en mélangeant en proportions bien déterminés un isotrope huileux, contenant au centre des micelles inverses une petite quantité d'eau, a une solution aqueuse d'agent de surface hydrophile. Ces procédés exigent bien évidemment que les constituants fournissent pour certaines proportions, les différentes phases h mélanger.

1.4 MATIERES PREMIERES

a) Phases lipophiles :

Pratiquement tous les solvants lipophiles sont employés avec succès: hydrocarbures, cires, silicones, esters, triglycérides, etc.

Comme avec les émulsions de premier ordre, les hydrocarbures donnent des émulsions plus stables que les triglycérides et d'autant plus que la chaîne lipophile de l'agent de surface est proche de la nature de la phase lipophile à émulsionner.

Pour une même huile la concentration a une influence relativement mineure, mais il est important de prendre en considération ses caractéristiques physico-chimiques, notamment sa densité et sa viscosité. Ainsi, selon la préparation à obtenir, une phase huileuse solide sera préconisée comme phase interne et une phase huileuse liquide comme phase externe [16]. A l'inverse une phase huileuse liquide pourrait être préconisée en phase interne et une phase huileuse solide en phase externe [17].

i. Agents de surface :

Tous les agents de surface peuvent également être utilisés. Dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques une préférence existe néanmoins, quand cela est possible, pour les agents de surface non ioniques. Contrairement aux phases huileuses pour lesquelles il y a peu d'exigences particulières, les agents de surface connaissent au moins deux impératifs:

- Il faut d'abord respecter un équilibre entre les concentrations respectives des agents de surface hydrophile et lipophile. Si le premier est en trop grande quantité, il risque de solubiliser le second qui migre alors vers l'interface externe déstabilisant ainsi l'émulsion multiple.
- Le HLB du mélange d'agents de surface ne doit pas présenter une valeur trop élevée, sinon il y a risque d'inversion et de formation d'une émulsion de premier ordre L/H. Cette valeur est obtenue en se fondant sur la formule de Frenkel [18]:

$$HLB \text{ melange} = \frac{HLB1 \phi(H / L / H)P1\% + HLB2 * P2\%}{\phi(H / L / H) * P1\% + P2\%}$$

HLB1 : HLB de l'agent de surface primaire.

HLB2 : HLB de l'agent de surface secondaire.

P₁ % : pourcentages des agents de surface primaire.

P₂ % : pourcentages des agents de surface secondaire.

$\phi_{(H/L/H)}$:fraction volumique de l'émulsion H/L dans l'émulsion multiple.

b) Phase aqueuse :

La phase aqueuse interne pour les émulsions H/L/H renferme presque toujours, à côté des substances actives éventuelles, des sels de sodium, de potassium ou de calcium (chlorure, acétate...) ou des sucres (glucose, saccharose.. .) qui servent de traceurs. Leur passage, sous certaines conditions, de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe, pourra alors être facilement suivi: le dosage, à un intervalle de temps réguliers, de la quantité de traceur passé dans la phase aqueuse externe fournit des précisions concernant notamment le caractère réellement multiple de l'émulsion, et la stabilité au cours du temps du système.

Si la concentration du traceur en phase externe est nulle, aussi bien juste après la préparation qu'après un certain temps, cela témoigne d'une bonne stabilité de l'émulsion multiple.

Pour les émulsions multiples L/H/L, la même possibilité de traceur existe, mais ils doivent bien évidemment être liposolubles.

i. Additifs :

Pour augmenter la stabilité, d'autres matières premières peuvent être introduites dans les différentes phases afin de les gélifier ou de les réticuler. Il est ainsi possible d'introduire, par exemple:

- au niveau des phases aqueuses, du sérum albumine [19], des dérivés cellulose [20], des dérivés vinyliques [21]
- au niveau de la phase huileuse, des alcools gras, du stéarate d'aluminium [22].
- au niveau du film d'agent de surface, des monomères qui après irradiation gamma se polymérisent [22]

1.5 STABILITE: ASPECT PHYSICO-CHIMIQUE :

Il va de soi que la stabilité des émulsions multiples est encore plus difficile à obtenir que celle des émulsions simples.

Schématiquement les différentes causes d'instabilité d'une émulsion multiple H/L/H peuvent être résumées comme suit:

- les globules huileux peuvent coalescer

- Les particules aqueuses internes peuvent également coalescer
- Les particules aqueuses internes peuvent être expulsées dans la phase aqueuse externe
- L'eau de la phase externe peut pénétrer dans l'eau de la phase interne (Fig. 4).

Les principales causes d'instabilité sont souvent concomitantes et difficiles à bien différencier. Après un temps plus ou moins long elles entraînent soit une transformation de l'émulsion multiple en émulsion simple, soit une rupture complète de l'émulsion. Elles sont dues à divers facteurs, par exemple la différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane liée à la présence des substances dans l'une des phases ou dans les deux phases.

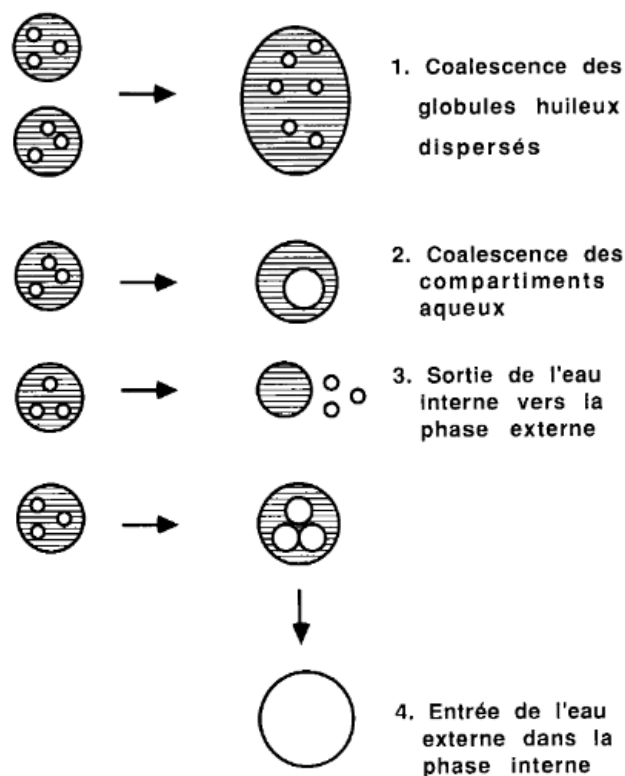


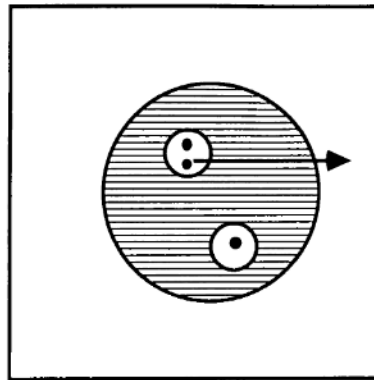
Figure 1.4. Représentation schématique des principales causes d'instabilité

Si une substance est introduite dans la phase interne, la pression osmotique sera telle que l'eau de la phase externe sera attirée vers les particules aqueuses internes provoquant ainsi un gonflement. Si la différence de pression osmotique est trop grande, la membrane huileuse peut se rompre, entraînant une libération du contenu de la phase interne dans la phase externe. À l'inverse, si la substance est introduite dans la phase aqueuse externe, le transfert

de l'eau se fera de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe, contractant ainsi les particules aqueuses internes.

Le paramètre le plus simple pour évaluer la stabilité d'une émulsion multiple est le rendement, notion introduite par Magdassi [23,24]: un marqueur est dissous dans la phase interne au moment de la réalisation de l'émulsion primaire et la quantité libérée dans la phase externe est mesurée juste après la réalisation de l'émulsion multiple.

Rendement est alors donné par la relation (Fig. 5) :



$$R = \frac{Y_0 - Y_1}{Y_0}$$

Figure 1.5 : Rendement d'une émulsion multiple après l'introduction d'un traceur

R = rendement

Y₀ = masse initiale de marqueur dans la phase interne au temps T₀.

Y₁ = masse de marqueur dans la phase externe après réalisation de l'émulsion multiple.

Si R = 1, l'émulsion présente une stabilité optimale.

a) Mécanisme de libération :

La libération d'une substance active introduite au départ dans la phase interne correspond à son entrée dans la phase externe de l'émulsion. Dans une émulsion multiple H/L/H la surface limitante est constituée par une couche rigide d'huile plus ou moins épaisse ou dans laquelle est dispersée une double couche d'agent de surface sous forme lamellaire [19, 22,23].

La libération d'une substance active dépend de nombreux facteurs physico-chimiques qui peuvent être reliés à la substance elle-même (pKa, coefficient de partage, taille, diffusibilité etc.) et à l'émulsion elle-même (pH, forme ionique, viscosité, nature des agents de surface, taille des particules etc.).

Le processus qui régit cette libération n'est pas encore complètement élucidé. Il semble cependant que deux mécanismes principaux différents et en compétition puissent être évoqués. Dans le cas des émulsions H/L/H, il s'agit d'une diffusion à travers la membrane huileuse de séparation et d'une rupture de cette membrane qui provoque alors le mélange des compartiments aqueux interne et externe.

- **DIFFUSION**

La diffusion est sans doute le mécanisme prépondérant pour les composés qui possèdent un coefficient de partage huile/eau relativement élevé. Pour ce type de substance liposoluble, non ionisée, la diffusion est passive et régie par la loi de Fick qui s'écrit sous la forme suivante, en supposant que le coefficient de partage huile/eau est le même aux deux interfaces:

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{D \cdot S}{X} * (C_i - C_e)$$

C_i : les concentrations de la substance dans la phase interne (i).

C_e : les concentrations de la substance dans la phase externe (e).

D : coefficient de diffusion de la substance active dans l'huile.

x et S : épaisseur et surface de la couche de diffusion.

La vitesse de diffusion est d'autant plus grande que le gradient de concentration en molécules diffusant entre la phase interne et la phase externe est plus élevé. Bien que Magdassi et Garti [25] concluent à une diffusion de certains ions minéraux, ce type de diffusion ne devrait pas intervenir pour des substances peu ou non liposolubles, comme par exemple la plupart des électrolytes.

Pour ce type de substance, il est peut-être plus exact d'envisager un phénomène de transport transmembranaire indirect: la substance est incluse dans une micelle inverse et est transportée grâce à cette solubilisation micellaire.

1.6 RUPTURE DE LA MEMBRANE

Dans une émulsion multiple H/L/H, cette rupture peut intervenir après que les globules dispersés huileux aient atteint une taille critique sous l'effet du gonflement provoqué par le flux aqueux dirigé de la phase externe vers la phase interne. Ainsi qu'il a été dit plus haut, ce flux est produit par l'existence d'une pression osmotique entre les deux phases interne et externe.

1.7 Méthodes d'étude

Certaines méthodes sont faciles à mettre en œuvre et doivent être utilisées dès les premières études sur les émulsions multiples.

- **OBSERVATION AU MICROSCOPE**

D'une part, l'emploi de microscope ordinaire ou 2 contrastes de phases permet de noter la présence de petits globules (aqueux ou huileux) dans les plus grosses particules dispersées, signant ainsi le caractère multiple de l'émulsion examinée. D'autre part, l'emploi du microscope polarisant peut permettre, grâce à la texture anisotrope éventuellement observée, de conclure que l'émulsion multiple peut renfermer une phase lamellaire

- **COMPTAGE DES PARTICULES**

Il est possible de mesurer la taille des particules ainsi que leur distribution granulométrique au moyen d'un compteur électronique. Ce dernier n'est utilisable que pour les émulsions H/L/H. Etant donné le phénomène de gonflement et de contraction, l'analyse statique n'est pas significative, sauf si des conditions isotoniques sont obtenues entre les deux phases aqueuses. Cet essai est surtout destiné à suivre l'évolution des tailles au cours du temps. Selon Florence et collègues trois types de distribution granulométrique peuvent se présenter:

- type A: globules huileux dispersés avec un seul petit globule aqueux interne
- type B: globules huileux dispersés avec plusieurs petits globules aqueux internes
- type C: globules huileux dispersés avec de nombreux globules aqueux internes.

L'obtention de l'un de ces types dépend de la formule et du mode opératoire. Pour un rendement maximum, c'est l'émulsion de type C qui serait la plus satisfaisante.

- **ETUDE DES CHANGEMENTS DE VISCOSITE RELATIVE [26, 27,28]**

La dilution d'une émulsion multiple dans laquelle a été introduit un traceur en phase interne par exemple, provoque un fort gradient de pression osmotique qui force l'entrée de l'eau externe dans la phase interne augmentant ainsi la viscosité. A partir d'un certain seuil de gonflement des compartiments aqueux internes, la membrane huileuse se détruira. L'eau interne passe dans la phase externe et la diminution de viscosité relative est suivie jusqu'à l'équilibre.

- **DOSAGE DU MARQUEUR DANS LA PHASE EXTERNE**

La sortie d'un marqueur (chlorure de sodium ou glucose par exemple) introduit en phase aqueuse interne, peut être suivie par dosage en continu, directement ou après dilution, sur l'émulsion elle-même ou après dialyse [13]. Les méthodes de dosage sont bien évidemment adaptables à la nature des marqueurs.

- **AUTRES METHODES**

A côté de ces méthodes courantes, d'autres méthodes, plus délicates à réaliser, correspondent à des études très approfondies; elles sont aussi plus difficiles à interpréter et ne seront mises en œuvre qu'après une connaissance déjà approfondie des émulsions multiples. Il est possible de citer notamment les méthodes de photo microscopie et de microscopie électronique [29, 30], ciné micrographiques [31] etc. Finalement il faut citer des études de libération in vivo fondées sur la mesure de l'effet pharmacologique [32, 33,34], ainsi que des études cliniques de l'efficacité de différents principes actifs pour suivre la prolongation de leur action lorsqu'ils sont introduits dans la phase interne [35]

- **Applications**

Qu'elles soient du type H/L/H ou du type L/H/L, les émulsions multiples sont intéressantes dans les domaines alimentaire et domestique [36,37] ou elles sont préconisées soit pour obtenir une meilleure stabilité des produits à tartiner [17, 37] pour masquer un goût [38], ou pour modifier des propriétés organoleptiques d'aliments [39], soit pour améliorer la brillance de cires et d'encaustiques [12], [16].

Dans le domaine pharmaceutique, elles sont étudiées dans le but de prolonger l'action de certains principes actifs comme: insuline [41], antimétabolites [42,43], antalgiques [44], anti-inflammatoires [45], anti glaucomeux [46], etc. ; elles sont aussi employées d'une manière plus générale pour préparer des liposomes ou des microcapsules [47]. Lorsqu'elles sont employées comme membrane liquide, elles peuvent servir dans la lutte contre diverses intoxications [48,49]. Dans le domaine cosmétique, quelques brevets ont été déposés concernant des parfums et des crèmes [50-56]. Le parfum encapsulé dans la phase interne de l'émulsion multiple se libérerait en un temps plus ou moins long et pourrait même être retenu indéfiniment jusqu'à ce que les globules internes se rompent sous l'effet d'un facteur quelconque, libérant ainsi le parfum encapsulé.

En ce qui concerne les crèmes, les brevets revendiquent de nombreuses possibilités. Ainsi la dispersion d'une émulsion H/L dans une solution aqueuse de polymères hydrophiles conduirait à des crèmes à propriétés démaquillantes, émoussantes.

La figure 6 représente le prototype d'une formule préconisée comme crème.

Emulsion primaire H/L:		Emulsion multiple:	
Cire d'abeille	10.0	Emulsion primaire H/L	78.0
Cire microcristalline	10.0	Ester de sucrose	2.0
Vaseline	15.0	Conservateurs	Q.S.
Lanoline	5.0	Eau	20.0
Perhydrosqualene	15.0		
Huile d'olive	12.0		
Monoolbate de sorbitane	4.0		
Monostbaratedesorbitane	3.0		
Sucrose	1.5		
Parfum	1.0		
Eau	23.5		

Figure 1.6 : Exemple de formule d'une émulsion multiple H/L/H crème recommandée comme crème de nuit (selon Brevet Lions Co. 1979)

Chapitre2 : les molécules bioactives végétales

Les végétaux produisent des substances chimiques de structures variées comme les métabolites primaires et secondaires [50]. Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, terpènes, les alcaloïdes) qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents la pharmacologie ou l'agroalimentaires [48].

2.1 Les métabolites primaires:

Métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en trois grandes catégories :

- glucide** : source d'énergie, paroi cellulaire (cellulose)
- lipides** : source d'énergie, membranes cellulaire
- acides aminés** : source primaire de construction des protéines

2.2 Les métabolites secondaires:

Les métabolites secondaires (aussi appelés produits naturels) sont des molécules organiques non directement impliquées dans le développement ou la reproduction d'un organisme. Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un organisme. Cette absence peut aussi n'avoir aucun effet.

A. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques naturels regroupent plus de 8000 substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants [53]. Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, le thé, le café, les jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs [52].

i. classifications des composés phénoliques

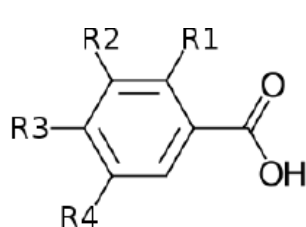
Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau 1).

Tableau 2.1: les principales classes des composés phénoliques [52].

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6-C1	Acides Hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides Hydroxycinnamiques	Acide caféique, férulique	Pomme
	Coumarines	Scopolétine	Citrus
C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones 	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechines Naringénine Diadzéine	Fruits, légume Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
	Isoflavonoïdes		
	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Lignines		Bios, noyau des fruits
	Tanins condensés		Raisin rouge, kaki
(C6-C3) ₂			
(C6-C3) n			
(C15) n			

a) Acides phénoliques

Ils sont divisés en deux classes : Les dérivés de l'acides hydroxybenzoïques (Figure 2.1) : sont composés d'un noyau benzénique et présentent une structure en C6-C1 [54].

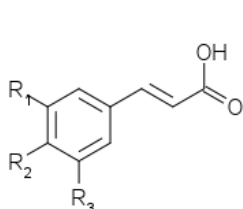


R1 = R2 = R3 = R4 = H acide benzoïque (non phénolique)
 R1 = R2 = R4 = H, R3 = OH acide p-hydroxybenzoïque
 R1 = R4 = H, R2 = R3 = OH acide protocatéchinique
 R1 = R4 = H, R2 = OCH₃, R3 = OH acide vanillique
 R1 = H, R2 = R3 = R4 = OH acide gallique
 R1 = H, R2 = R4 = OCH₃, R3 = OH acide syringique
 R1 = OH, R2 = R3 = R4 = H acide salicylique
 R1 = R4 = OH, R2 = R3 = H acide gentisique

Figure 2.1: Dérivés d'acide hydroxybenzoïque [52].

Les dérivés de l'acide hydroxycinnamiques (Figure 2.2) : représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les

molécules de base de la série hydroxycinnamique l'acide p-coumarique (et ses isomères, les acides o- et m-coumariques), l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5-hydroxylé, et enfin l'acide sinapique [52].



R1=R2=R3=H acide cinnalique (non phénolique)
 R1=RH, R2=OH acide p-cinnamique
 R1=R2=OH, R3=H acide caféique
 R1=OCH3, R2=OH, R3=H acide férulique
 R1=R3=OCH3, R2=OH acide sinapique

Figure 2.2 : Dérivés de l'acide hydroxycinnamiques [52]

b) Les flavonoïdes Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [56]. Ils dérivent de l'enchaînement benzo- α -pyrone (Figure 2.3) et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation [57].

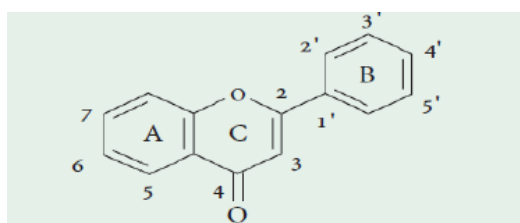


Figure 2.3 : Structures de l'enchaînement benzo- α -pyrone.

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes [57,58].

Selon la nature de l'hétérocycle C, on distingue :

- les flavones et les flavonols, sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine.
- les flavanones (naringénine), les flavanols (catéchine) et les dihydroflavanols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélarгонидол, leucocyanidol), sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte. Les flavonoïdes

peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) [56].

c) **Les tanins** Ce sont des composés phénoliques capables de se lier aux protéines en solution et de précipiter [59]. Leur poids moléculaire est compris entre 5000 et 30000 Daltons. Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins :

➤ **Tanins hydrolysables** : qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide éllagique dans le cas des tanins classiquement dénommés éllagitanins [60], (Figure 2.4).

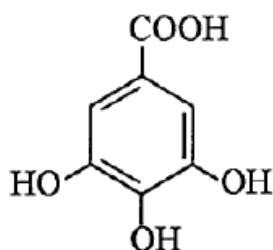


Figure 2.4 : Structure chimiques de l'acide gallique [60]

➤ **Tanins condensés** : qui se diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavoniques constituées d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone- carbone [60], (Figure 2.5).

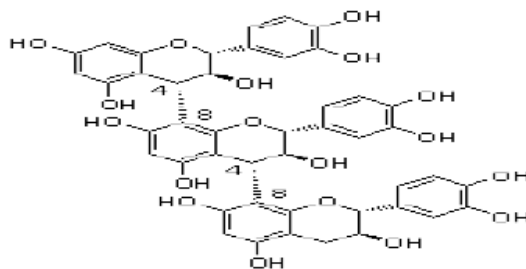


Figure 2.5 : Structure chimique des tanins condensés [60].

d) Les coumarines Ce sont des substances naturelles, organiques et aromatiques constituées de neuf atomes de carbone caractérisées par le noyau 2H-1- benzopyrane-2-one (Figure 2.6). Les coumarines, très largement distribuées dans le règne végétal, ont la capacité de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [61].

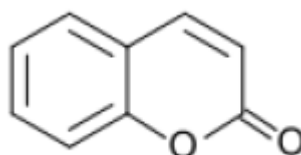


Figure 2.6 : Structure des coumarines [62]

e) Les lignines Bien que la lignine représente une biomasse considérable produite annuellement par les végétaux, la deuxième après la cellulose, elle est rattachée aux composés phénoliques en raison de sa structure chimique et des voies de biosynthèse qui sont directement liées à celle des phénylpropanoïdes [51].

ii. **Rôle antioxydant des polyphénols :**

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires, d'où l'effet protecteur des fruits et légumes. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections...) [63]. Ils renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydant et préviendraient ainsi diverses maladies chroniques, telles que les cancers et les maladies cardio-vasculaires. [64].

B. Les Terpènes Ce sont des molécules hydrocarbonées produites particulièrement au niveau des organes foliaires. Les différentes voies métaboliques dont ils sont issus sont la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie du shikimate, ainsi que la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) [65], **2016**. L'unité de base des terpènes est

l'isoprène en cinq carbones (Figure 2.7). On trouve, selon le nombre de cette unité, les monoterpènes C₁₀ (2 unités), les sesquiterpènes C₁₅ (3 unités), les diterpènes C₂₀ (4 unités), les sesterpènes C₂₅ (5 unités), les triterpènes et stéroïdes C₃₀ (6 unités), les tetraterpènes C₄₀ (8 unités) et les polyterpènes (C₁₀)_n avec n>8 [62].

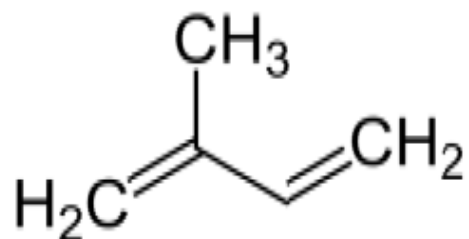


Figure 2.7: Structure d'isoprène

Les terpénoïdes ont des activités biologiques et pharmacologiques variées : antiinflammatoire, antivirus, analgésiques, antibactériennes et antifongiques[66,60]

C. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont d'origine naturelle, le plus souvent végétale. Ce sont des substances organiques azotés et basiques, doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tratrates,maliates,...) ou combinés à des tanins[60].

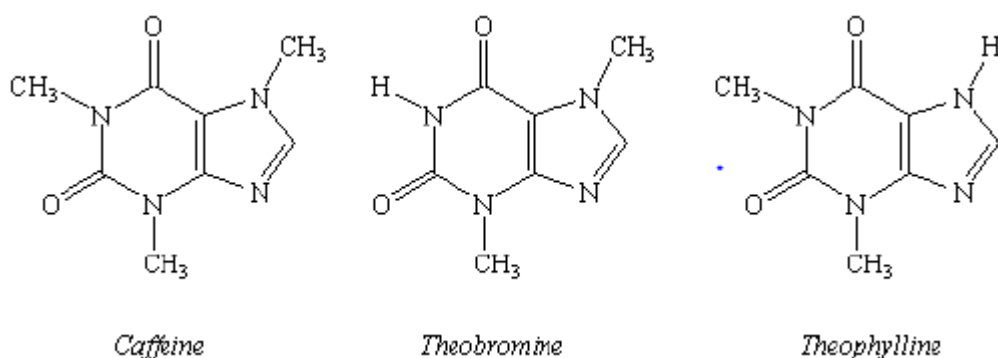


Figure 2.8 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes [60].

D'un point de vue biologique, les alcaloïdes présentent diverses activités à faible dose, analgésiques (morphine), anesthésiques locaux (cocaïne), antibactérienne, anticancéreuse... [67,60].

2.3 Les techniques d'extraction des molécules bioactives

i. Les molécules bioactive non volatile

Les techniques d'extraction employées dans l'extraction des molécules bioactives peuvent être classées en deux catégories [61]:

- Les techniques conventionnelles qui sont basées sur la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ces techniques utilisent souvent une grande quantité de solvant pour extraire le soluté désiré. Les techniques conventionnelles se résument en extraction par macération, soxhlet, reflux ou la combinaison de ces techniques.
- Les techniques vertes « greens technologies » qui donnent plus d'efficacité, moins de temps et utilisent des matières premières renouvelables, par conséquent moins de pollution. Les techniques vertes se résument essentiellement en extraction assistée par ultrasons(UAE), extraction assistée par micro-ondes(MAE), extraction accélérée par solvant(ASE) et extraction par fluide supercritique (SFE) [57].

Les techniques conventionnelles d'extraction des molécules bioactives

A. Macération :

La macération est une extraction solide-liquide dans lequel le composé bioactif (soluté) à l'intérieur de la matière végétale est extrait par un solvant spécifique pendant une période de temps bien déterminée. L'efficacité du processus de macération est déterminée par deux facteurs principaux la solubilité et la diffusion. La macération est le choix le plus fréquent des chercheurs vu la simplicité de la mise d'un système d'extraction par macération. L'inconvénient de la macération est la longue durée d'extraction réduite toutefois par agitation [60].

B. Extraction par refluxet par soxhlet

L'extraction par reflux ainsi que par Soxhlet est basée sur un procédé de distillation qui est largement utilisé dans les laboratoires et les industries alimentaires et non alimentaires [60]. Le procédé consiste à chauffer une solution à ébullition puis à renvoyer les vapeurs condensées dans le ballon d'origine. L'extraction par Soxhlet diffère de l'extraction par reflux par le placement de la matière végétale dans une cartouche et non pas dans le ballon (figure 2.9).

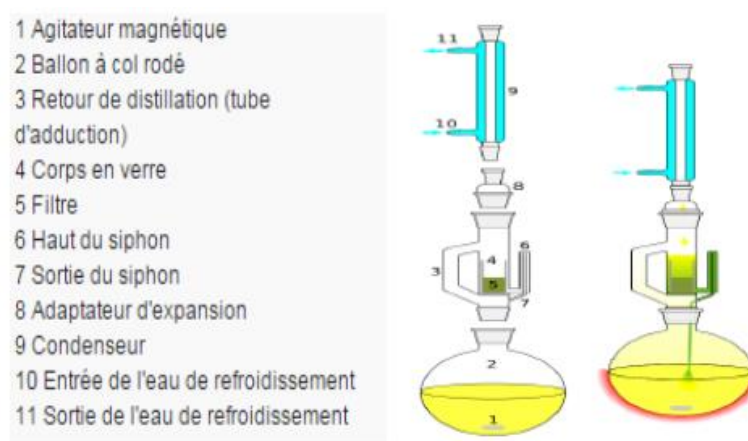


Figure 2.9 : Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet

C. Extraction par méthodes d'extraction conventionnelles successives :

Cette technique consiste à utiliser deux méthodes d'extraction conventionnelles successivement dans le but d'obtenir des molécules bioactives hautement purifiées [63].

Les techniques vertes d'extraction des molécules bioactives

a) Extraction assistée par ultrasons(UAE) :

L'extraction assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant. Le phénomène des ultrasons consiste à créer des bulles de cavitation dans le solvant permettant de dénaturer la paroi de la cellule végétale. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant/soluté ce qui conduit à un meilleur rendement d'extraction des composés bioactifs. Deux types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bain à ultrasons qui est couramment utilisé pour la dispersion de solides dans un solvant ou pour le dégazage des solutions. Le second équipement, une sonde à ultrasons, est beaucoup

plus puissant en raison d'une intensité ultrasonore délivrée sur une petite surface (pointe de la sonde) par rapport au bain à ultrasons.

b) Extraction assistée par micro-ondes(MAE) :

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes avec une gamme de fréquences de 0,3 à 300 GHz. Les micro-ondes sont capables de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec les molécules polaires comme l'eau. L'interaction entre les micro-ondes et les molécules polaires conduit à un surchauffage interne et une perturbation de la structure cellulaire facilitant la diffusion du composé bioactif à partir de la matrice végétale[60,57].

c) Extraction accélérée par solvant(ASE) :

L'extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction par liquide pressurisé) est une technique d'extraction moderne utilisée pour l'extraction des molécules bioactives en utilisant des solvants à haute température et haute pression, mais sans atteindre le point critique [58].L'extraction accélérée par solvant se caractérise par un temps d'extraction court(15-25 minutes) et un volume réduit de solvant utilisé (15-45 ml) [60].

d) Extraction par fluide supercritique (EFS) :

L'extraction par fluide supercritique est une technique d'extraction verte utilisée pour l'extraction d'une grande variété de molécules bioactives .L'extraction par fluide supercritique présentant les avantages d'être rapide, sélective et économise les solvants. L'état supercritique se produit lorsque la température et la pression du fluide sont élevées au-dessus de son point critique. Le dioxyde de carbone est le solvant le plus utilisé dans l'extraction par fluide super critique[60].

ii. Les molécules bioactive volatile

A. La distillation à l'eau :

La matière végétale est complètement immergée dans de l'eau et l'alambic chauffé pour amener son contenu à ébullition. Lorsque la substance condensée refroidit, l'eau et l'huile essentielle se séparent. L'eau résiduelle est parfois commercialisée sous l'appellation « eau forale», « hydrosol » ou « hydrolat » (ex : eau de rose, eau de lavande, eau d'oranger...).

B. La distillation à la vapeur d'eau :

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour la fabrication des H.E. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée dans l'alambic. La vapeur provoque l'ouverture des cavités des plantes qui libèrent ainsi les molécules des huiles volatiles. La température doit être ajustée et contrôlée pour ne pas « brûler » l'élément végétal ni dénaturer l'huile essentielle. La vapeur qui contient l'H.E. est dirigée à travers un système de refroidissement (serpentin) où elle se liquéfie, ce qui sépare de fait l'huile essentielle de l'eau.

C. L'hydro diffusion

Cette appellation désigne une autre forme de distillation à la vapeur : la vapeur est introduite par le haut pour passer à travers la matière végétale choisie. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. Cette méthode utilise moins de vapeur, le processus d'obtention est plus court et le rendement en huile est meilleur.

D. L'extraction au dioxyde de carbone (CO₂) hypercritique

Ce procédé d'extraction est récent. Il est très coûteux, mais produit des H.E. d'excellente qualité. À 33°C, le dioxyde de carbone atteint son point critique, c'est-à-dire la limite entre l'état gazeux et l'état liquide. Il possède, à cette température, certaines propriétés des états gazeux et liquides, ce qui en fait un excellent solvant pour l'extraction d'H.E. fragiles qui requièrent une basse température. Le dioxyde de carbone présente l'avantage d'être inerte, c'est-à-dire ne produit aucune interaction chimique avec l'H.E. extraite.

- **Une dépressurisation sépare l'H.E. du dioxyde de carbone :**

Ce procédé s'effectue dans une cuve en acier inoxydable sous forte pression. Son inconvénient : investissement considérable pour l'équipement. Son avantage : produit des H.E. de bonne qualité pour les plantes fragiles qui nécessitent un processus de basse température.

- **La percolation :**

Cette méthode consiste à propulser la vapeur de haut en bas. Ce processus est rapide et donne une excellente qualité de substances aromatiques, mais charge les H.E. en substance non volatile. On parle alors d'essence de percolation.

E. L'extraction par pression ou expression purement mécanique :

Cette méthode d'extraction dite « pression à froid » n'implique aucune chaleur. La plupart des H.E. d'agrumes sont extraites par ce procédé, qui consiste à soumettre la matière à une grande pression mécanique (écorces ou zestes, de bergamote, citron, lime, mandarine, orange).

F. L'extraction par solvant :

Les solvants tels que l'éther de pétrole, le méthanol, l'éthanol ou l'hexane sont utilisés pour extraire l'huile essentielle d'éléments végétaux qui ne supportent pas la chaleur. C'est par exemple le cas de la jacinthe, du jasmin. Extraite par solvant, l'H.E. est très concentrée, mais ce procédé n'a pas la faveur du public qui craint de retrouver des traces de solvant dans le produit final.

a) L'extraction par solvant offre diverses variantes :

- **La macération** qui consiste à tremper les éléments végétaux dans de l'huile chaude pour provoquer une rupture des membranes cellulaires. Lorsque l'huile a rempli sa fonction d'éclatement, elle est clarifiée et décantée.

- **L'enfeurage** : Une méthode longue et complexe qui utilise une matière grasse végétale ou animale purifiée sur laquelle est placé un lit de pétales de fleurs. Au bout de quelques jours de contact corps gras/pétales de fleurs, on procède à un pressage du mélange, ce qui produit une matière huileuse très aromatique, puis à un « rinçage » de la pommade d'en enfeurage (composée de gras et de parfum) avec de l'alcool. Lorsque l'alcool s'est évaporé du mélange, il ne reste que l'huile essentielle. Les H.E. se dissolvent dans l'alcool sans la graisse.
Cette méthode d'extraction est à l'origine de la fabrication des grands parfums qui ont fait la renommée de la parfumerie française et ses fragrances de renommée olfactive mondiale.

Chapitre3 : la plante étudiée (Centaurea)

3.1 Description botanique générale du genre *Centaurea* :

Le genre *Centaurea* (Asteraceae) aurait guéri Chiron, qui était un centaure (le demi-homme, demi-chevaux de la mythologie grecque, d'où le nom générique. Le genre ont été considérées comme problématiques sur le plan taxonomique. Néanmoins, des analyses moléculaires plus récentes du genre et surtout de la subtribe *Centaureinae* ont permis aux limites naturelles de *Centaurea* d'être établies avec plus de confiance. Les espèces du genre *Centaurea* sont représentées par les sous-groupes suivants : *Acrolophus* (Cass.) DC., *Jacea*, *Leptanthus* et *Seridia-Melanoloma* comprenant 30 sections différentes.

Le nombre de *Centaurea* diffère d'un botaniste à un autre importez un document à traduire. Selon Bremer. Le grand genre *Centaurea* comprend environ 300 espèces répandues dans le monde. Environ 500 à 600 espèces sont principalement réparties dans la région méditerranéenne et en Asie occidentale. Pour Seçmen et al. (1995) plus de 700 espèces se trouvent dans la région méditerranéenne, et pour Kurian environ 900 espèces d'herbes principalement indigènes de la région méditerranéenne, de l'Europe centrale et de l'Asie occidentale. Le genre botanique *Centaurea* (à ne pas confondre avec les espèces du genre *Centaureium* appartenant à la famille des gentianacées) est assez proche des chardons, mais se distingue par des feuilles polymorphes non pinées. *Centaurea* sp. Sont herbacées, annuelles ou vivaces.

Une caractéristique de toutes les espèces de *Centaurea* est l'involucre à la base des fleurs; involucre est constitué de petites bractées qui se chevauchent comme des bardeaux. Certaines espèces sont caractérisées par des bractées frangées ou légèrement velues, tandis que d'autres sont entières. Les fleurs héritières sont leurs couleurs varient principalement entre le rose, le violet et le violet. Le réceptacle est doublé. Avec une soie abondante. Les anthères sont fusionnées à la base; le style est courte branche, avec des glands persistants ou caducs.

[68]

3.2 Caractéristiques :

Rusticité	: Jusqu'à -28°C
Plantation	: Printanière ou automnale
Famille	: Astéracées
Floraison	: Mai à octobre (selon les espèces)
Exposition	: Soleil
Sol	: Bien drainé, plutôt calcaire
Utilisation	: Massif, rocaille, bouquet
Hauteur	: 0,30 à 1,20 m
Variétés	: Plantes vivaces ou plantes annuelles

3.3 Utilisation traditionnelle des espèces de *Centaurea* :

L'espèce *Centaurea* a été utilisée en médecine traditionnelle comme diurétique pour traiter la fièvre et le diabète. Beaucoup de *Centaurea*, ont été ajoutés aux toniques dans la croyance qu'ils stimulent le flux desalive et acides gastriques, redonnant de l'appétit aux invalides.

Les espèces de *Centaurea* sont connues en médecine populaire pour avoir des propriétés anti-diarrhéiques, anti-dandruffs, anti- rhumatismales, anti-inflammatoires, cholagogues, cholérétiques, digestives, stomachiques, menstruelles, astringentes, hypotensives, antipyrétiques, cytotoxiques ainsi que anti-effets bactériens et sont utilisés seuls ou mélangés avec d'autres végétaux.

Certaines espèces sont populaires en Asie de l'Est, en Europe (Turquie et Espagne) et en Afrique de l'Ouest(Niger).En Inde, les fleurs de *C. cyanus* sont toniques, emmenagogues et stimulantes. Les fleurs sont légèrement astringentes. Par exemple, une préparation obtenue à partir de ces fleurs aconjunctivite et était connu en France sous le nom d'« Eau de Casse-Lunettes ». Les racines de *C. behen*, une espèce persane sont crédités de propriétés d'engraissement et aphrodisiaques et également utilisés dans le calculaffections et la jaunisse. *C. picris*, la plante pilée dans l'eau est utilisé pour guérir les vers et comme un remède pour blessures de moutons.

Les médecins traditionnels chinois avaient utilisé *C. uniflora* pour traiter la fièvre et l'intoxication. C.L'extrait d'uniflora contenant de l'acétate d'éthyle inhibe la peroxydation des lipides membranaires et présente des effets anticathérosclérotiques.

Dans la médecine populaire turque plusieurs espèces de *Centaurea* ont été particulièrement recommandées contre les états inflammatoires tels que les abcès (*C. iberica*), l'asthme (*C. iberica*) et pour réduire la fièvre (*C. calcitrapa* et *C. jacea*). *C. pulchella*, *C. drabifolia*, *C. solstitialis* ssp., *C. iberica* et *C. virgata* sont utilisés pour le traitement de l'ulcère gastroduodéal, du paludisme, du rhume, maux d'estomac, douleurs abdominales et infections herpétiques autour des lèvres.

Dans la région de Jakabszállás (Hongrie), la décoction des parties aériennes de *C. sadleriana* a été utilisée par voie topique pour le traitement des blessures du bétail (en particulier des moutons).

Les feuilles basales de *C. triumfettii* et de *C. urvillei* ssp. *stepposa* sont utilisées comme aliment et consommées fraîches. *C. pullata* est utilisé en Algérie dans la préparation avec d'autres plantes d'un plat traditionnel local appelé « El Hammama ».

En Espagne, l'infusion de *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima* et *C. melitensis* sont utilisées pour l'hypoglycémie.

Les utilisations les plus courantes de *C. ornata* sont ulcères et blessures. Il est également administré par voie topique dans les bains, les lavages, comme un cataplasme de la fraîche, séchée ou la racine rôtie et l'application de l'huile d'olive où les morceaux de racines avaient été préalablement frits. Pour les maux d'estomac ou les problèmes de circulation, il est administré par voie orale. En outre, dans Badajoz (Estrémadure, Espagne) il est utilisé contre les taches, les douleurs aux jambes, l'inflammation, les hémorroïdes, les piqûres d'insectes, irritation, rhumatisme, arthrose, douleur générale, circulation, maux d'estomac, cancer de la peau, gangrène, pour tout, panacée « remède universel ». *C. ornata* est également utilisé dans d'autres régions espagnoles et portugaises pour guérir les contusions, les entorses, l'arthrite, les rhumatismes ou purificateur de sang. *C. ornata* est un vétérinaire populaire : taches chauves, escarces, hématomes, blessures, irritations, maux d'estomac. [68] [70]

Tableau 3.1: Lactones sesquiterpéniques isolés de certaines espèces de Centaurea

Espèce	Composé	Référence
C. spinosa	cnicine 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-sonchucarpolide(4-epimalacitanolide) 8 α -O-(4-acéttoxy-2-hydroxyméthyl-buten-2-oyloxy)-4-epi- sonchucarpolidemalacitanolide 4'-acetoxymalacitanolide 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-déhydromélitensine 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-15-oxo-5,7 α H, 6 β H-éléman-1, 3,11(13)-trien-6,12-olide 8 α -O-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-buten-2-oyloxy)-saloniténolide 4'-acétoxycnicin 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyloxy)-6 α , 15—dihydroxyéléma-1, 3,11(13)-trien-12-oate	Saroglou et al. 2005
C. pamphylica	Pterodontriol	Shoeb et al. 2007a
C. hierapolitana	hierapolitanin A hierapolitanin B hierapolitanin C hierapolitanin D	Karamenderes et al. 2007
C. pullata	11 β , 13-dihydrocnicin 11 β , 13-dihydro-19 desoxycnicin 11 β , 13-dihydrosalonitenolid melitensin 8 α -O-(4-hydrxy-2methylene-butanoyloxy) melitensin 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro- sonchucarpolide 8 α -hydroxy-11 β , 13-dihydro-onopordaldehyde 8 α -O-(4-acetoxo-5-hydroxy-angeloyl)-11 β , 13-dihydrocnicin 8 α -O-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-butenoyloxy)- 11 β , 13-dihydro-sonchucarpolide 8 α -O-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-butenoyloxy)- 11 β , 13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide	Djeddi et al. 2008b

<i>C. grisebachii</i>	salonitenolide 8 α -O-[(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl- butenoyloxy) -aggeloyl]-salonitenolide 11 β , 13-dehydromelitensine 8 α -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylène-butanoyl)- 11 β , 13-dehydromelitensine 8 α - hydroxy-4- epi- sonchucarpolide malcitenolide 4- epi- malcitenolide 8 α -O-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-butenoyl)- 4-epi- sonchucarpolide 8 α -O-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl- butenoyle)-sonchucarpolide cnicin	Djeddi et al. 2008a
<i>C. musimomum</i>	Cynaratriol	Rodriguez et al, 2009
<i>C. solstitialis</i>	centaurpensin Chlorojanerin 13-acetyl solstitialin A	Özçelik et al, 2009
<i>C. lipii</i>	Cnicin	Mezache et al, 2010
<i>C. scabiosa</i>	Repin	Krasnov et al, 2011
<i>C. bella</i>	cebellin M	Nowak et al, 2011
<i>C. crocodylium</i>	Salonitenolide Cnicin	Ayad et al, 2012
<i>C. lusitanica</i>	Stenophyllolide	
<i>C. melitensis</i>	8 α -O-Isobutyroylsalonitenolide Actiopicrin Onopordopicrin Dehydromelitensin- β -hydroxyisobutyrate 8 α -O-(4- hydroxymehacrylate) melitensine	

Tableau 3.2: Flavonoïdes isolés de certaines espèces de *Centaurea*

Espèce	Composé	Référence
<i>C. grisebachii</i>	salvigenin jaceosidin cirsilineol eupatorin 5-hydroxy,6,7,30,40- tetramethoxyflavone	Djeddi et al, 2008a
<i>C. africana</i>	4'- methylgossipetine	Seghiri et al, 2009 algerianine
<i>1C. urvillei</i>	naringenin-7-O-b-D- glucuronopyranoside 6- hydroxykaempferol-7-O-b-D- glucuronopyranoside	Gülcemal et al., 2010

	hispidulin-7-O-b-D-glucuronopyranoside apigenin-7-O-b-D-methylglucuronopyranoside hispidulin-7-O-b-D-methylglucuronopyranoside hispidulin-7-O-b-D-glucopyranoside apigenin-7-O-b-D-glucopyranoside kaempferol apigenin luteolin eriodictyol-7-O-b-D-glucuronopyranoside arbutin salidroside 3,5-dihydroxyphenethyl alcohol-3-O-b-D-glucopyranoside	
<i>C. ensiformis</i>	vicenin-2 schaftoside neoschaftoside chrysoeriol 7-O-rutinoside	Erel et al, 2010
<i>C. sulphurea</i>	cirsilineol jaceosidin 3-O-methyl-eupatorin	Kabouche et al, 2011
<i>C. spruneri</i>	Nepetin Eupatilin eriodictyol	Ciris et al, 2011
<i>C. marocana</i>	4,5-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone 4,5,7-trihydroxy-3,6dimethoxyflavone 4,5,7-trihydroxy-6-methoxyflavone 4,5,7-trihydroxyflavone 4,5,7-trihydroxy-3-methoxyflavone	Bicha et al., 2011
<i>C. nicaeensis</i>	apigenin 4'-(6''-methylglucuronide) cirsilineol jaceosidin melitensin apigenin apigenin 7-(6''-methylglucuronide) prunasin	Hammoud et al, 2012
<i>C. omphalotricha</i>	oroxylin A chrysin tenaxin II 5,7,2'-trihydroxyflavone	Mouffok et al, 2012
<i>C. melitensis</i>	Quercetin Hispidulin neptin Protocatechuic acide	Ayad et al, 2012.

Tableau 3.3 : Lignanes isolés de certaines espèces de Centaurea

Espèce	Composé	Référence
<i>C. zuccariniana</i>	arctiin	Koukoulitsa, 2006; Erdemgil et al., 2006
<i>C. ptosimopappa</i>	matairesinol arctigenin	Celik et al., 2006
<i>C. americana</i>	americanin arctiin arctigenin matairesinol matairesinoside lappaol A	Shoeb et al 2006b
<i>C. bornmuelleri</i> , <i>C. dealbata</i> , <i>C. hubermorathii</i> , <i>C. macrocephala</i> , <i>C. nigra</i> , <i>C. scabiosa</i> , <i>C. sclerolepis</i> and <i>C. schischkinii</i>	matairesinoside	Shoeb et al., 2007b
<i>C. grisebatchii</i>	Arctigenin dimethylmatairesinol	Djeddi et al., 2008a
<i>C. eniformis</i>	dihydrodehydrodiconiferylalcohol-4-O- b-D-glucopyranoside	Erel et al., 2010
<i>C. iberica</i>	dehydrodiconiferylalcohol-90- metoksi-4-O-b-D-glucopyranoside (3R,4R)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-(4- {[5-{{6-(4-{{(3R,4R)- 4-(3,4-dimethoxybenzyl)-2- oxotetrahydro- 3-furanyl]methyl}-2-methoxyphenoxy)- 4,5-dihydroxy-2- (hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3- yl] oxy}-3,4-dihydroxy-6- (hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2- yl]oxy}-3-methoxybenzyl)dihydro-2- (3H)-furanone	Khan et al., 2011

Tableau 3.4: Coumarins isolés de certaines espèces de Centaurea

Espèce	Composé	Référence
C. eniformis	scopolin	Erel et al., 2010
C. spruneri	Scopoletin isoscopoletin	Takeli et al., 2011

Tableau 3.5 : Alcaloïdes indoles isolés de certaines espèces de Centaurea

Espèce	Composé	Référence
C. schischkini	Schischkiniin	Shoeb et al. 2005
C. montana	montanoside	Shoeb et al. 2006a

3.4 Propriétés phytochimiques :

Des recherches antérieures sur les composés phytochimiques non volatils du genre *Centaurea* ont révélé généralement l'isolement des lactones sesquiterpéniques, des flavonoïdes, des lignanes et leurs glycosides. En outre, les coumarins et rarement les alcaloïdes indoles. Toutefois, les lactones et les flavonoïdes sesquiterpènes sont les principaux constituants des espèces *Centaurea* (Ismail et al. Sesquiterpene lactones (SLs) forment un groupe important d'environ 3000 substances connues et décrit dans les anciens traités « Matériel médical » sous le nom « principes amers ». Ils avaient une distribution botanique assez sporadique, et majoritairement présente dans Asteraceae. Les LS sont situés dans les poils sécrétoires situés sur les feuilles, les tiges et les bractées. Beaucoup d'entre eux sont utilisés dans la médecine populaire, sont par ordre de leur abondance, guaianolides, germacranolides, elemanolides et eudesmanolides. Des flavonoïdes ont été signalés dans de nombreux taxons de *Centaurea*. Près de 80 ont été étudiés pour leur teneur en flavonoïdes, isolés des feuilles, des pousses et parfois des racines de nombreuses espèces de *Centaurea*, et identifiées comme des flavones, du flavonol, des 6-désoxyflavones et leurs O- et C-glycosides. [69].

3.5 Activité biologique :

3.5.1. Activité Anti-Ulcerogène

Auparavant, les parties aériennes de *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* utilisées comme un remède populaire anti-ulcère turc, la chlorojanérine et la 13-acétyl solstitialine A, présentaient une puissante activité anti-ulcérogène, alors que celle de la solstitialine A était faible. Gurbuz et Yesilda ont montré que la chlorojanérine et un mélange de 13-acétyl solstitialine A (95%) et de solstitialine A (5%) [13-AcsA + sA], avait un profil d'activité anti-ulcères différent chez le rat et la souris. La chlorojanérine a révélé une inhibition de l'éthanol (EtOH) par voie orale et sous-cutanée, indométhacine, indométhacine plus HCl/EtOH, NG-nitro-l-arginine méthylester plus EtOH, N-éthylmaleimide plus EtOH, stress lié à l'immersion dans l'eau et à la retenue de sérotonine, inhibition supplémentaire de l'acidité gastrique titrable et la production d'acide, et l'augmentation du pH gastrique, mais n'a eu aucun effet sur la ligature pylorique, diéthylthiocarbamate, cystéamine, volume de sécrétion gastrique ou activité peptique. [13-AcsA + sA] a montré une inhibition significative contre l'EtOH (administration orale seulement), a également été trouvé pour être actif dans prévenir les lésions induites par l'indométhacine, l'indométhacine plus le HCl/EtOH, le NG-nitro-l-arginine méthylester plus EtOH, N-éthyl-maléimide plus EtOH, immersion dans l'eau et contrainte, sérotonine et cystéamine, inhibition supplémentaire de l'acidité gastrique titrable et de la production d'acide titrable, et pH gastrique, au contraire, il n'a eu aucun effet sur le pylorique induit par la ligature et le diéthylthiocarbamate, également inefficace dans le volume de sécrétion gastrique et l'activité peptique. Évaluation de la toxicité des composés n'ont montré aucun effet toxique chez les souris. Les auteurs ont suggéré que l'inhibition des lésions peuvent être dues à l'effet neutralisant de la chlorojanérine et [13-AcsA + sA] sur l'acide gastrique et probablement pas par un mécanisme antisécrétoire. [71] [96]

3.5.2. Activité allélochimique

Dans un essai biologique en laboratoire, Meepagala ont montré que la cnicine, un flétole de lactone séquiterpénique, était de *C. maculosa*, avait été montré des mortalités significativement plus élevées contre formosan souterrain termites (*Coptotermes formosanus*). D'autre part, la cnicine isolée de *C. diffusa* a eu un effet sur la germination du soja (*Glycine max*) et du radis (*Raphanus sativus*) au moyen d'un procédé isotherme. Les

résultats obtenus indiquent que la cnicine bloque l'absorption d'eau par les racines, inhibant la croissance subséquente des semis, mais n'ayant eu aucun effet pendant la germination. *C. stoebe* est l'un des meilleurs exemples d'interactions plante-plante négatives médiées par les phytotoxines, également appelées allélopathies. est un flavanoïde naturel impliqué dans les interactions allélopathiques potentielles de *C. stoebe*. Cet effet négatif peut être dû en partie à la libération de la catéchine racémique, la (+)l'énantiomère possède des propriétés antimicrobiennes, mais l'énantiomère (-) est phytotoxique et réduit la croissance d'une autre plante appliquée au sol.

Selon Bais et Kaushik, modèles de mortalité racinaire vérifiés par des films en accéléré, dans lesquels *Arabidopsis thaliana* et *Festuca idahoensis* semis traités avec catéchine (100 µgml⁻¹), (-) catéchine (10 µgml⁻¹) et (+) la catéchine (200-250 µgml⁻¹) a été transférée le jour 3 dans des plaques moyennes Murashige et Skoog (MS) sans catéchines. Les résultats ont démontré que les semis traités avec (-) la catéchine ont une mortalité plus élevée que celle des racines traitées à la catéchine (+). De plus, l'effet phytotoxique a été manifeste également en phase aqueuse et organique contre *A. thaliana* et *F. idahoensis*. La catéchine appliquée aux racines de *A. thaliana* a induit des espèces réactives d'oxygène (ROS) confirmant le pro-l'oxydant nature oxydante de la catéchine. De plus, l'activation des gènes de mort des cellules signature, comme *acd2* et *cad1*. Le traitement post-catéchine chez *A. thaliana* a permis de déterminer la nature phytotoxique de la catéchine. [72]

3.5.3. Activités anti-bactériennes, anti-Fungal et anti-Viral

Les dix lactones sesquiterpènes : 11β, 13-dihydrocnicine, 11β, 13-dihydro-19 desoxycnicin, 8α-O-(4-acéttoxy-5-hydroxy-angeloyl)-11β, 13-dihydrocnicine, 8α-O-(4-acéttoxy-2-hydroxyméthyl-butenoyloxy)- 11β, 13-dihydro- sonchucarpolide, 8α-O-(4-acéttoxy-2-hydroxyméthyl-butenoyloxy)-11β, 13-dihydro-4-epi-sonchucarpolide, 11β, 13-dihydrosalonitenolid, mélétrtensine, 8α-O-(4-hydroxy-8α-hydroxy-11β, 13-dihydro-sonchucarpolide, 8α-hydroxy-11β, 2 éthylène-butanoyloxy)melitensine, 13-dihydro-onopordaldehyde isolé de *C. pullata* avait été testé sur six souches bactériennes : *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas tolaasii* (isolé d'*Agaricus bisporus*), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 10907), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) et *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) et huit espèces fongiques : *Alternaria alternata* (DSM 2006), *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Fusarium tricinctum*

(CBS 514478), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrocloron* (ATCC 9112) et *virure de trichoderme* (IAM 5061), ont démontré un effet anti- significatifles activités microbiennes et antifongiques selon la méthode de microdilution. La streptomycine et le miconazole étaient utilisés comme témoins positifs. 13-Acetylsoistialin A, un lactone sesquiterpens isolé des parties aériennes de *C. solstitialis* L.ssp. *solstitialis*, a affiché une activité antibactérienne remarquable contre des souches isolées d'*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) à une concentration de 1 mg/ml, qui était proche des concentrations d'ampicilline. Le même composé a également montré une activité anti-virale significative contre l'herpès simplex de type 1, un ADN virus, étant aussi puissant que le composé de référence acyclovir aux concentrations maximales et minimales de 16 à 0,00006 µg/ml.

Cansaran et al. (2010) ont montré que les extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol de *C. cankiriense* inhibe la croissance de treize bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-23), *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Morganella morganii* (isolée de l'urine humaine), *Yersinia enterocolitica* (RSKK 1501), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 27736), *Proteus vulgaris* (RSKK) 96026), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *S. aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (NRRL)B-4375), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (RSKK 863) et *Listeria monocytogenes* (Li6), en utilisant la méthode de diffusion sur disque unique. Les valeurs MIC des extraits d'acétate d'éthyle ont été déterminées comme étant 250 µg/ml pour *Escherichia coli* et 62,5 µg/ml pour *Staphylococcus aureus*. De plus, l'extrait de fleur de *C. cankiriense* avait affiché le plus fort effet sur *Bacillus cereus* à une concentration de 7,8 mg/ml. De plus, l'extrait de méthanol inhibait toutes les bactéries sauf *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumonia*.

L'activité antibactérienne et antifongique de la scopoletine, de l'isoscopoletine, de l'acide protocatéchuic, de l'acide isovanillique et de l'eriodytyol isolés des parties aériennes de *C. spruneri* testés contre huit bactéries et huit espèces fongiques : *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Proteus mirabilis* (isolé cliniquement), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (isolé cliniquement), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. flavus* (ATCC 9170), *A. fumigatus* (souche clinique), *Candida albicans* (souche clinique), *Penicillium funiculosum* (ATCC 10509), *P. ochrocloron* (ATCC 9112), *Trichoderma viride* (IAM5061), démontré que tous les composés testés présentaient des

activités antibactériennes et antifongiques modérées en utilisant la méthode de microdilution. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide l'activité antibactérienne la plus forte. *Bacillus cereus* était l'espèce bactérienne la plus sensible. Eriodictyol possédait la meilleure activité antifongique, la majorité des composés a montré la pire activité contre *Aspergillus flavus*.

Les extraits de méthanol préparés à partir de huit *Centaurea* sp. (*C. balsamita*, *C. calolepis*, *C. cariensis* ssp. *maculiceps*, *C. cariensis* ssp. *microlepis*, *C. kotschy* var. *kotschy*, *C. solstitialis* ssp. *solstitialis*, *C. urvillei* ssp. *urvillei* et *C. virgata*) ont montré un effet antibactérien contre quatre bactéries (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) utilisant la technique de microdilution. *C. cariensis* ssp. *La microlepis* avait montré un effet antimicrobien sur tous les microorganismes analysés

Ces études et d'autres études antérieures ont révélé que l'anti-microbien et l'antifongique activités des espèces de *Centaurea* sont principalement dues à leur teneur élevée en lactones sesquiterpéniques. Beaucoup plus, les composés phénoliques contenant des groupes hydroxyles ont une meilleure activité antibactérienne (Mori, 1987), alors que l'activité antifongique était attribuée à l'absence de groupes polaires. [73] [74]

3.5.4. Activité antituberculeuse

Shoeb a observé que les extraits de dichlorométhane et de méthanol des parties aériennes de *C. pamphylica* a montré une activité antioxydante considérable avec une concentration requise de 50 % réduction (RC50) des valeurs des radicaux DPPH de $72,6 \times 10^{-2}$ et $47,3 \times 10^{-2}$ mg/mL respectivement. Trois principaux composants bioactifs de l'extrait de méthanol : matairesinoside, arctiin et matairesinol activité antioxydante significative avec des valeurs de RC50 de $2,2 \times 10^{-3}$, $16,0 \times 10^{-2}$, $2,3 \times 10^{-3}$ mg/mL respectivement, ces résultats ont atteint des résultats similaires à ceux de la littérature.

La catéchine, un flavan-3-ol exsudé par les racines de *C. stoebe*, a été testée dans quatre variantes du Essai de dégradation du désoxyribose : Essais de dégradation du désoxyribose ($H_2O_2/Fe^{3+}/Acide\ ascorbique$)(1) et les essais de dégradation du désoxyribose (H_2O_2/Fe^{3+}) (2) après 1 h de performance de notation, Essais de dégradation du

désoxyribose (Fe³⁺/acide ascorbique) (3) et essais de dégradation du désoxyribose (Fe³⁺)(4) après 16 h de pointage, la performance dépendait de l'oxydation de l'oxygène diffusé de l'air et eau pour remplacer H₂O₂. La dégradation du 2-D-désoxyribose quantifiée par la formation de malondialdéhyde (MDA) qui est formé par les radicaux hydroxyles générés dans la réaction de Fenton. Le test de désoxyribose offre la possibilité d'étudier l'effet de la substance d'essai lorsque le fer est soit chélaté par lui-même ou par l'EDTA. En concentrations de 2 à 500 µM, les variantes ont révélé que (-) la catéchine diminution de la formation de MDA en concentration plus élevée, l'effet était plus prononcé, lorsque Fe³⁺ a été chélaté par (-) catéchine que par EDTA. Acide ascorbique créé dans des variantes (1) et (3) certaines concentrations des radicaux hydroxyles qui produisent la formation de MDA. Pendant que (-) la catéchine éduqués efficacement les radicaux hydroxyles ont donc un effet antioxydant puissant.

Zengin a évalué l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de trois *Centaurea* sp. en utilisant les essais suivants : essai de phosphomolybdénum, activité de balayage des radicaux libres (DPPH essai), essai de blanchiment au bêta-carotène/acide linoléique, essai de réduction cuprique au fer (III). *C. pulchella* a présenté la plus forte capacité antioxydante par rapport aux deux autres *Centaurea* sp. comme suit *C. pulchella* > *C. patula* > *C. tchihatcheffii*.

Les extraits hydroalcooliques préparés à partir de fleurs et de tiges/feuilles de *C. americana* étaient étudiés à l'aide de la méthode de balayage radical DPPH. Avec Quercetin (contrôle positif), il a été observé que les deux extraits ont réduit les niveaux de DPPH de plus de 50 % avec 79,16 % d'extrait de fleurs suivi de 62,54,8 % d'extraits de tiges/feuilles à une concentration de 1000 µg/mL. Présence de quercétine DPPH radical scavenging de 90,080,9 % à une concentration de 1000 µg/mL.

Comprendre comment l'halophyte végétal réagit et s'adapte au stress de salinité; croissance relative des pousses taux (RGR), teneur en eau relative des feuilles (RWC), fluorescence chlorophyllienne (photosynthèse), ion concentrations, peroxydation des membranes lipidiques, activité de balayage des radicaux (OH.), proline, et système antioxydant : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxydase d'ascorbate (APX) et la glutathione réductase (GR) ont fait l'objet d'une enquête visant à déterminer la physiologie et la biochimie mécanismes de *C. tuzgoluensis* sous traitement au sel (150 et 300

mM NaCl pendant 7 et 14 jours). La proline osmoprotectante a aidé les cellules à maintenir le potentiel osmotique et s'est surtout accumulée 7 jours après le traitement. La salinité dans 300 mM a inhibé la croissance de l'halophyte en raison de l'osmotic et de l'ionique. Effets de la salinité et ont montré que cette espèce avait la capacité de réguler le transport de K^+ pendant le stress salin, malgré l'augmentation des concentrations de Na^+ et de Cl^- . Les traitements salins suggéraient différents antioxydants métabolismes en *C. tuzgoluensis*, y compris : SOD, CAT, enzyme APX et GR, et leurs isoenzymes en particulier Fe-SOD dans les feuilles. Ceux-ci ont été efficaces dans le balayage O_2^- et H_2O_2 radicaux induits selon les conditions de salinité (150 et 300 mM), tel qu'indiqué par le niveau de MDA maintenu à court terme. Le Fe-SOD, connu sous le nom d'isoenzyme dans le chloroplaste, a joué un rôle important contre stress oxydatif généré par le traitement au sel dans *C. tuzgoluensis*. À 300 mM, NaCl induit une stimulation des activités de la DOE et de l'APX n'étaient pas suffisantes par rapport au niveau de MDA et ont réduit la capacité de récupération H_2O_2 par CAT, entraînant probablement une augmentation de la production de OH. lors du traitement à long terme des sels (14 jours). Yıldıztuğay a suggéré que *C. tuzgoluensis* avait une tolérance beaucoup plus élevée à la salinité par rapport aux glycophytes tolérants au sel et il pourrait être étroitement lié à l'augmentation de la capacité d'anti-système oxydatif pour récupérer les espèces réactives d'oxygène (ROS) et l'accumulation de proline sous stress de salinité. [75]

3.5.5. Activités antisciceptives, antipyrétiques et antilogistiques

Administration perorale d'extraits, de fractions et de sous-fractions de parties aériennes et de racines de *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* et *C. depressa* ont été étudiés pour étudier les effets antinociceptifs et antipyrétiques sur des souris malades. La p-benzoquinone a été injectée par administration intrapéritonéale pour induire des contractions (mouvements de repli) pour l'activité anti-nociceptive. D'autre part, Freund complète le modèle de pyrexie induit par adjuvant (CAF) pour l'activité antipyrétique. L'acide acétylsalicylique a été utilisé comme contrôle positif pour les essais biologiques. ont montré que *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* et *C. depressa* possède des effets antinociceptifs et antipyrétiques significatifs. Extraits d'EtOH obtenus à partir de les parties aériennes des deux plantes, ont exercé une activité antinociceptive importante plus importante et proche de celle du composé de référence acide acétylsalicylique à la même dose sans induire lésion gastrique apparente. Alors que des extraits d'EtOH provenant de parties aériennes des deux plants de *Centaurea* ont une puissante activité antipyrétique, bien que moins puissante que l'acide

salicylique acétylique. Deux lactones sesquiterpéniques, la solstitialine A et la solstitialine d'acétyle, avaient été isolés et définis comme les composants actifs du *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* et *C. depressa*. Afin de déterminer les activités anti-inflammatoires et analgésiques chez les hommes albinos suisses, Koca a observé que l'extrait d'éthanol de la fleur de *C. tchihatcheffii* à 200 dose de mg/kg par administration orale, diminution significative de l'œdème induit par la carraghénane et prostaglandine-E2 (PGE2) dans le tissu sous-cutané de la patte arrière droite, d'autre part, l'extrait inhibition significative (35,3 %) de la constriction abdominale induite par la p-benzoquinone par voie intrapéritonéale. L'indométhacine et l'acide acétylsalicylique étaient les médicaments de référence pour les anti-inflammatoires et analyses analgésiques respectivement. Analyse par chromatographie en couche mince de l'extrait de fleur indiqua la présence de lactones sesquiterpéniques. [76]

3.5.6. Activité de guérison des plaies

Supor a évalué l'activité de cicatrisation de la partie aérienne de 5 extraits différents et fractions de *C. sadlerien* qui sont : CSE1 (extrait d'eau), CSE2 (extrait de méthanol), CSE3 (n-hexane fraction de l'extrait de méthanol), CSE4 (fraction chloroforme de l'extrait de méthanol), CSE5 (résidu de l'extrait de méthanol après extraction avec du n-hexane et du chloroforme) chez des rats Sprague-Dawley femelles.

En utilisant la méthode de Blazsó. Les animaux sont anesthésiés sous isoflurane (2,5 %) avant provoquant des blessures. Celles-ci, ont été induites symétriquement sur six différentes zones épilées par contact avec une marque de fer 100° C (r = 4mm) pour 5 s. L'application topique régulière à une concentration de 2,5 % dans un gel a été appliquée sur une surface de 15 cm² comprenant les six plaies de chaque rat deux fois par jour. Deux groupes utilisés comme témoins : un groupe a été traité avec du gel de carbomère pur seulement (contrôle du véhicule), et l'autre groupe n'a pas été traité du tout (contrôle absolu). Un troisième groupe a été traité avec 1 % de salicylique gel acide comme contrôle positif. Le temps de cicatrisation a été donné que le nombre de jours requis pour 50% des croûtes pour se séparer spontanément des animaux. Les résultats ont fraction de l'extrait de méthanol (CSE-3) a considérablement accéléré la cicatrisation de la plaie par rapport à groupe du véhicule; cet effet était assez semblable à celui du témoin positif. D'autres fractions activités plus modérées. [77] [90]

3.5.7. Activité Anti-Platelet

L'activité anti-plaquettaire de (3R,4R)-4-(3,4-diméthoxybenzyl)-3-(4-{{[5-{{[6-(4-{{[(3R,4R)-4-(3,4-)diméthoxybenzyl]-2-oxotetrahydro-3-furanyl)méthyl]-2-méthoxyphénoxy)-4,5 dihydroxy-2-(hydroxylmethyl) tétrahydro-2H-pyran-3-yl]oxy}-3,4-dihydroxy-6 (hydroxyméthyl)tétrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy}-3-méthoxybenzyl)dihydro-2-(3H)-furanone, un nouveau glucoside de lignane dimérique et deux Composés azotés :

3-méthyl-2-benzyl-4-quinazolone et méthyl-2 [(méthylamino)carbonyl]benzoate, isolé de la fraction soluble de l'acétate d'éthyle de *C. iberica*, ont été étudiés par prétraitement du plasma riche en plaquettes (PRP) à l'aide du Lumi-aggregometer à deux canaux pour la surveillance de l'agrégation avec diverses concentrations des inhibiteurs pendant 1 min, suivie de l'ajout d'acide arachidonique. L'agrégation résultante a été enregistrée pendant 5 minutes après le changement dans la transmission de la lumière en fonction du temps. L'activité anti-plaquettaire de divers inhibiteurs contre les agonistes a été établie et des courbes dose-réponse ont été effectuées pour calculer les valeurs CI50.

Des agonistes et des composés. L'aspirine, un antiplaquettaire efficace, a été prise comme médicament de référence. Tous les composés présentaient une inhibition significative de l'agrégation plaquettaire, ce qui a incité Khan et al. (2011) que cet effet est causé par l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase responsable de la synthèse de thromboxane A₂. [78] [85]

3.5.8. Activité hépatoprotectrice

Gonzales a observé que les extraits hydroalcooliques de la fleur de *C. americana* et de la feuille de la même plante à 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL étaient efficaces contre le carbone tétrachlorure (CCL₄) qui a causé des lésions hépatiques sur une lignée cellulaire d'hépatome humain (Huh7). Les concentrations d'aminotransférase (AST) et de malondialdéhyde (MDA) étaient significativement élevées après le traitement avec CCl₄. Lorsque des extraits ont été ajoutés aux cellules, l'AST et la MDA ont diminué de façon exponentielle. La silibinine a été prise en tant que témoin positif. Les résultats obtenus indiquent que l'effet peut être dû à l'activité antioxydante. [79] [89]

3.5.9. Activité de prévention

L'extrait chloroforme des parties aériennes de *C. musimomum* a été évalué par rapport à *Plasmodium falciparum*. L'échantillon d'essai a montré une activité antiplasmodique significative à la CI50 de 3,16 µg/ml.

Les extraits de méthanol des parties aériennes de *C. bruguieriana* et *C. golestonica* exposés dans l'activité anti-plasmodique vivo contre les souches 3D7 de *Plasmodium berghei* avec CI50 de 36,9 µg/ml de *C. bruguieriana* et IC50 de 31,6 µg/ml de *C. golestonica*. De plus, *C. golestonica* était actif contre K1 souches de *Plasmodium berghei* à la CI50 de 35,6 µg/ml. [100]

3.5.10. Activité cytotoxique

Medjroubi a évalué l'effet cytotoxique de l'extrait chloroforme des parties aériennes du *C. musimomum* contre les cellules dérivées du carcinome du nasopharynx chez l'humain (Ko). Les résultats ont révélé une activité cytotoxique importante avec inhibition de la croissance de 89 % à 10 µg/ml et de 26 % à 1 µg/ml.

L'extrait brut de *C. ainetensis* s'est révélé efficace contre les cellules cancéreuses du côlon humain HCT-116 (p53+/+) à des concentrations non cytotoxiques de cellules épithéliales intestinales humaines normales. Il a causé une apoptose, augmenté le rapport Bax/Bcl-2, les taux de protéines p53 et p21 et réduit la cycline B1 in vivo, l'extrait brut injecté par voie intrapéritonéale avant l'injection sous-cutanée de 1,2-diméthylhydrazine cancérogène, a réduit considérablement la taille moyenne des foyers de crypte. Salograviolide A, un lactone sesquiterpénique, a été identifié comme le composé bioactif de l'extrait brut, qui a induit l'apoptose et l'inhibition de la croissance des lignées de cellules cancéreuses du côlon. [98]

L'algérienne, un nouveau glucoside flavonoïde acylé isolé de *C. africana*, a cytotoxicité contre la leucémie myéloïde humaine HL-60 à CI50 de 26,1 mM. La viabilité des cellules était étudiée à l'aide de la réduction du bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényle tétrazolium (MTT) essai. Ce test colorimétrique implique la conversion de MTT en un dérivé de cristaux de formazan pour préparer le succinate de mitochondrie

déshydrogénase, qui n'est présent que dans les cellules viables. Cellules HL-60 (1 104) ont été traités avec diverses concentrations d'algérienne à 100 ml pendant 72 h à 37 °C dans une microculture à 96 puits. On a mesuré l'absorbance à 570 nm pour calculer la viabilité des cellules.

Les extraits de n-hexane, de chloroforme et de méthanol aqueux de la plante entière de *C. arenaria*, ont été évalués pour l'activité cytotoxique contre l'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa), l'adénocarcinome du sein (MCF7) et le carcinome épidermoïde de la peau (A431) des cellules, à l'aide du test MTT. L'extrait de chloroforme a démontré une forte activité inhibitrice de la prolifération des cellules tumorales (supérieure à 85 % à 10 g/ml de concentration) et a été soumis à une procédure de séparation en plusieurs étapes guidée par des essais biologiques. Les flavonoïdes eupatilin, eupatorin et apigenin, le cnicine sesquiterpène, et les lignans arctigenin, arctiin et le matairesinol s'est révélé être des constituants antitumoraux des fractions actives. Le 3-méthyleupatorin, isokaempferid, moschamine, cis-moschamine, -amyrine et -sitosterin- -D glycopyranoside, ont montré des effets faibles ou nuls sur les lignées cellulaires HeLa, MCF7 et A431.

Activité cytotoxique de la cnicine, isolée de *C. calolepis* une espèce endémique de l'Anatolie était observé sur l'épithélium du rein de porc (LLC-PK), le mélanome malin humain (SK-MEL) et cellules de carcinome canalaire humain (BT-549) avec des valeurs de CI50 de 23,3, 14,0 et 18,3 μM , respectivement. En outre, la cnicine a montré une inhibition du facteur nucléaire (NF- κB) et une inhibition de l'oxyde nitrique inducible activité de la synthase (iNOS) avec des valeurs de CI50 de 1,8 et 6,5 μM , respectivement. Onopordopicrine et cnicine, isolées des extraits chloroformes des deux mauvaises herbes *C. tweedii* et *C. diffusa*, ont montré une cytotoxicité élevée contre les macrophages d'origine humaine. [86]

Activité anti-proliférative de l'aguérine B et d'un nouveau lactone rare ni-guaianolide isolé des parties aériennes du *C. deflexa* ont été évaluées par rapport aux cellules cancéreuses du pancréas et a révélé que seule l'aguérine B était efficace pour provoquer la mort cellulaire apoptotique. 15-nor-guaianolide et aguerin B appartient à la fois à la famille guaianolide et possède un double lien à C-10 mais seulement aguerin Ba une molécule α -méthylène- γ -lactone et un groupe ester au C-8. Ces différences peuvent expliquer la puissance antiproliférative différente et le rôle différent de l'apoptose dans leurs effets cytotoxiques. [91] [80]

3.5.11. Activité antisyndicale

Le kaempférol, était l'agent antiproteasomal le plus actif sur les cellules du cancer du sein humain du MCF7, suivi de l'apigénine, de l'eriodictyol-7-O-b-Dglucuronopyranoside, de l'alcool 3,5-dihydroxyphénylique-3-O-b-Dglucopyranoside et salidroside, respectivement isolés de la partie aérée de *C. urvillei* ssp. *urvillei*. Les concentrations de protéines polyubiquitinées totales ont été déterminées par immunotransfert avec anticorps anti-polyubiquitine. Alors que la charge en protéines était contrôlée par immunoblotting avec un anticorps anti-actine. Mg132, a été utilisé comme un témoin positif pour l'inhibition protéasomique. La densité de laes protéines des échantillons traités avec des composés ont été comparées aux protéines ubiquitées totales de les échantillons traités avec seulement du DMSO. Les résultats de une activité plus puissante du protéasome inhibiteur et une accumulation de protéines ubiquitées à 0,5 μ M concentration. [97]

Chapitre 4 : matériel et méthode

4.1 Matériel et méthode :

A. Matériel :

a) Matériel végétale :

L'espèce que nous avons étudiée est : les centaurea sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. C'est une plante médicinale reconnue pour son utilisation dans le traitement de certaines maladies digestif grâce à des propriétés apéritives et fébrifuges. Cette espèce est récolté au mois de Mars dans les montagnes de Menacer, wilaya de Tipaza (Algérie) et cette espèce n'a pas été identifier par les herbiers de L'INRF et de L'INA c'est une sp.

Les racines de cette plante sont découpées, séchées à 45 °C pendant 24h, ensuite réduites en poudre. La poudre est macérée dans trois solvants de polarité croissante, hexane Dichlorométhane et éthanol, pendant 48 h, concentrée par évaporation rotative. Les extraits bruts obtenus sont conservés à 5°C.



Figure 4.1:racine de centautéa

b) Réactif chimique :

- Les solvants suivants ont été employés pour l'extraction : Ethanol, Eau, n-Hexane et Dichlorométhane
- Réactif utilisés pour l'activité anti-oxydante : Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Acide ascorbique et Méthanol
- Réactifs suivants ont été employés dans les expériences du dosage des polyphénols totaux (PPT) : Folin-Ciocalteu, Bicarbonate de sodium, Acide gallique et Méthanol
- Réactif utilisés pour le procédé de formulation : Span 80, Tween 80, Gélatine, L'huile de paraffine, Xanthane-aldehyde et éthanol

Tableau 4.1 : Réactif chimique

Produit	Formule	Marque	Payé fabricant
éthanol	C ₂ H ₅ OH	EDEN LABO	Algérie
Héxane	C ₆ H ₁₄	FLUKA	Suisse
Dichloromethane	CH ₂ CL ₂	FLUKA	Suisse
Méthanol	CH ₃ OH	BIOCHEM Chempharma	France
Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	SIGMA-ALDRICH	USA
Folin-Ciocalteu	C ₁₀ H ₅ NaO ₅ S	SIGMA-ALDRICH	USA
Bicarbonate de soduim	NaHCO ₃	EDEN LABO	Algérie
Span 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	SIGMA-ALDRICH	USA
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	SIGMA-ALDRICH	USA
Gélatine	C ₁₀₂ H ₁₅₁₀₃₉ N ₃₁	BIOCHEM	France
Xanthane-aldéhyde	C ₃₅ H ₄₉ O ₂₉	Chef fluca	Algérie
L'huile de paraffine	C _n H _{2n+2}	Labo GILBERT	France
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	SCHARLAU	Espagne
Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆	Louis FRANCOIS	France

c) Animaux :

L'espèce que nous avons effectué l'étude pharmacocinétique in-vivo est les souris de souche *Mus musculus* est un mammifère de 7 à 10 centimètres de long pour un poids de 20 à 50 grammes environ. Elle possède un museau pointu et une queue qui peut être aussi longue que son corps. Et nous avons utilisées 50 souris (males : 25, femelles : 25).

4.2 Extraction des molécules bioactives :

Nous avons préparée 4 extraits avec 4 solvants (Ethanol, n-Hexane, Dichlorométhane, eau) afin de faire une étude comparative.

A. Préparation par extracteur soxhlet :

Nous avons Placé la poudre des racines de la plante centaurea dans la cartouche de cellulose, puis dans le réservoir de soxhlet. Nous avons rempli le ballon avec 350 ml de solvant et nous avons surmonté l'extracteur d'un réfrigérant. A l'aide d'un chauffe-ballon, nous avons porté le solvant à ébullition. Celui-ci passe par la tubulure 1 et est condensé par le réfrigérant. Il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire. Le réservoir se remplit. Dès que le niveau de solvant est à hauteur du coude 2, le réservoir se vidange automatiquement. Le solvant et la substance à extraire sont entraînés dans le ballon concentré par évaporation rotative pour avoir l'extrait brute.

a) Préparation par macération de l'extrait aqueux :

Une quantité de 25mg de la poudre deracine de Centauréa est mise à macérer dans 100 ml d'E.D à un rapport de 1/4 (P/V), pendant 24h à 80°C. L'extrait aqueux est récupéré dans un premier temps après filtration sous vide du mélange. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur marron, concentrée par évaporation rotative pour avoir l'extrait brute.

Tableau 4.2 : type des solvants pour l'extraction

Solvant	Type	Polarité	Température d'ébullition
Ethanol	Alcoolique	Polaire protique	78.37°C
Hexane	Alcalin	Apolaire	69°C
Dichlorométhane	Chloré	Apolaire	40°C
Eau	Hydraulique	Polaire protique	100°C

i. calcul du Rendement :

Afin d'avoir notre extrait sec, nous avons utilisé un évaporateur rotatif. Le poids en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant par évaporation rotatif) et le poids du ballon vide.

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante:

$$R = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_i} \times 100$$

M_{extrait} : la masse de l'extrait sec

M_i : la masse initiale de la matière végétale

4.3 caractérisation de l'extrait :

A. dosage des polyphénols totaux ppt :

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie UV-Visible de type SHIMADZU®, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [101]. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Le protocole utilisé a été basé sur le décrit de (Singleton et Ross, 1965) [102] en y apportant quelques modifications. Brièvement. Nous avons préparée une solution mère de 7mg/ml, ensuite par cette dernière des solutions filles de 5mg/ml, 3mg/ml, 1mg/ml et 0.5mg/ml ont été préparées, dans des tubes à essais 0.5ml de chaque solution a été prélevé et mélangé à 2.5ml de Folin-Ciocalteu 10% laissée incubée pendant 4min. après l'addition de 2.5ml de bicarbonate de sodium 7.5% on laisse incuber encore une fois 2 heures à l'ombre et à température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue en résultant a été mesurée au $\lambda_{\text{max}} = 765$ nanomètres avec un spectrophotomètre de Shimadzu UV-VIS. La quantification a été faite en ce qui concerne la courbe standard de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 100g d'extrait [103].

La préparation du blanc, nous avons prélevée dans un tube à essais 0.5ml de méthanol mélangé à 2.5ml de Folin-Ciocalteu et 2.5ml de bicarbonate de sodium.

B. évaluation de l'activité antioxydante DPPH :

Pour étudier l'activité antioxydante des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri, A., et al (2005) [104].

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [105]. Brièvement, 1ml de chaque échantillon a été prélevé et mélangé à 3ml de DPPH (0.004% préparée dans du méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1ml de méthanol avec 3ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. 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 et pour chaque concentration, le test est répété 3fois. . L'activité antioxydante est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\%d'activité\ antioxydante = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du blanc

Abs échantillon : absorbance de l'extrait

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

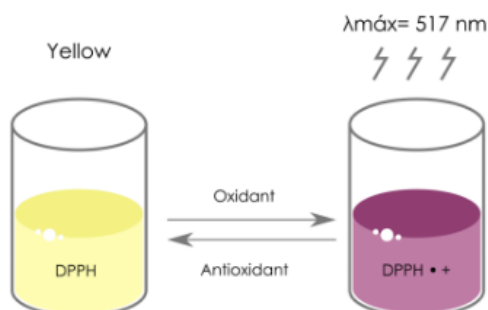


Figure 4.2 : réactif chimique du DPPH

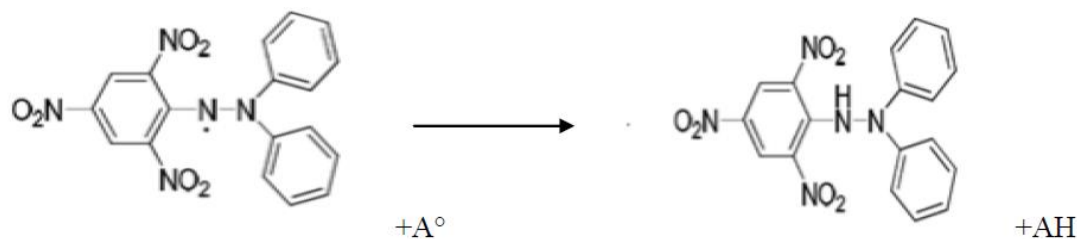


Figure 4.3: Forme réduite du radical DPPH

4.4 préparation des doubles émulsions :

4.1 La pré formulation :

a) Préparation de l'émulsion simple W_1/O :

- le span 20 est introduit dans 30ml d'huile de tournesol sous agitation mécanique
- ensuite 10ml de la phase aqueuse est ajoutée au mélange huile + span sous agitation mécanique pendant 30min à 50°C

Nous avons obtenus une emulsion simple instable (séparation de phase). nous avons remplacée le span 20 par le span 80 et l'huile de tournesol par l'huile de paraffine

b) Préparation de la phase externe W_2 :

- la gélatine est dissoute dans 10ml d'eau sous agitation mécanique à 50°C
- une solution de 0.3% de X-A avec un 1g de tween 80 est préparé

c) Préparation de la double émulsion $W_1/O/W_2$:

- L'émulsion simple et la solution de gélatine sont ajoutée goutte à goutte respectivement à la solution de X-A en maintenant l'agitation à l'aide d'un agitateur à hélices avec une intensité de 300 tr/min pendant 5minutes. Pour obtenir une double émulsion de type ($W_1/O/W_2$).

4.2 La formulation :

A. procédé générale :

Préparation de l'émulsion simple W_1/O :

Le span 80 est introduit dans l'huile de paraffine sous agitation mécanique avec une intensité de 600 tr/min pendant 10 minutes.

Nous avons introduit l'extrait dans l'éthanol (la quantité d'éthanol représente 50% du volume finale de la phase aqueuse) sous agitation mécanique avec une intensité de 600 tr/min pendant 20 min à 80°C, ensuite nous avons complétée le volume restant avec de

l'eau chauffée à 80°C.

La phase aqueuse est ajoutée goutte à goutte à la phase huileuse en maintenant l'homogénéisation à l'aide d'un homogénéisateur du type Ultra-Turrax avec une intensité de 6000 tr/min pendant 5 minutes.

d) Préparation de la phase externe W_2 :

Le Xanthane-aldéhyde et le tween 80 sont introduits dans l'eau sous agitation mécanique avec une intensité de 600 tr/min pendant 45 min à 80°C.

La gélatine est introduite dans l'eau sous agitation mécanique avec une intensité de 600 tr/min pendant 10 min à 80°C.

e) Préparation de la double émulsion $W_1/O/W_2$:

L'émulsion simple et la solution de gélatine sont ajoutées goutte à goutte respectivement à la phase w_2 en maintenant l'agitation à l'aide d'un agitateur à hélices avec une intensité de 300 tr/min pendant 5 minutes. Pour obtenir une double émulsion de type ($W_1/O/W_2$).

Après cette étape la double émulsion est introduite dans des tubes et flacons en verre pour les différents tests et contrôles. Ces échantillons doivent être conservés à température ambiante et dans un endroit sec pour l'étude de la stabilité physique et chimique.

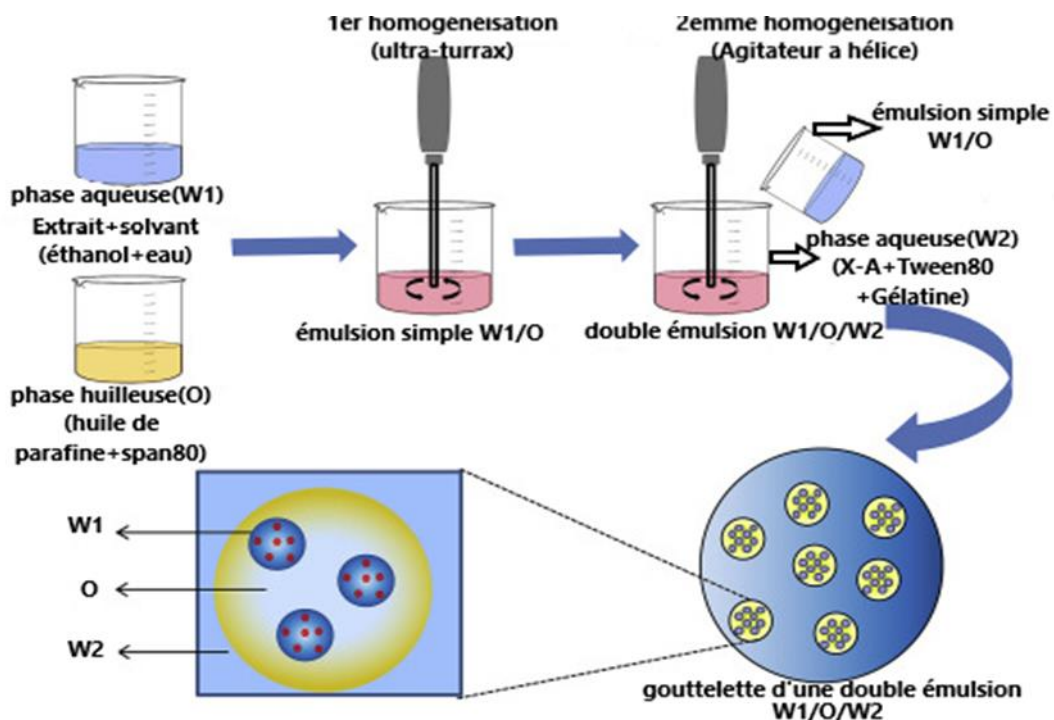


Figure 4.4 :procédé générale de la formulation de la double émulsion

B. optimisation du procédé de formulation :

Afin d'optimiser les paramètres de la formulation de la double émulsion (W1/O/W2), nous avons utilisé une conception factorielle complète avec 2 niveaux, 2 facteurs et 1 point au centre, 2^2+1 donc total de 5 expériences.

$$PEC = 2^2 + 1 = 5 \text{ essais}$$

Optimisation des paramètres de l'émulsion est donnée dans le (tableau 9).

Le premier facteur est la quantité de la gomme de Xanthan-Aldehyde dans la phase W2, son niveau haut (+1) est 0.7 et son niveau bas (-1) est 0.3. Le deuxième facteur est le Ratio PE:W2, son niveau haut (+1) est 1:1 et son niveau bas (-1) est 3:7

L'exploitation des résultats a été effectuée en utilisant le logiciel MODE6.0 (version 2001, Suède).

Tableau 4.3 : Optimisation des paramètres de l'émulsion

N°	Quantité de la gomme Xnathan-Aldehyde (F1)	(Ratio : PE W2) (F2)	F1	F2
1	+1	+1	0.7	1:1
2	-1	+1	0.3	1:1
3	+1	-1	0.7	3:7
4	-1	-1	0.3	3:7
5	0	0	0.5	4:6

4.3 Caractérisation de la double émulsion :

- **pH-mètre** de marque HANNA modèle HI208.
- **La granulométrie laser** La taille des gouttelettes a été déterminée à l'aide d'un instrument de la série Horiba Nano-Partica SZ100 zetameter (Horiba Instruments Inc, Irvine, CA, États-Unis) permet la mesure de la taille des particules de la solution diluée à 1/10 (V/V), Plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est grand.

- **Le potentiel zêta et conductivité** :Tout d'abord, les formulations ont été diluées à 1/10 (V/V), puis les solutions ont été introduites dans la cellule de mesure du potentiel zeta et ensuite le potentiel est mesuré à l'aide d'un instrument de la série HoribaNano-Partica SZ100 zetameter (Horiba Instruments Inc, Irvine, CA, États-Unis). Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C.
- **Microscope optique** :Les émulsions préparées ont été observées à l'aide d'un microscope Optika (Italie) équipé de camera. Les échantillons ont été observés à un grossissement de X40.

4.4 Evaluation de l'activité anti-ulcèreologique in-vivo :

A. Choix du modèle expérimental :

La souris de laboratoire est un modèle expérimental couramment utilisé pour son disponibilité aussi pour ces données physiologiques qui sont importants. Cependant, quelques limites existent dans ce modèle.

B. matériel biologique :

Nous avons utilisée 32 souris blanches de la souche *mus musculus*, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ages de 8-9 semaines, d'un poids vif moyen de (20 g). Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche.

C. Traitement des souris :

Les souris ont été réparties en 7 lots de 6 souris chacun, il s'agit de :

- ✚ **Lots1** : souris ont reçu une eau physiologique par gavage.
- ✚ **Lots2** : souris témoins négative (-) ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère.
- ✚ **Lots3** : souris témoin positive (+) ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère, après 15min nous avons traitée par homéprazol (50mg/kg) par gavage à l'aide d'une sonde gastrique.

- ✚ **Lots4** : souris ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère, après 15min nous avant traitée par l'extrait éthanoïque dissout dans l'eau distillée à une dose de (50 mg/kg) par gavage à l'aide une sonde gastrique.
- ✚ **Lots5** : souris ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère, après 15min nous avant traitée par la combinaison entre l'extrait éthanoïque dissout dans l'eau distillée à une dose de (150 mg/kg) par gavage à l'aide une sonde gastrique.
- ✚ **Lots6** : souris ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère, après 15min nous avant traitée par le placebo administrer par gavage à l'aide une sonde gastrique.
- ✚ **Lots7** : souris ont reçu de l'éthanol par gavage pour provoquer l'ulcère, après 15min nous avant traitée par double émulsion à une dose de (50 mg/kg) par gavage à l'aide une sonde gastrique.

Tableau 4.4 : les souris traitées

Numéro	Lot	Produit administré
1	physiologique	///
2	Témoin négative	Ethanol
3	Témoin positive	Ethanol + homépradol 50 mg/kg
4	Dose 1	Ethanol + 50 mg/kg de souris
5	Dose 2	Ethanol + 150 mg/kg de souris
6	Placebo	Ethanol + 0 mg/kg de souris
7	Double émulsion 1	Ethanol + 50 mg/kg de souris



Figure 4.5: Gavage d'une souris

f) Sacrifice et Dissection des organes :

Les animaux ont été anesthésiés par l'éther diéthylique, ensuite La dissection a été réalisée dans le but de prélèver les Organes (estomacs).



Figure 4.6 : Autopsie des souris et prélèvement de l'estomac

g) Détermination des pourcentages de l'ulcère et des pourcentages d'inhibition :

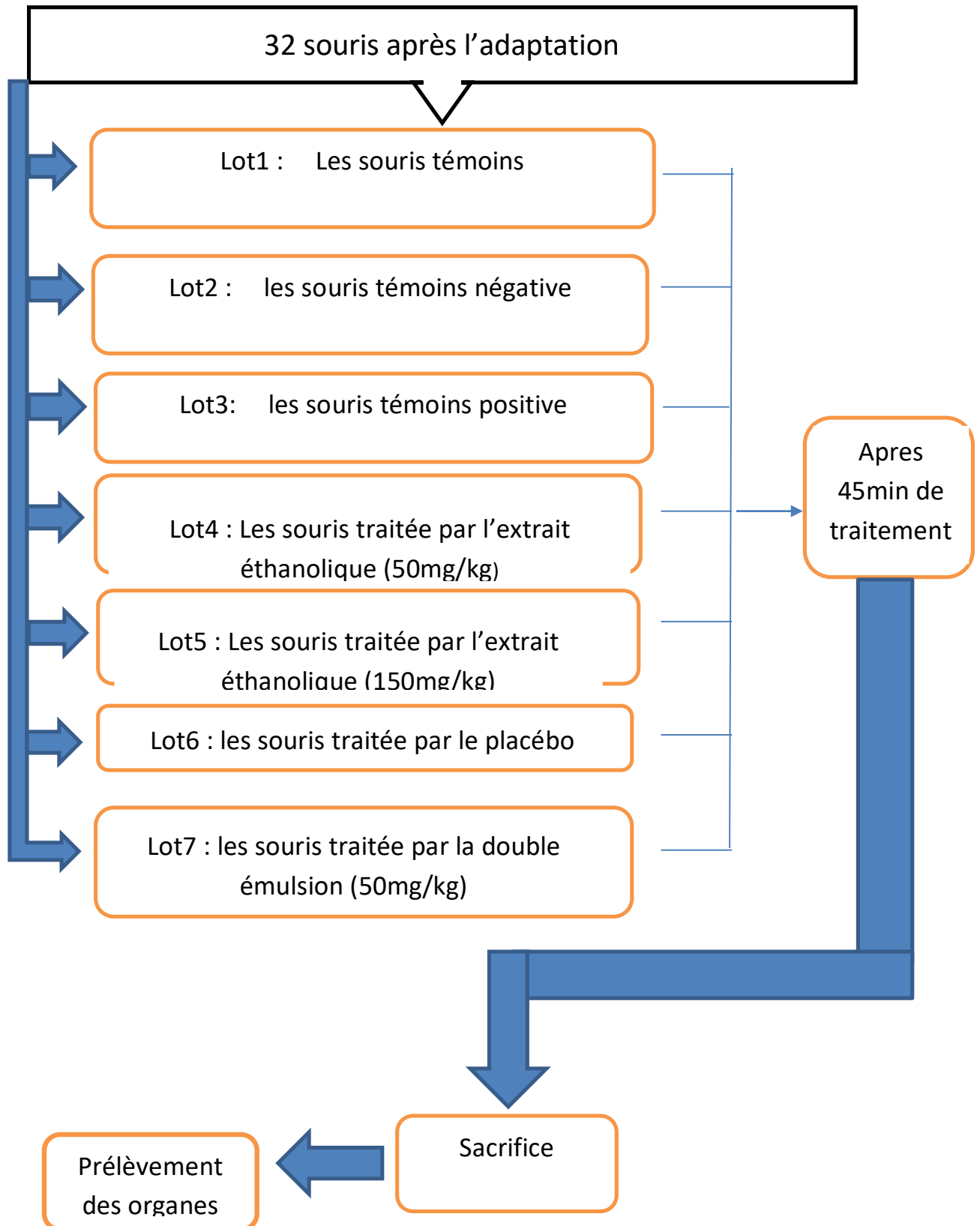
Les photographies prises des différents estomacs sont analysés par traitement d'image en utilisant le logiciel image-J afin de déterminer les pourcentages de l'ulcère (PU) en utilisant l'équation suivante.

$$PU = \frac{\text{surface d'ulcère}}{\text{surface de l'estomac}} \times 100$$

Les pourcentages d'inhibitions de l'ulcère (PIU) sont calculés pour chaque groupe en utilisant l'équation suivante.

$$PIU = \frac{PU(\text{témoin négatif}) - PU(\text{lot x})}{PU(\text{témoin négatif})} \times 100$$

Schéma 1 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental



Chapitre 5 : résultats et discussions

5.1 Extraction et caractérisation des molécules bioactives :

A. Effet des solvants sur le Rendement :

Le tableau représente les rendements des extraits obtenus avec les différents solvants.

Tableau 5.1 : Rendements des extraits à différents solvant

Solvant utilisée	Rendement	Aspect	Couleur
Ethanol	10.4%	Pâteux	Marron foncé
Dichlorométhane	1.872%	Pâteux	Marron claire
Hexane	2.096%	Pâteux	Marron claire
Eau	8%	Pâteux	Marron

Le tableau (5.1) représente les rendements des extraits en utilisant les différents solvants. Les solvants polaires protiques (eau et éthanol) permettent d'avoir les plus grands rendements.

B. Effet des solvants sur le PPT :

Les analyses quantitatives des phénols totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure5.1). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg EAG/g MS (Tableau5.2).

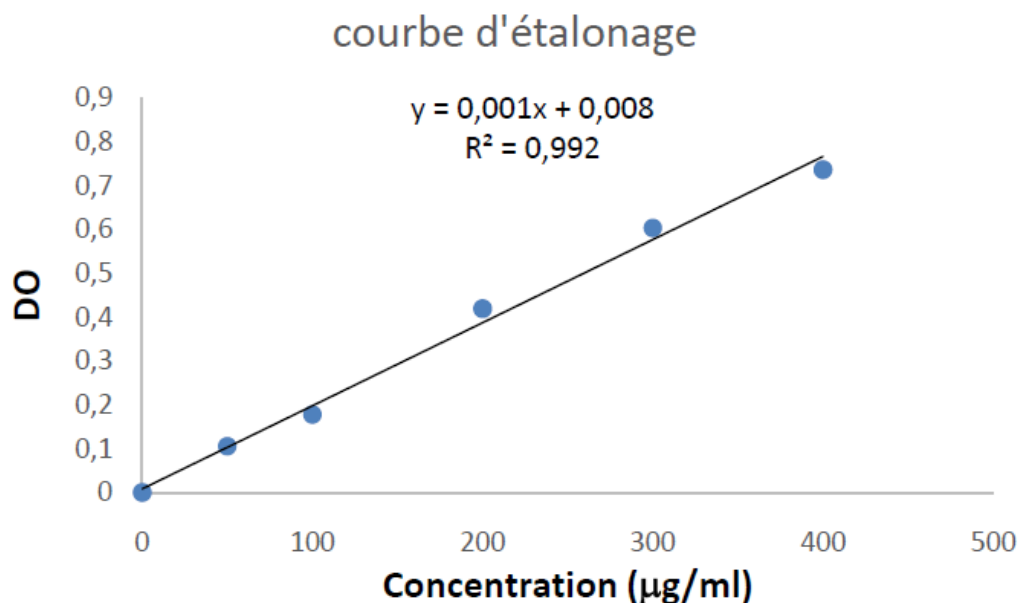


Figure 5.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 5.2 : Teneurs en phénols totaux des extraits de plante étudiée exprimée en (mg EAG/g MS)

Extrait	Quantité de PPT	Equation de la courbe	R ²
	(en mg EAG/g MS)		
Ethanol	1.675	Abs = 0,001[AG] - 0,031	0,996
Dichlorométhane	1.213		
n-Hexane	0.764		
Eau	1.600		

AG : acide gallique, **EAG**: équivalent d'acide gallique, **ES** : extrait sec, **MS** : matière sèche

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions varient entre 0.764 et 1,675 mg EAG/g ES. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait éthanolique, avec un taux de 1,675 mg EAG/g MS, par rapport aux extraits hexanique et Dichlorométhanolique et l'eau où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de 0,764 et 1.213 et 1.600 mg EAG/g MS respectivement.

D'après ces résultats, on déduit que la plante Centaurea SP est riche en molécule bioactives soluble dans l'éthanol

C. Effet des solvants sur l'activité anti-oxydante :

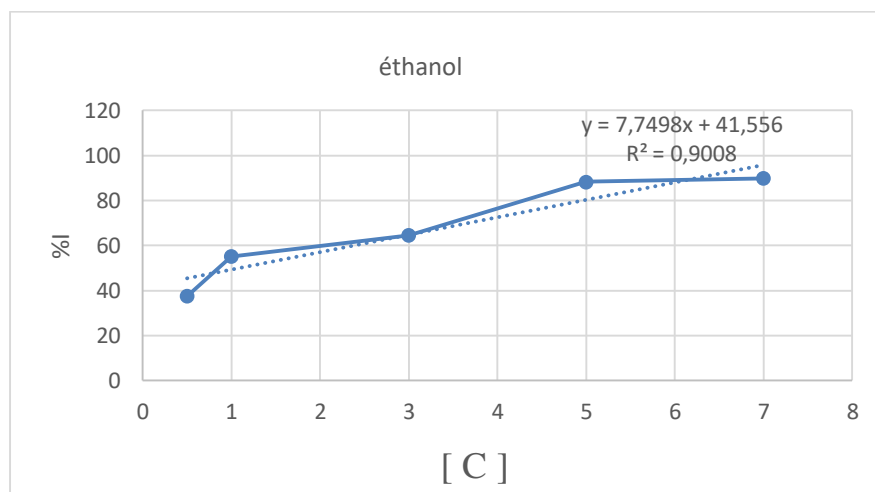


Figure 5.2 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait par éthanol

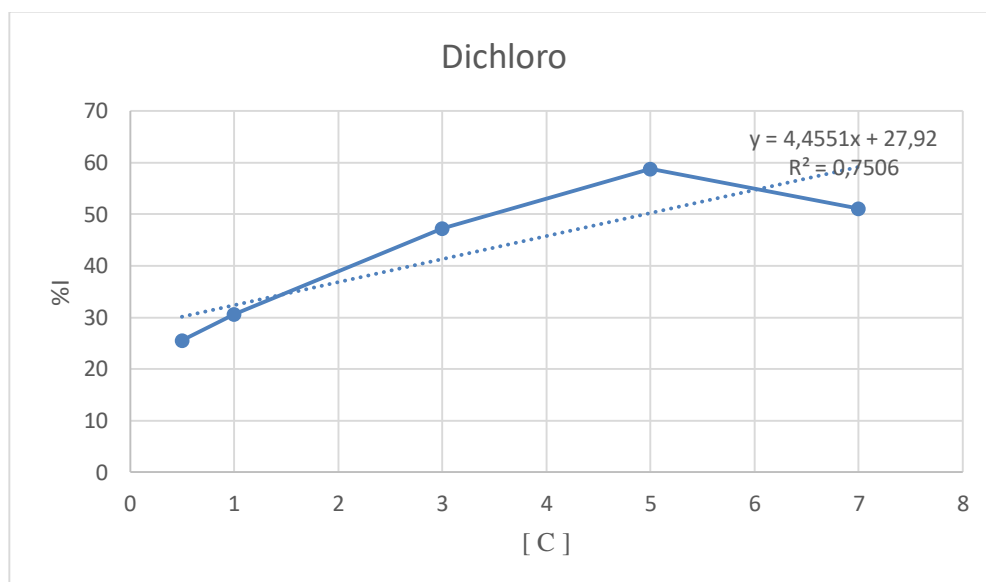


Figure 5.3: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait par dichlorométhane

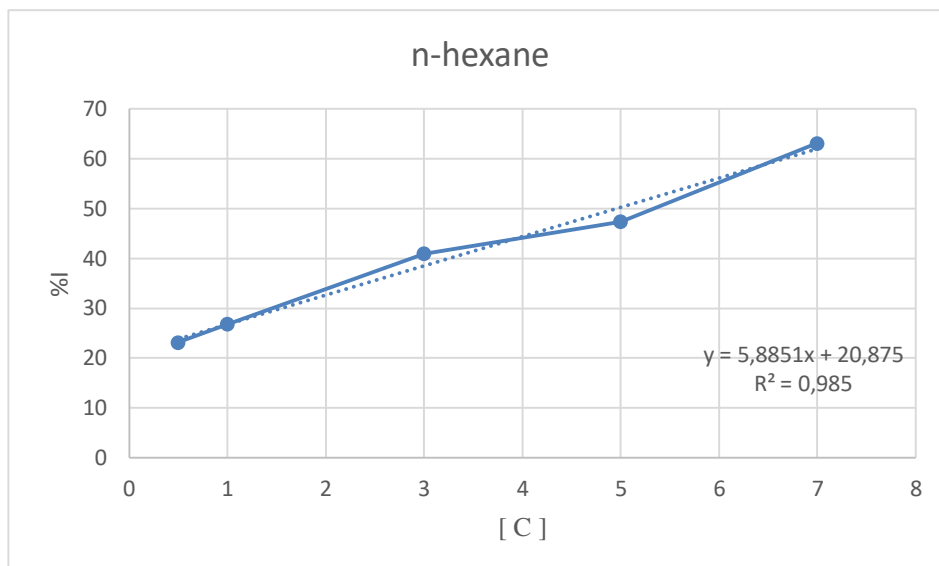


Figure 5.4: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait par n-Hexane

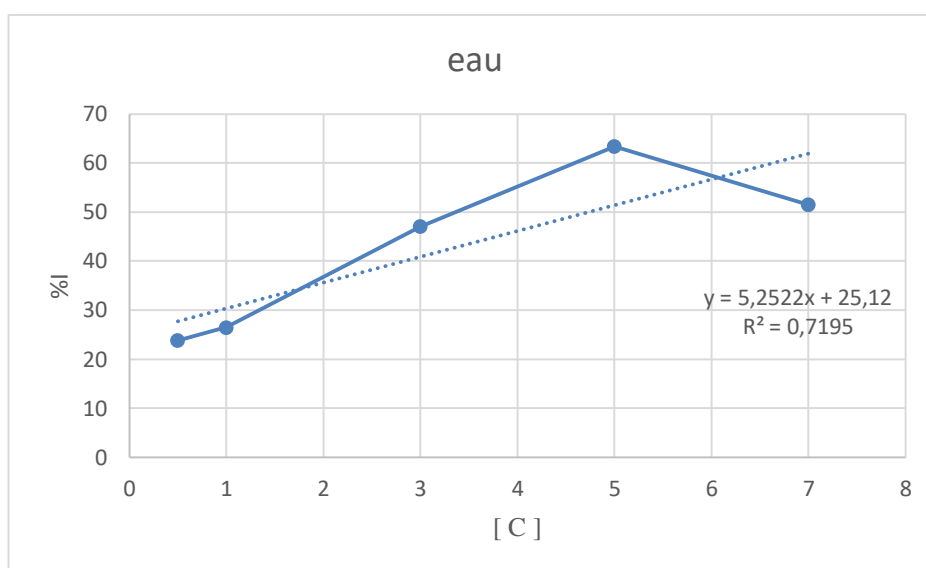


Figure 5.5: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait par eau

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'inhibition augmentent en fonction de la concentration en extraits. Le meilleur pourcentage d'inhibition est obtenu pour l'extrait de Centaurea par le solvant d'éthanol à 89.87%, à une concentration de 7 mg/ml. Les autres extraits ont des pourcentages d'inhibition intéressants et qui sont compris entre 51.07 % et 63.14 %, à cette même concentration.

➤ **Calcul des CI50 :**

Le pouvoir antioxydant des différents extraits a été déterminé à partir de la concentration inhibitrice **CI50** (Tableau13). C'est la concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH Plus sa valeur est petite, plus l'activité est grande.

Tableau 5.3: Les valeurs des CI₅₀ (µg/ml) calculées pour les extraits étudiés.

Extrait	CI50 µg/ml
Ethanol	1.0895×10^3
n-Héxane	4.9489×10^3
Dichlorométhane	4.956×10^3
Eau	4.737×10^3

D'après les valeurs d'CI₅₀, le classement de la capacité des extraits à piéger le radical DPPH, est le suivant : extrait Ethanolique < extrait aqueux(Eau) < extrait n-Hexanolique < extrait Dichloromethanolique . Donc, l'extrait Ethanolique de racine de Centaure représente la meilleure activité anti-oxydante avec une valeur de CI₅₀ de $1.0895 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$.

5.2 Formulation et caractérisation des émulsions :

Toutes les émulsions préparées ont montré une couleur beige opaque.

Pour la formulation 1 l'aspect microscopique de l'émulsion est présenté dans La figure27. Nous avons observé la structure de la double émulsion qui est constituée de gouttelettes sphériques avec des bords bien délimités dispersées dans la phase continue, ces gouttelettes contiennent à l'intérieur d'autres gouttelettes de taille plus petite. Dans le tableau 1, nous observons que les différentes valeurs de potentiel zêta des doubles émulsions sont supérieures à -30 mV; ces valeurs indiquent que les systèmes dispersés sont électriquement stables. Les charges induites par le potentiel ζ sont dues à la nature de stabilisant utilisé, la gomme xanthane Aldéhyde.

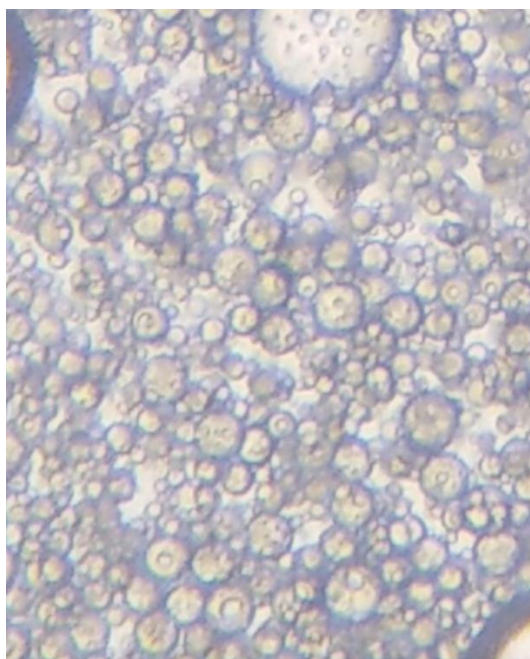


Figure 5.6: Microphotographies d'émulsion F1

Tableau 5.4 : caractérisation physico-chimique

Teste	Placébo	F1	F2	F3	F4	F5
PH	5.07	4.62	4.54	4.52	4.53	4.22
Conductivité ms/cm	-	0.239	0.068	0.063	0.081	0.063
Diamètre moyen nm	3017.0	0.6951	3.596	2.856	5.833	3.064
Indice de polydispersité	-	-	0.594	0.939	0.957	0.806
Potentiel Zeta mv	-	81.1mv	-0.5mv	-0.1mv	-0.2mv	1.7mv

Tableau 5.5 : les formulations des doubles émulsions

formulation	Composition PE				W2			
	O		W1		Eau	Tween	X-A	G
	Huile	Span80	Eau	Extrait				
F1	32.3	1g	15.7	1g	47.3	1g	0.7	1g
F2	19	1g	9	1g	67.3	1g	0.7	1g
F3	32.3	1g	15.7	1g	47.7	1g	0.3	1g
F4	19	1g	9	1g	67.7	1g	0.3	1g
F5	25.7	1g	12.3	1g	57.5	1g	0.5	1g

5.2.1 MATRICE DES RESULTATS :

La matrice des résultats du plan d'expériences est donnée dans le (tableau 5.6)

Tableau 5.6 : résultats du plan d'expériences

Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	X-A	Ratio PE:W2	MD	PI	ZP
1	N1	5	Incl	0,3	0,4	5,833	0,957	-0,2
2	N2	2	Incl	0,7	0,4	3,596	0,594	-0,5
3	N3	4	Incl	0,3	1	2,856	0,939	-0,1
4	N4	3	Incl	0,7	1	0,695	0,981	81,1
5	N5	1	Incl	0,5	0,7	3,064	0,806	1,7

5.2.2 EFFET DES FACTEURS ET LEURS INTERACTIONS SUR LES REPONSES :

- Le facteur F1 (X-A) et le facteur F2 (ratio :PE W2) influents négativement sur MD tandis l'interaction entre les deux facteurs est nul.
- Le facteur F1(X-A) influe négativement sur PI tandis le facteur F2 (ration :PE :W2) et l'interaction entre F1 et F2 influents positivement sur la PI.
- Le facteur F1 (X-A) et le facteur F2 (ratio :PE W2) et l'interaction entre eux influents positivement su ZP.

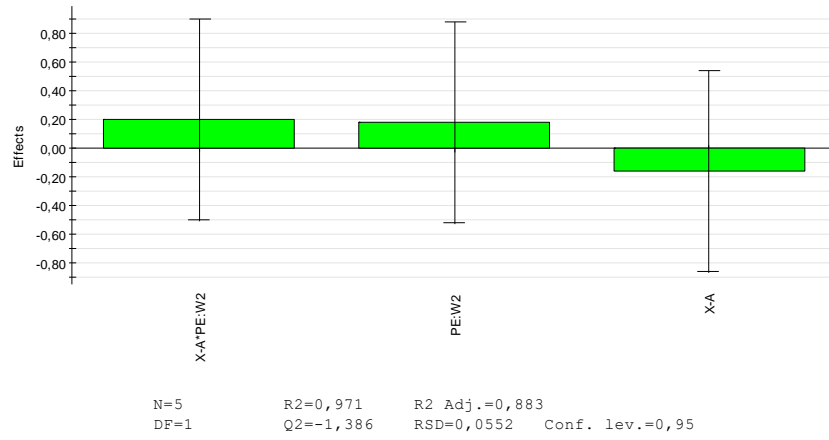
5.3 MODELISATION MATHEMATIQUE :

Les tableaux détaillant des coefficients des différents modèles mathématiques et leur donnée statistiques sont présenté dans l'annexe 1

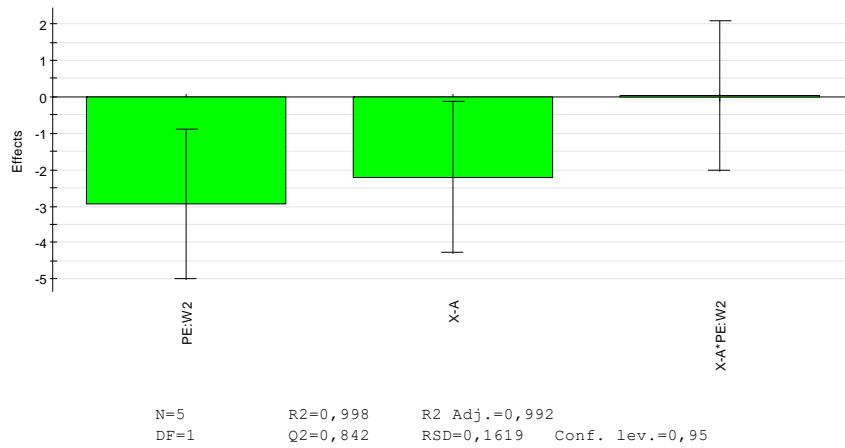
Tableau 5.7 : les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé de formulation.

REPONSE	MODELE MATHAMATIQUE
MD	$MD = (1.0995)*X1 + (-1.4695)*X2 + 0.019002 *X1*X2 + 3.2088$
PI	$PI = -0.08025*x1 + 0.09225*X2 + 0.10125*X1*X2 +0.8554$
ZP	$ZP = 20,225*X1 + 20,425*X2 + 20,375*X1*X2 + 16,4$

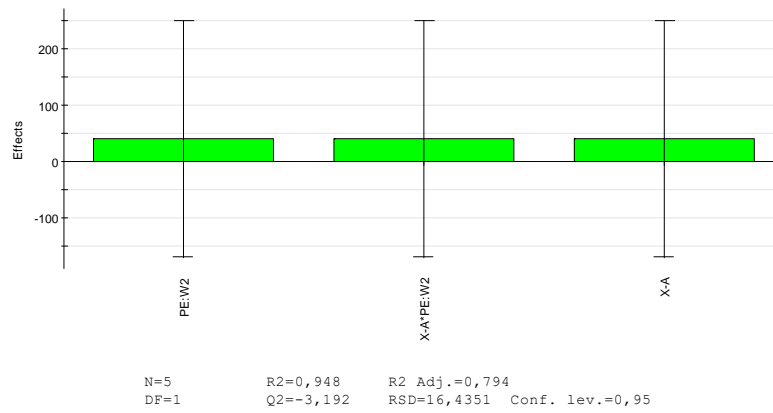
Investigation: Centaurea DE (MLR)
Effects for PI



Investigation: Centaurea DE (MLR)
Effects for MD



Investigation: Centaurea DE (MLR)
Effects for ZP



**Figure 5.7 : EFFET DES FACTEURS ET LEURS INTERACTIONS SUR
LES REPONSES**

5.2.4 prédiction des résultats :

Pour la perdition des résultats, deux types de tracés peuvent être effectués, le 1^{er} est les surfaces de repense le 2^{ème} est les contours (ou les plages) ses dernières ont été choisies pour la représentation de nos résultats car elles sont plus claires à observer.

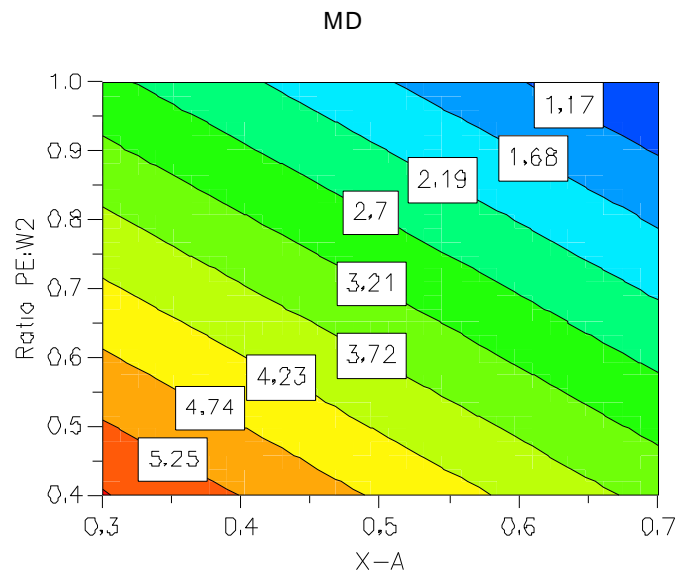


Figure 5.8 : iso réponse du diamètre moyen

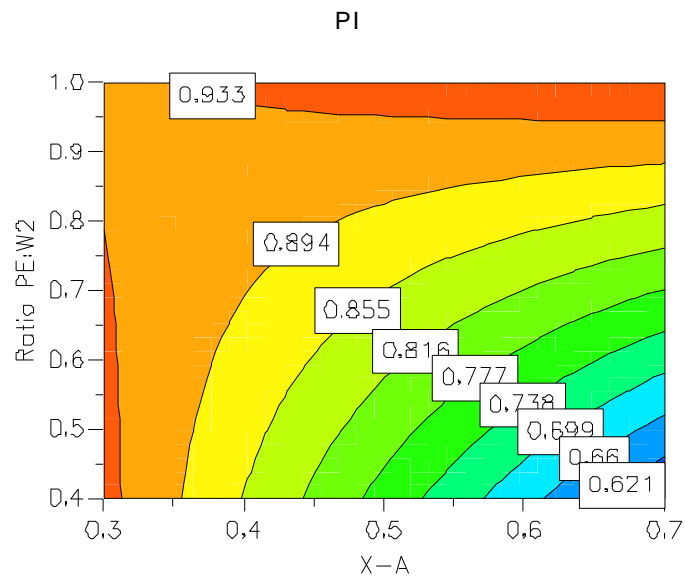


Figure 5.9 : iso réponse de l'indice de polydispersité

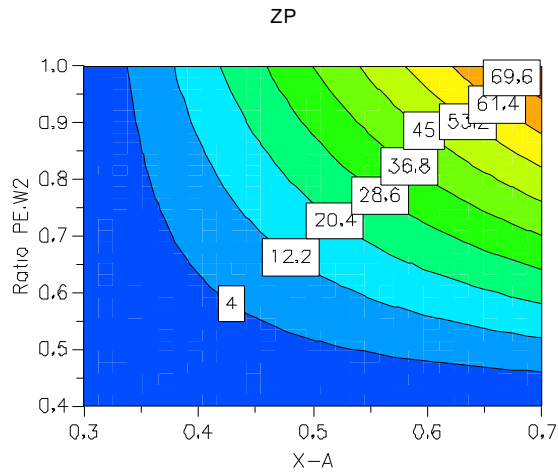


Figure 5.10 : iso réponse du potentiel zêta

- Pour le diamètre moyen : lorsque les deux facteurs diminuent le diamètre moyen augmente.
- Pour l'indice de polydispersité : lorsque le facteur 1 diminue et le facteur 2 augmente l'indice de polydispersité augmente.
- Pour le potentiel zêta : lorsque les deux facteurs augmentent le potentiel zêta augmente.

5.2.5 coefficient de corrélation (R^2) et coefficient de prédiction (Q^2) :

Les coefficients de corrélations (R^2) et coefficient de prédiction Q^2 sont donnés la figure 30.

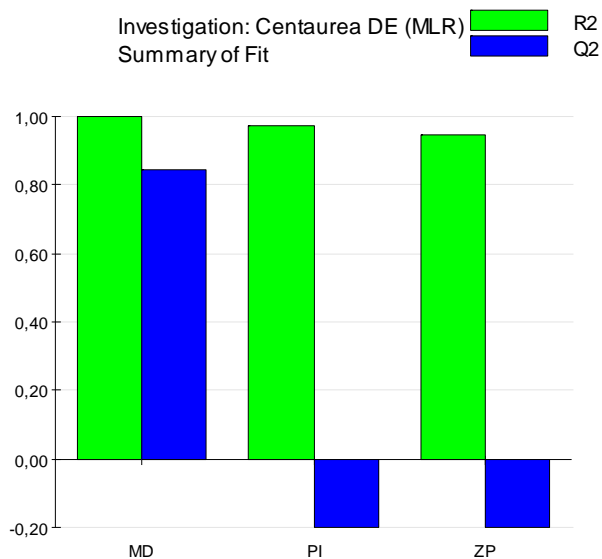


Figure 5.11 : Histogrammes représentant les coefficients de corrélation et de prédiction

Les valeurs détaillées de coefficient de corrélation et de prédiction sont dans l'annexe 2.

Les coefficients de corrélation (R^2) sont de l'ordre 0,998059 ,0,970628 , 0,948409 pour MD , PI et ZP respectivement. et pour les coefficients de prédiction (P^2) sont de l'ordre 0,84227 , -1,38647 , -3,19183 pour MD , PI , ZP respectivement.

De manière générale la corrélation entre les facteurs et les réponses sont excellente. La prédiction est bonne pour le DM mais reste difficile pour IP et le potentielle zéta.

5.3 Discussion des mécanismes de stabilisation des doubles émulsions préparés :

La formulation obtenue est une double émulsion de type W1/O/W2. La phase W1 est disperser dans la phase huileuse, l'interface entre les deux phases est stabilisé grâce aux T.A lipophile span80, l'émulsion primaire est dispersée dans la phase W2.

Le mécanisme de stabilisation des doubles émulsions est assuré par 2 phénomènes :

- Le premier mécanisme est basé sur la diminution de la tension interfaciale entre l'émulsion primaire W1/O et la phase continue W2, cette diminution est assurée par le span80.
- Le deuxième mécanisme est basé sur l'augmentation de la viscosité de la phase continue par l'agent viscosifiant contenu dans la phase W2. Issu de la réaction entre la fonction Aldehyde du X-A et la fonction Amine de la gélatine L'augmentation de la viscosité permet de diminuer le mouvement des gouttelettes dans la phase continue et diminuer leurs collisions, ce qui permet d'éviter le phénomène de coalescence des gouttelettes qui est une déstabilisation irréversible des systèmes dispersés et qui aboutit à la séparation de phases.

5.4 Evaluation de l'activité Anti-ulcérologique :

Les résultats de l'activité anti-ulcéreugénique pour chaque lot sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 5.8: Détermination des pourcentages de l'ulcère et des pourcentages d'inhibitions

Lots	PU		PIU
	moy	±	
T-	53,3039479	7,81802323	0
Extrait (50mg/kg)	17,2069815	6,56961423	67,7191236
Extrait (150mg/kg)	5,86426824	1,97352813	88,9984355
Placébo	45,6176599	9,92237845	14,4197351
F1 (contenant 50mg/kg)	5,73204176	1,56871932	89,2464968
T+ (oméprazol 20mg/kg)	5,68558743	1,76809262	89,3336467

PU : Pourcentage d'ulcère.

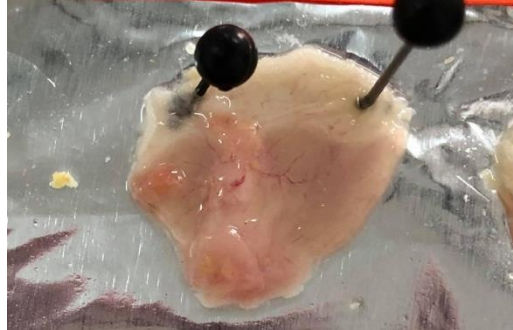
PIU : Pourcentage d'inhibition de l'ulcère.

- **Lot 1** : composé de souris ayant reçu un gavage d'eau physiologique qui ne représente aucune lésion, la muqueuse gastrique a un aspect lisse et une couleur rosâtre (structure normale).
- **Lot 2** : Témoin négatif composé de souris ayant reçu un gavage d'éthanol sans traitement. Représente la référence du maximum de l'ulcère formé.



- **Lot 3**: Témoin positif composé de souris ayant reçu un gavage d'éthanol est traité pas la suite avec d'oméprazol (50 mg/kg).représente une diminution de la surface d'ulcère.

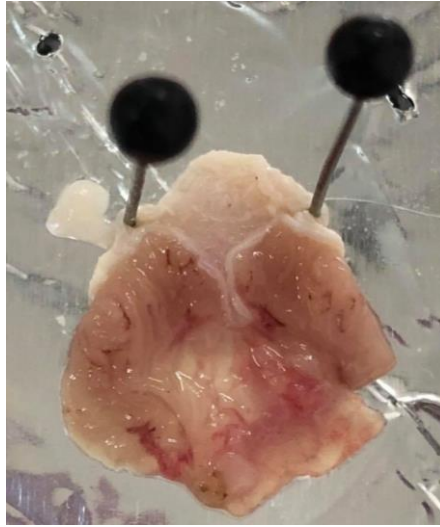
- **Lot 4** : souris ayant reçu un gavage d'éthanolest traitée par l'extrait éthanolique dissout dans l'eau distillée à une dose de (50 mg/kg), représente des estomacs en meilleur état que celle du lot2 (témoin négatif).



- **Lot 5** : souris ayant reçu un gavage d'éthanolest traitée par l'extrait éthanolique dissout dans l'eau distillée à une dose de (150 mg/kg), représente des estomacs en meilleur état que celle du lot 2 (témoin négatif) en diminuant les lésions gastriques.



- **Lot 6** : souris ayant reçu un gavage d'éthanoest traitée par le placebo à une dose de (0 mg/kg), représente des lésions de la muqueuse gastrique et formation de l'ulcère.



- **Lot 7** : souris ayant reçu un gavage d'éthanoest traitée par la double émulsion à une dose de (50 mg/kg), représente une diminution de la surface d'ulcère et en meilleur état que celle du lot 2 (témoin négatif), de couleur rose claire.



De manière générale l'activité anti-ulcéreugénique des molécules bioactives de centaurea sp est très importante, la dose 150 mg/kg présente un excellent effet thérapeutique qui est pratiquement égal à celui du médicament de référence (oméprazole). De plus, cette activité a pu être améliorée par l'incorporation de l'extrait dans une formulation innovante de type W1/O/W2 double émulsion, cette activité a pratiquement été multipliée par trois.

Conclusion générale :

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale ; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Pour cela, nous avons étudiée la **Centaurea sp**, des paramètres d'extraction des molécules bioactives ayant le plus grand pouvoir antioxydant.

Une fois notre objectif atteint une identification des composés de la famille des acides phénoliques, qui présentent des intérêts biologiques. L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer et d'optimiser l'activité anti-oxydante de la **Centaurea sp**.

Dans notre travail nous avons choisi une forme galénique appropriée qui est une émulsion buvable. Dans le but d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et opter pour une formulation stable. A cette effet une double émulsion de type W1/O/W2 contenant les molécules bioactives de **Centaurea** et stabilisée par le xanthane-Aldehyde, est une réussite.

A la dernière étape l'activité anti-l'éroène in-vivo des molécules extraites à partir de la **Centaurea sp**. La double émulsion à base de la **Centaurea sp**. Les résultats de cette étude ont révélé que la double émulsion présente une action anti-ulcère qui résulte la réduction des ulcères

- [1].Davis, S.S. Liquid membranes and multiple emulsions. Chem. Ind. 3,683-7 (1981).
- [2].Florence, A.T. and Whitehill, D. The formulation and stability of multiple emulsions.Int. J. Pharm. 11,277-308 (1982).
- [3].Matsumoto, S. Formation and stability of w/o/w in macro- and micro-emulsions: Theory and Applications, D.O. Shah (ed.) pp. 415-36 ACS Symposium Series no. 272, Am. Chem. SOC., Washington D.C.
- [4]. Garti, N., Romanop, A. and Aserin, A. The effect of additives on release from w/o/w emulsions. Colloids and Surfaces 24, 83-94 (1987).
- [5].De Luca, M., Vaution, C. Rabaron, A. and Seiller, M. Classification et obtention des emulsions multiples. S. T. P. Pharma, 4,679-87 (1988)
- [6]. Sheppard, E. and Tchekedjian, N. Comments on multiple-phase emulsions systems. J. Coll.
- [7]. Sherman, P. In: Emulsion Science P. Sherman (ed.) Academic Press: London 206-7 (1986).
- [8]. Lin, T.J., Kurimara, H. and Ohta, H. Effects of phase inversion and surfactant location.
- [9]. Becher, P. In: Emulsions, Theory and Practice, 2nd edition, Reinhold: New York, p. 149 (1965).
- [10]. Kavaliunas, D.R. and Frank, S.G. Liquid crystal stabilization of multiple emulsions. J. Coll. Interface Sci. 66, 586-8 (1978).
- [11]. Di Stefano, F.V., Shaffer, O.M., El Aasser, M.S. and Vanderhoff, X.X. Multiple oil-in-water- in-oil emulsions of extremely fine droplet size. J. Coll. Interface Sci. 92,269 (1983).

- [12]. Mackles L. Wax compositions and methods for making the same. U.S. Patent 3395028, July 1968.
- [13]. Matsumoto, S., Kita, Y. and Yonezawa, D. An attempt at preparing water-in-oil-in-water multiple-phase emulsions. *J. CON. Interface Sci.* 57,353-61 (1976).
- [14]. Sherman, P. and Parkinson, C. Measurement of phase inversion temperature above 100°C. *Prog. Colloid and Polymer Sci.* 63, 10-11 (1978).
- [15]. Pilman, E., Larsson, K. and Tonberg, E. Inverse micellar phase in ternary systems of polar lipids fat water and protein emulsification of such phases to w/o/w microemulsions. *J. Disp. Sci. Technol.* 1,267-81 (1980). *Interface Sci.* 62,564-5 (1977). Formation of olw emulsions. *J. SOC. Cosmet. Chem.* 26, 121-39 (1975).
- [16]. Liebowitz, M. and Brandli, E.H. Polish U.S. Patent 4013475, March 22, 1977.
- [17]. Altrock, W.W.L. and Ritums, J.A. A process for producing a low fat oil in water-in-oil emulsion. European Patent 0040874, May 1981.
- [18]. Frenkel, M., Shwartz, R. and Garti, N. Multiple emulsion stability I: inversion apparent and weighted HLB. *J. CON. Interface Sci.* 94, 174-8 (1983).
- [19]. Florence, A.T., Law, T.K. and Whateley, T.L. Nonaqueous foam structures from osmotically swollen w/o/w emulsion droplets *J. CON. Interface Sci.* 97,584-8 (1985).
- [20]. Clark, L.R. and West, R. W. Multiphase emulsion coating composition. European patent 87/105924 (1987).
- [21]. Pandit, J.K., Mishra, B. and Chand, B. Drug release from multiple w/o/w emulsions. *Indian J. Pharm. Sci.* 49, 103-5 (1987).
- [22]. Florence, A.T. and Whitehill, D. Multiple w/o/w emulsions stabilized with poloxamer and acrylamide gels. *J. Pharm. fharmacol.* 32,645 (1980).

- [23]. Magdassi, S., Frenkel, M. and Garti, N. On the factors affecting the yield of preparation and stability of multiple emulsions. *J. Disp. Sci. and Technol.* 5,49-59 (1984).
- [24]. Magdassi, S., Frenkel, M. and Garti, N. Correlation between nature of emulsifier and multiple emulsion stability. *Drug Develop. and Ind. Pharm.* 11,791-8 (1985).
- [25]. Magdassi, S. and Garti, N. Release of electrolytes in multiple emulsions: coalescence and breakdown or diffusion through oil phase. *Colloids and Surfaces* 12,367-73 (1984).
- [26]. Matsumoto, S. and Kohda, M. The viscosity of w/o/w emulsion-An attempt to estimate the water permeation coefficient of the oil layer from the viscosity changes in diluted systems on aging under osmotic pressure gradients. *J. Coll. Interface Sci.* 73, 13-20 (1980).
- [27]. Matsumoto, S. Development of w/o/w-type dispersion during phase inversion of concentrated w/o emulsions. *J. Coll. Interface Sci.* 94, 362-8 (1983).
- [28]. Matsumoto, S., Inoue, T., Kohda, M. and Ohta, T. An attempt to estimate stability of the oil layer in w/o/w emulsions by means of viscosimetry. *J. Coll. Interface Sci.* 77,564-5 (1980).
- [29]. Davis, S.S. and Burbage, A.S. The particle size analysis of w/o/w multiple emulsions in Particle size analysis. Groves, M.J. (ed.). Heyden, London, 395410 (1978).
- [30]. Davis, S.S. and Burbage, A.S. Electron micrography of water-in-oil-in-water emulsions. *J. CON. Interface Sci.* 62,361-3 (1977).
- [31]. Florence, A.T. and Whitehill, D. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsion. *J. CON. Interface Sci.* 79,243-56 (1981).
- [32]. Gresham, P.A., Barnett, M., Smith, S.V. and Schneider, R. Use of a sustained-release multiple emulsion to extend the period of radioprotection conferred by cysteamine. *Nature*, 234,149-50 (1971).

- [33]. Shichiri, M., Kawamori, R., Yoshida, M., Etani, M., Hoshi, M., Izumi, K., Shigeta, Y. and Abe, H. Short-term treatment of alloxan-diabetic rats with intrajejunal administration of water-in-oil-in-water insulin emulsion. *Diabetis* 24,971-6 (1975).
- [34]. Yoshioka, T., Ikeuchi, K., Hashida, M., Muranishi, S. and Sezaki, H. Prolonged release of bleomycine from parenteral gelatin sphere in water-in-oil-in-water multiple emulsion. *Chem. Pharm.Bull.*30,1408-15(1982).
- [35]. Benoy, C.H., Schneider, R., Elson, L.A. and Jones, M. Enhancement of the cancer chemio- therapy effect of the cell cycle phase specific agents methotrexate and cytosine arabinoside when given as a water-oil-water emulsion. *Eur. J. Cancer* 10,27-33 (1974).
- [36]. Yoshihara, S.K.K. and Akashi, S. Oil and fat product for cooking. Japan Patent, 198806, May 1985.
- [37]. Kirton, D.C. and MacNeill, A.B. Emulsions 21 phase continue de matikres grasses et aliments 21 tartiner ayant une tenuer rkduite en matikres grasses. French Patent, 2563975, May 1985.
- [38]. Garti, N., Frenkel, M. and Schwartz, R. Multiple emulsions. Part 11: proposed techniques to overcome unpleasant taste of drugs. *J. Disp. Sci. and Technol.* 4,237 (1983).
- [39]. Yoshihara, S.K.K. and Akashi, S. Oil and fat products for cooking. Japan Patent 198806, May 1985.
- [40]. Herbert, W.J. Multiple emulsions: a new form, mineral oil antigen adjuvant. *Lancet* 2, 771 (1965).
- [41]. Engel, R.H., Riggi, S.J. and Fahrenbach, N.J. Insulin: intestinal absorption as water-in-oil- in-water emulsions. *Nature* 219,856 (1968).
- [42]. Benoy, C.J., Elson, L.A. and Schneider R. Emulsion multiple: a suitable vehicle to provide sustained-release of cancer chemiotherapeutic agents. *Brit. J. Pharmacol.* 45, 135 (1972).
- [43]. Natural Research Development Co. Improvements in, or related to, sustained release preparations. Brit. Patent 1235667 (1971).

- [44]. Mishra, B. and Pandit, J.K. Prolonged release of pentazocine from multiple olw/o emulsions. *Drug Develop. and Ind. Pharm.* 15, 1217-30 (1989).
- [45]. Pandit, J.K., Mishra, B., Krishnaswamy, Y. and Mishra, D.N. Prolonged action and brain levels of indomethacine from olw/o emulsions. *Znd. J. Pharm. Sci.* 50, 274-5 (1988).
- [46]. Attia, M.A. and Habib, F.S. Pilocarpine delivery from multiple emulsions. *S. T. P. Pharma*, 2, 63640 (1986).
- [47]. Matsumoto, S., Kohda, M. and Murata, S. Preparation of lipids vesicles on the basis of a technique for providing wlo/w emulsions. *J. Coll. Interface Sci.* 62, 149-57 (1977).
- [48]. Frankenfeld, J.W., Fuller, G.C. and Rhodes, C.T. Potential use of liquid membranes for emergency treatment of drug overdose. *Drug Develop. Comm.* 2(4-5), 405-19 (1976).
- [49]. Chiang, C., Fuller, G.C., Frenkelfeld, J.W. and Rhodes, C.T. Potential of liquid membranes for drug overdose treatment: in vivo studies. *J. Pharm. Sci.* 67, 63-6 (1978).
- [50]. Hiraoka, J., Kinugawa, M., Sakamoto, Y. and Nakanishi, N. Preparation of wlo/w emulsions for cosmetics. Japan Patent (KANEBO Ltd) 6333311, 25 July 1986.
- [51]. Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5(5), 264-270.
- [52]. Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR Presses polytechniques.
- [53]. Bamforth CW (1999) Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 57(3): 81-90.
- [54]. Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissède, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.

- [55]. Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- [56]. Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851-874.
- [57]. Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- [58]. Silanikove, N., Perevolotsky, A., & Provenza, F. D. (2001). Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 69-81.
- [59]. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.
- [60]. Mpondo, E. M., Yinyang, J., & Dibong, S. D. (2015). Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 85(1), 7804-7823.
- [61]. Richter, G. 1993. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Éd. Presses polytechniques et universitaire Romandes.
- [62]. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000) The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 673-751.
- [63]. Gee, J. M., & Johnson, I. T. (2001). Polyphenolic compound: interactions with the gut and implications for human health *Current Medicinal Chemistry*, 8(11):1245-55.
- [64]. Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), 44-57.

- [65]. Bisoli, E., Garcez, W. S., Hamerski, L., Tieppo, C., & Garcez, F. R. (2008). Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, 13(11), 2717-2728.
- [66]. Hocquemiller, R., Cave, A., Jacquemin, H., Touche, A., & Forgacs, P. (1982). Alcaloides des annonacées. Xxxvi (alcaloides de l'*Annona crassiflora* Mart). *Plantes medicinales et phytotherapie*. Tome XVI, 1, p. 4-6.
- [67]. Chiang, C., Fuller, G.C., Frenkelfeld, J.W. and Rhodes, C.T. Potential of liquid membranes for drug overdose treatment: in vivo studies. *J. Pharm. Sci.* 67, 63-6 (1978).
- [68]. Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., Skaltsa, H., 2005. Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 68, 1404–1407.
- [69]. Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Nahar, L., Kong Thoo-Lin, P., Celik, S., Sarker, S. D., 2007a. Lignans and Flavonoids from the seeds of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn, Ex. Bornm and *Centaurea huber-morathii* Wagenitz. *Polish. J. Chem.* 81, 39–44.
- [70]. Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I.A., 2007. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry* 68, 609–615.
- [71]. Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C., Skaltsa, H., 2008b. A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties, *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3725–3731.
- [72]. Rodriguez, M.L., Garcia, V.P., Zater, H., Benayache, S., Benayache, F., 2009. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta. Cryst.* 65, 1867–1868.
- [73]. Ozçelik, B., Gurbuz, I., Karaoglu, T., Yes-ilada, E., 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis*. *Microbiol. Res.* 164, 545–552
- [74]. Mezache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S. Benayache, F., 2010. Secondary metabolites from *Centaurea lipii*. *Chem. Nat. Comp.* 46, 801–802.

- [75]. Krasnov, E.A., Kaminskii, I.P., Shul'ts, E.E., Kadyrova, T.V., 2011. Isolation of repin from the arial part of *Centaurea scabiosa*. *Chem. Nat. Comp.* 47, 311–312.
- [76]. Nowak, G., Dawid-Pač, R., Urbańska, M., Nawrot, J., 2011. TLC of selected sesquiterpenoids of the Asteraceae family. *Acta. Soc. Bot. Pol.* 80, 193–196.
- [77]. Ayad, R., Ababsa, Z. E. A., Belfadel, F. Z., Akkal, S., Leon, F., Brouard, I., Medroubi, K., 2012. Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *Int. J. Med. Plants.* 2, 151- 154.
- [78]. Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estevez, F., Leon, F., Bermejo, J., Benayache, F., 2009. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem. Lett.* 2, 114–118.
- [79]. Gülcemal, D., Çalıskan, O.A., Karaalp, C., Örs, A.U., Ballar, P., Bedir, E., 2010. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *Urvillei*. *Carbohydr. Res.* 345, 2529–2533.
- [80]. Erel, S.B., Bedir E., Ikhlas, A., Khan, I.A., Karaalp, C., 2010 Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* P.H. Davis. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 1056–1058.
- [81]. Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Bruneau, C., 2011. Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chem. Nat. Comp.* 46, 966–967.
- [82]. Ciric A., Karioti A., Glamoclija J., Socovic, M., Skaltsa, H., 2011. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. *J. Serb. Chem. Soc.* 76, 27–34.
- [83]. Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V.P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., 2011. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem. Nat. Comp.* 47, 105–106.
- [84]. Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., 2012. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Nat. Prod. Res.* 26, 203–208.

- [85]. Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. Rec. Nat. Prod. 6, 292–295.
- [86]. Koukoulitsa E., 2006. Phytochemical study of *Centaurea zuccariniana* DC. and *Origanum vulgare*. Ph.D. Thesis, Athens University, Faculty of pharmacy, Department of pharmacognosy
- [87]. Erdemgil, Z., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Celik, S., Michalska, K., Kisiel, W., Bruno, M., 2006. Polish. J. Chem. 80, 647–650.
- [88]. Celik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M., 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptoisimopappa*. J. Biochem. Syst. Ecol. 34, 349–352.
- [89]. Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy. Y., Jaspars, M., Nahar, L., Kong Thoo-Lin, P., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D., 2006b. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan from the seeds of *Centaurea Americana*. Phytochemistry 67, 2370–2375.
- [90]. Shoeb, M., Macmanus, S. M., Kong-Thoo-Lin, P., Celik, S., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D., 2007b. Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). DARU 15, 118–122.
- [91]. Erel, S.B., Bedir E., Ikhlas, A., Khan, I.A., Karaalp, C., 2010 Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* P.H. Davis. Biochem. Syst. Ecol. 38, 1056–1058.
- [92]. Khan, A.N., Fatima I., Khaliq, U.A., Malik, A., Miana, G.A, Qureshi, Z.U., 2011. Potent Anti-Platelet Constituents from *Centaurea iberica*. Molecules 16, 2053–2064.
- [93]. Tekeli, Y., Zengin, G., Aktumsek, A., Sezgin, M., Torlak, E., 2011. Antibacterial activities of extracts from twelve *centaurea* species from Turkey. Arch. Biol. Sci. 63, 685–690.
- [94]. Uysal, T., Demirelma, H., Ertugrul, K., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., 2007. *Centaurea glabrauriculata* (Asteraceae), a new species from Turkey. Ann. Bot. Fenn. 44, 219–222.

- [95]. Zengin, G., Aktumsek, A., Guler, G.O., Cakmak, Y.S., Yildiztugay, E., 2011. Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty Acid Composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Rec. Nat. Prod.* 5, 123–132.
- [96]. Yesilada, E., 2002. Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Sener, B. (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK. pp.119–135.
- [97]. Wagenitz, G., Hellwig, F. H., Parolly, G., Martins L., 2006. Two new species of *Centaurea* (Compositae: Cardueae) from Turkey. *Willdenowia* 36, 423–435.
- [98]. Van den Munckhof, P., Gilbert, F., Chamberland, M., Levesque, D., Drouin, J., 2006. Striatal neu-roadaption and rescue of locomotor deficit by L-dopa in aphakia mice, a model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 96, 160–170.
- [99]. Simberloff, D., Rejmánek, M., 2011. *Encyclopedia of Biological Invasions*. University of California Press, Berkeley.
- [100]. Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *Am. J. Bot.* 82, 1056–1068
- [101]. V.L.Singleton , R.Orthofer , R.M.Lamuela-Raventos, "*Analysis of total phenols and otheroxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*" *Methods Enzymol.*,**1999**, Vol. (**299**), page: 152.
- [102]. V.L.Singleton, J.R.Rossi, "*Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid*" *Am. J. Enol. Vitic*,**1965**, Vol. (16), page : 144.
- [103]. Wong SP, Leong LP, William-Koh JH (2006) Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food Chem* 99: 775–83
- [104]. .Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemist.*. 89 (2005) 411-420

[105]. Sanchez-Moreno, C., Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Inter. J. Food Sci. and Technol.* 8 (2002) 121-137.

Annexe 1

MD	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int()
Constant	3,2088	0,0724002	0,0143616	0,919932

X-A	-1,0995	0,0809458	0,0467839	1,02851
PE:W2	-1,4695	0,0809459	0,0350321	1,02851
X-A*PE:W2	0,0190002	0,0809459	0,853225	1,02851

N = 5 Q2 = 0,842 Cond. no. = 1,1180
DF = 1 R2 = 0,998 Y-miss = 0
R2 Adj. = 0,992 RSD = 0,1619
Conf. lev. = 0,95

PI	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int()
Constant	0,8554	0,0247	0,0183775	0,313843
X-A	-0,08025	0,0276154	0,210992	0,350888
PE:W2	0,09225	0,0276154	0,18517	0,350888
X-A*PE:W2	0,10125	0,0276154	0,169512	0,350888

N = 5 Q2 = -1,386 Cond. no. = 1,1180
DF = 1 R2 = 0,971 Y-miss = 0
R2 Adj. = 0,883 RSD = 0,0552
Conf. lev. = 0,95

ZP	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int()
Constant	16,4	7,35	0,268228	93,3906
X-A	20,225	8,21755	0,245691	104,414
PE:W2	20,425	8,21755	0,243514	104,414
X-A*PE:W2	20,375	8,21755	0,244055	104,414

N = 5 Q2 = -3,192 Cond. no. = 1,1180
DF = 1 R2 = 0,948 Y-miss = 0
R2 Adj. = 0,794 RSD = 16,4351
Conf. lev. = 0,95

Annexe 2

	R2	R2 Adj.	Q2	SDY	RSD	N
MD	0,998059	0,992235	0,84227	1,83718	0,161892	5
PI	0,970628	0,882514	-1,38647	0,161134	0,0552309	5
ZP	0,948409	0,793634	-3,19183	36,1787	16,4351	5

N = 5 Cond. no. = 1,1180
DF = 1 Y-miss = 0