



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



UNIVERSITE de TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

## Département de Biologie

*Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité  
biologique*

# MEMOIRE

Présenté par

**Mlle BELARBI Asma**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En BIOCHIMIE APPLIQUEE

## Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et à l'étude de  
l'activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis* et  
*Centaurea pungens***

Soutenu le : 01/10/2020, devant le jury composé de :

<b>Président</b>	<b>Dr. MALEK F.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Encadreur</b>	<b>Dr BENARIBA N.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Examineur</b>	<b>Dr. BENMANSOUR M.</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Examineur</b>	<b>Dr. BELKACEM N.</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Tlemcen</b>

Année universitaire 2019/2020

# DÉDICACE

*Ce projet de fin d'étude représente l'abolissement du soutien et l'encouragement, est dédié en premier à :*

*Ma chère mère GHERRAS H, qui quoi je fasse ou qui je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les obstacles. Mon cher père Mohammed, pour les efforts qu'il a suscité en moi de par sa rigueur, pour tout le soutien.*

*A mon chère frère Oussama, à ma chère sœur Bouchra, mes chères Kawtar et Soumia pour leurs encouragements, leurs aides et ses soutiens moral tout au long de mes études et dans les moments difficiles.*

*A mes grands-parents GHERRAS.M et Yamena, pour qui je les souhaite une vie pleine de santé, également à mes grands-parents BELARBI.M et Fatima disparu que dieu le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*J'ai le plaisir à dédie ce modeste travail à mes tantes, mes oncles, mes cousins(es) et à toute ma famille.*

*A tous mes amies et a tous les gens que je les aime.*

*A tous mes professeurs.*

*A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

# REMERCIEMENT

Après avoir rendu grâce à Dieu le tout Puissant et Miséricordieux, qui m'a donné la santé et la volonté d'atteindre et d'accomplir ce modeste travail.

En tout premier lieu, j'exprime ma profonde gratitude à mon promoteur **Dr. BENARIBA N.** maître de conférences à la faculté de SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen, pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée, pour le temps qu'elle m'a consacré, pour les précieuses informations et conseils, ses encouragements qu'elle m'a prodigués avec intérêt et compréhension. Je veux vraiment vous remercier car j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme directrice de mon mémoire.

J'offre mes sincères remerciements avec tout mon respect au **Dr. MALEK F.** maître de conférences à la faculté de SNV/STU, université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen, d'avoir accepté de présider ce jury, j'ai l'honneur qu'elle sera présente dans cette journée spéciale.

Je remercie également **Dr. BENMANSOUR M.** Maître de conférences à la faculté de SNV/STU, université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen, pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail, ainsi pour son soutien au cours de notre formation en master.

Mes vifs remerciements au **Dr. BELKACEM N.** Maître de conférences à la faculté de SNV/STU, Université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen-), avoir bien voulu examiner et juger ce travail, ainsi pour son soutien au cours de notre formation en master.

Je tiens à remercier, **M<sup>elle</sup> ZAZOUA L,** **Mr FEROUANI M.** et **Mr HABI S,** ingénieurs de laboratoire pédagogie de biochimie au département de biologie, pour leur disponibilité et leur aide au cours de la réalisation de ce travail.

Mes sincère remerciement **M<sup>elle</sup> FEKHIKHER Z.** et **M<sup>elle</sup> BENRAMDANE H.,** doctorantes en biochimie pour leur aide et leurs précieux conseils. Je tiens à remercier ma collègue **Mlle KADI Akila,** étudiante en Master Biochimie Appliquée pour sa disponibilité et de nous avoir apporté la plante *C. penguns* de la région d'Adrar.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à toute la promotion de biochimie appliquée et à tous mes collègues pour les bons moments durant les années de notre formation, en particulier ma chère amie **HACHIME Amal, BENHAMOU Djamel Eddine** pour leurs soutiens et encouragements.

Mes remerciements avec tout respect à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation et qui ont tenu à nous enseigner.

# RÉSUMÉ

L'objectif de la présente étude porte sur une analyse phytochimique des extraits aqueux et organiques (eau-acétone, eau-méthanol, n-butanol et acétate d'éthyle) des cônes *Pinus halepensis* de et de la partie aérienne de *Centaurea pungenis*, ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante.

Les résultats du dosage des polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits testés, révèlent des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes. Les extraits de cônes de *Pinus halepensis*, présentent des teneurs élevées par rapport aux extraits de *C. pungenis*, notamment l'extrait n-butanol, 407,16 µg EAG/mgE de polyphénols et 206,79 µg EC/mgE de flavonoïdes. L'extrait acétate d'éthyle de *C. pungenis* renferme un faible taux en polyphénols (91,94 µg EAG/mgE) mais une forte teneur en flavonoïdes (39,76 µg EC/mgE) par rapport aux autres extraits de la plante.

Les résultats de l'activité antioxydante, ont montré que l'extrait eau-méthanol de cônes de *Pinus halepensis* présente une activité antiradicalaire sur le DPPH prometteuse, caractérisée par une valeur de IC<sub>50</sub> de 13,13µg/ml. Le pouvoir réducteur du fer (test de FRAP) de cet extrait, est également important avec une valeur de EC<sub>50</sub> de 783,39µg/ml.

**Mots-clés :** *Pinus halepensis*, *Centaurea pungenis*, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, DPPH, FRAP.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Production mitochondrial de l'anion superoxyde par les complexes enzymatiques.....	4
<b>Figure 2 :</b> La production en cascade des radicaux libres à partir de l'anion superoxyde. ....	5
<b>Figure 3:</b> Attaque radicalaire des acides aminés. ....	6
<b>Figure 4:</b> Dommages oxydatifs de la molécule de l'ADN.....	7
<b>Figure 5:</b> Produits terminaux de peroxydation lipidique par des radicaux libres .....	8
<b>Figure 6:</b> Structures de base de certains composés phénoliques.....	10
<b>Figure 7:</b> Structure de base des alcaloïdes. ....	12
<b>Figure 8:</b> Isoprène, structure de base des terpènes.....	12
<b>Figure 9:</b> <i>Centaurea pungens</i> .....	14
<b>Figure 10:</b> Lactones sesquiterpènes isolés de <i>C.Pungens</i> .....	14
<b>Figure 11:</b> Structure chimique de certains phytoconstituants isolés de la partie aérienne de <i>Centaurea pungens</i> .....	15
<b>Figure 12:</b> Structure chimique des flavonoïdes isolés de <i>C.Pungens</i> .....	15
<b>Figure 13:</b> <i>Pinus halepensis</i> (Mill). ....	16
<b>Figure 14 :</b> Composés majoritaires des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> . ....	18
<b>Figure 15:</b> Matériel végétal utilisé. <b>(a)</b> : cônes récoltés de <i>Pinus halepensis</i> ; <b>(b)</b> : cônes découpées ; <b>(c)</b> : <i>Centaurea Pungens</i> ; <b>(d)</b> : partie aérienne broyée de <i>C. Pungens</i> .....	22
<b>Figure 16:</b> Organigramme explicatif de la préparation des extraits de <i>P.halepensis</i> et <i>C.pungens</i> ..	25
<b>Figure 17:</b> réaction explicatif de dosage des polyphénols par folin ciocalteu .....	26
<b>Figure 18:</b> Complexe stable des flavonols (a) et flavone (b) avec AlCl <sub>3</sub> .....	28
<b>Figure 19:</b> Réaction générale d'un antioxydant avec le radical DPPH. ....	30
<b>Figure 20:</b> Courbe étalon de l'acide gallique.....	35
<b>Figure 21:</b> Courbe étalon de la catéchine. ....	35
<b>Figure 22:</b> Corrélation entre le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits de <i>C. pungens</i> . .....	36
<b>Figure 23:</b> Corrélation entre le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits des cônes de <i>P. halepensis</i> . ....	38

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Quelques composés phytochimiques isolés de certaines plantes et leurs propriétés biologiques .....	11
<b>Tableau 2:</b> Pouvoir antiradicalaire de quelques plantes.....	13
<b>Tableau 3:</b> Composition chimique des graines de <i>P.halepensis</i> .....	17
<b>Tableau 4:</b> Quelques propriétés biologiques de <i>Pinus halepensis</i> .....	18
<b>Tableau 5:</b> Activité antioxydante des différents de <i>P. halepensis</i> récoltés en Algérie.....	19
<b>Tableau 6:</b> Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux.....	27
<b>Tableau 7:</b> Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux.....	29
<b>Tableau 8:</b> Mesure de l'activité antiradicalaire des extraits par la méthode DPPH.....	31
<b>Tableau 9:</b> Mesure du pouvoir réducteur du fer des extraits par la méthode du FRAP.....	32
<b>Tableau 10 :</b> Caractéristiques des extraits de <i>C. pungens</i> .....	34
<b>Tableau 11:</b> Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>C. pungens</i> .....	36
<b>Tableau 12:</b> Caractéristiques des extraits des cônes de <i>P.halepensis</i> .....	37
<b>Tableau 13:</b> Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de <i>P.halepensis</i> .....	38
<b>Tableau 14:</b> Comparaison des résultats des travaux antérieurs sur le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>P. halepensis</i> récoltés dans la région de Tlemcen.....	39
<b>Tableau 15:</b> Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en pourcentage.....	40
<b>Tableau 16:</b> Effet de l'extrait eau-méthanol de <i>P.halepensis</i> sur la réduction de DPPH exprimé en pourcentage.....	40
<b>Tableau 17:</b> Effet BHA sur la réduction du fer (test du FRAP).....	41
<b>Tableau 18:</b> Absorbances de l'effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction de fer (FRAP).....	41
<b>Tableau 19:</b> Comparaison des valeurs d'IC50 de l'activité antioxydante des extraits de <i>Pinus halepensis</i> .....	43

# LISTE DES ABBREVIATIONS

**AGE:** Advanced Glycation end Product.

**CAT :** Catalase.

**GP :** Galate de propyle.

**GR :** Glutathion Réductase.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** peroxyde d'hydrogène.

**MGO:** Méthyl glyoxal.

**NO•:** monoxyde d'azote.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup> :** anion superoxyde.

**OH<sup>•-</sup> :** Radicale hydroxyl.

**ONOO• :** peroxytrite.

**Px :** Peroxydase.

**RAGE :** Advanced Glycation end Product Receptor.

**RCIS :** Chloride Reactive Species.

**RNS :** Reactive Nitrogen Species.

**ROS :** Reactive Oxygen Species.

**SOD :** Superoxyde Dismutase.

**THBQ :** tert-butyl hydroquinone.

**µg EAG/mg E :** Microgramme équivalent d'Acide Gallique par milligramme d'Extrait.

**µg EC/mg E :** Microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'Extrait.

**BHA :** Butyl Hydroxy Anissol.

**BHT :** Butyl Hydroxy Toluène.

**DPPH :** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

**FeCl<sub>3</sub> :** trichlorure de fer.

**FRAP :** Ferric Reducing Antioxidant power.

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> :** Ferricyanure de Potassium.

**PBS :** Solution Tampon Phosphate.

**TCA :** Acide Trichloracétique

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	21
1. Matériel végétal.....	22
2. Extractions.....	23
2.1 Extrait brut eau-acétone de <i>Centaurea pungens</i> .....	23
2.2 Extraits acétate d'éthyle et n-butanol de <i>Centaurea pungens</i> .....	23
2.3 Extrait brut eau-méthanol et eau-acétone de <i>Pinus halepensis</i> .....	23
2.4 Extraits acétate d'éthyle et n-butanol de <i>Pinus halepensis</i> .....	23
3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Centaurea penguns</i> et de <i>Pinus halepensis</i> .....	26
3.1 Dosages de polyphénols totaux.....	26
3.2 Dosage de flavonoïdes totaux.....	27
4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	29
4.1 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	29
4.2 Test du pouvoir réducteur du Fer (FRAP : <i>Ferric reducing antioxidant power</i> ).....	31
RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS.....	33
1. Rendements des extraits de <i>Centaurea pungens</i> .....	34
2. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Centaurea pungens</i> .....	34
3. Rendement des extraits de <i>Pinus halepensis</i> .....	36
4. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Pinus halepensis</i> .....	37
5. Analyse comparative des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>P. halepensis</i> récolté dans la région de Tlemcen.....	38
6. Activité antioxydante des extraits de <i>Pinus halepensis</i> .....	40
6.1 Effet de l'extrait eau-méthanol sur le piégeage du radical libre DPPH.....	40
6.2 Effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction du fer FRAP.....	40
7. Analyse comparative de l'activité antioxydante des extraits de <i>P. halepensis</i> récolté dans la région de Tlemcen.....	41
DISCUSSION.....	44
CONCLUSION.....	44
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	44





# INTRODUCTION



Les facteurs environnementaux liés aux mauvaises hygiènes de vie contribuent à des perturbations au niveau de l'organisme. Ces perturbations sont reliées principalement à une surproduction des espèces réactives associée à une diminution des fonctions du système antioxydant. Ceci conduit à un état de stress oxydatif responsable de l'installation de certaines pathologies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer. L'apport en antioxydants est indispensable bien que certains antioxydants chimiques présentent des effets toxiques. Les espèces végétales constituent une source inépuisable en molécules antioxydantes qui s'avèrent plus efficaces et moins toxiques **(Leeuwenburgh et Heinecke., 2001)**.

Le développement de nouveaux médicaments plus efficaces, moins toxiques et moins coûteux a suscité un grand intérêt de la recherche scientifique dans le domaine pharmaceutique, et s'appuie largement sur l'exploitation des plantes médicinales comme source de nouveaux principes actifs d'origine végétale. Plusieurs molécules bioactives antioxydantes ont été identifiées à partir des espèces végétales (plante, fruits et légumes) notamment les polyphénols et les flavonoïdes **(Ehrhart, 2003)**.

L'objectif principal des recherches actuelles se résume à l'évaluation des activités biologiques des extraits de plantes médicinales endémiques ou locales, afin de mettre en évidence leurs effets thérapeutiques. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés dans notre étude à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces, *Centaurea pungens* appartient à la famille des astéracées et répandue dans des pâturages rocheux et sableux en Algérie dans les régions de Bechar et Adrar, et *Pinus halepensis*, famille des pinacées, répandu en Algérie et en les régions méditerranéenne.

Notre approche expérimentale consiste à déterminer la teneur en composés phénoliques dans les extraits de la partie aérienne de *Centaurea pungens* et les cônes de *Pinus halepensis*, et à évaluer le pouvoir antioxydant de quelques extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, et la méthode du FRAP.



SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE



L'ère industrielle a considérablement facilité les modes de vie de l'Homme en modifiant ces habitudes quotidiennes, sociologiques, alimentaires, activités physiques, etc.... Ces modifications constituent une forme de risque pour la santé humaine, car elles ont favorisé la propagation, d'une alimentation de plus en plus déséquilibrée riche en sucres et en lipides, la restauration rapide « fast-food », et un manque d'activités physiques. Cette nouvelle hygiène de vie provoque un vieillissement cellulaire accompagné d'une altération globale des fonctions biologiques, et l'installation des désordres métaboliques comme le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle, et de nombreuses pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, etc. ... **(Baraka-Vidot, 2014)**. Le vieillissement cellulaire est étroitement lié à une augmentation de l'oxydation mitochondriale et une accumulation des radicaux libres, qui seront responsable de la génération du stress oxydatif **(Rani et al., 2016)**.

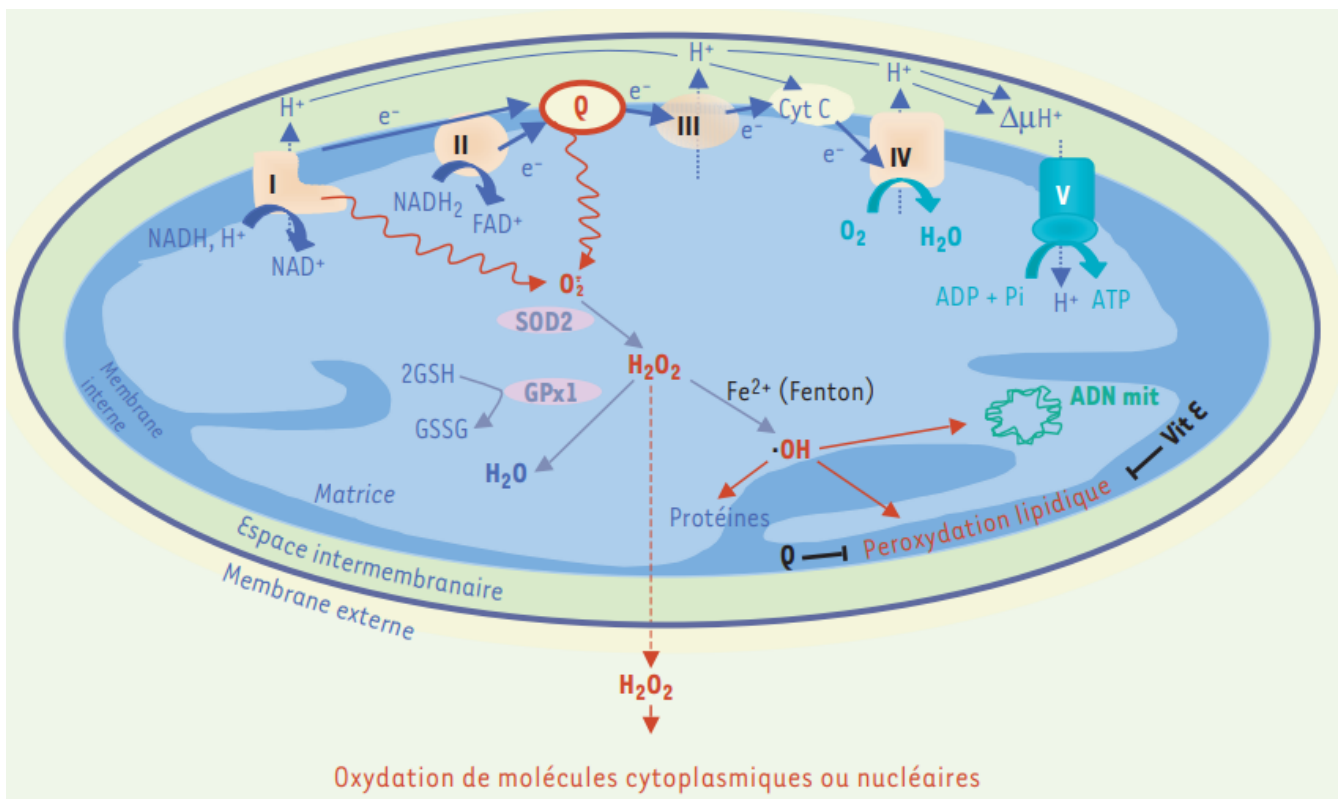
Le stress oxydatif est un déséquilibre profond de la balance pro-oxydant/antioxydant, associé à une production exagérée des agents oxydants et des radicaux libres non neutralisés **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**. Ce qui provoque une altération des mécanismes de défense, et par conséquence l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les agressions des pro-oxydants via un système antioxydant **(Gutteridge, 1994; Sies et al., 2017)**.

Les pro-oxydants majeurs qui sont à l'origine du stress oxydatif sont les radicaux libres. Définis comme des molécules chimiques qui comportent un ou plusieurs électrons non-appariés (libres) dans la couche externe. Ils deviennent très réactifs avec une forte tendance à oxyder les composés voisins en leur arrachant un électron, pour l'apparier à l'un de ces électrons célibataires, et déclenchent une chaîne de peroxydation **(Leverve, 2009)**. Les radicaux libres, appelés également les espèces réactives, existant sous forme radicalaire ou non-radicalaire, et selon leurs molécules productrices sont familiarisés en, espèces réactives d'oxygène ROS (*Reactive Oxygen Species*), espèces réactives de l'azote RNS (*Reactive Nitrogen Species*) et espèces réactives chlorés RCIS (*Chloride Reactive Species*) **(Couaillet, 2015)**.

La production des espèces réactives par l'organisme est manifestée par des facteurs déclenchant endogènes ou exogènes, qui contribuent d'une manière directe ou indirecte à cette production **(Rioux, 2009)**. Plusieurs sources exogènes physiques et chimiques peuvent déstabiliser les molécules biologiques et provoquent la génération des radicaux libres **(Leverve, 2009)**. Ces sources sont liées à une mauvaise hygiène de vie, à l'exposition excessive aux radiations ionisantes (rayon X), la lumière UV, le tabac, les polluants photochimiques, et aussi certains médicaments toxiques **(Allain, 2008 ; Baraka-Vidot, 2014)**.

En outre, les processus biologiques au niveau de la cellule représentent une source endogène des radicaux libres, notamment les réactions chimiques d'oxydo-réduction indispensables aux processus cellulaires qui impliquent la mitochondrie, le cytosol, les peroxysomes, les microsomes, leucocyte, et d'autres inclusions intracellulaires présentent un siège de la genèse des radicaux libres (Rioux, 2009).

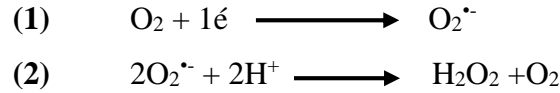
Cependant, le métabolisme cellulaire de l'oxygène y est compris l'oxydation phosphorylante mitochondriale couplée à la chaîne respiratoire, représente une source principale de production des espèces réactives dérivées de l'oxygène. L'oxygène, est considéré comme une molécule clé de la respiration pulmonaire, et qui intervient aussi au centre du métabolisme énergétique cellulaire (Carrière *et al.*, 2006). Au cours de ce processus physiologique qui a pour but de produire l'ATP par le complexe ATP-synthase et de maintenir l'homéostasie énergétique ; l'oxygène se réduit en molécules d'eau. Il est donc utilisé autant qu'un accepteur final des électrons transportés à travers la chaîne de transport des électrons, libérés par les donneurs NADH et FADH<sub>2</sub> (Koechlin-Ramonatxo, 2006). La fuite des électrons au niveau des complexes enzymatiques tels que le NADH-oxydase (complexe I) et complexe III de la chaîne respiratoire, représente aussi une source productrice de l'anion superoxyde, dont 1 à 5% d'oxygène dissous réagit avec les électrons échappés (figure1) (Beaudeau *et al.*, 2006; Carrière *et al.*, 2006).



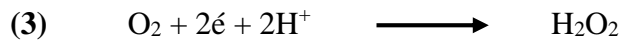
**Figure 1:** Production mitochondrial de l'anion superoxyde par les complexes enzymatiques (Carrière *et al.*, 2006).

Les ROS (*Reactive Oxygen Species*) regroupent les espèces réactives radicalaires et non-radicalaires, issus du métabolisme d'oxygène généré en chaîne (**figure2**). Le radical clé de cette chaîne est l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui permet le déclenchement de production d'autres ROS secondaires. Il est produit à partir de la première réduction mono-électronique de l' $O_2$  (1).

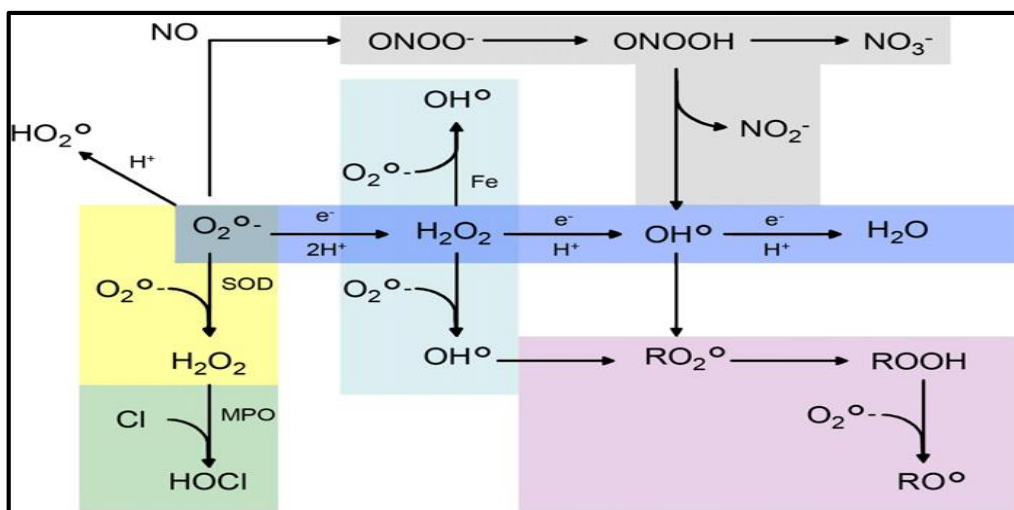
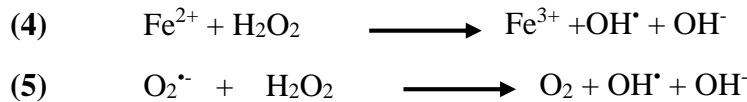
La neutralisation de l'anion superoxyde par superoxyde dismutase (SOD) (2) génère le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).



$H_2O_2$  ou l'eau oxygénée, c'est un composé non radicalaire stable qui diffuse dans les cellules, et utilisé comme source de molécule d'eau. Il peut être aussi formé directement à partir de l'oxygène par une réduction biélectronique spontanée ou catalysée par nombreuses enzymes (NAD(P)H oxydase, glucose oxydase, urate oxydase, cytochrome P-450) (3). Sa toxicité est traduite par son intervention dans la formation du radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  hautement réactif (**Gutteridge, 1994**).

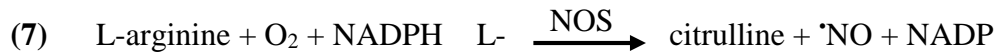


Le  $OH^{\bullet}$  produit selon la réaction de fenton (4) à partir de  $H_2O_2$  réagit avec des métaux notamment l'ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ), ou par réaction de  $O_2^{\bullet-}$  avec  $H_2O_2$  (réaction de Haber-Weiss) (5). Le radical hydroxyle est le plus dangereux, car il présente une réactivité vis-à-vis de toutes les biomolécules et il est capable d'agir directement sur le site de production (**Griendling *et al.*, 2016; Valko et al., 2006**).



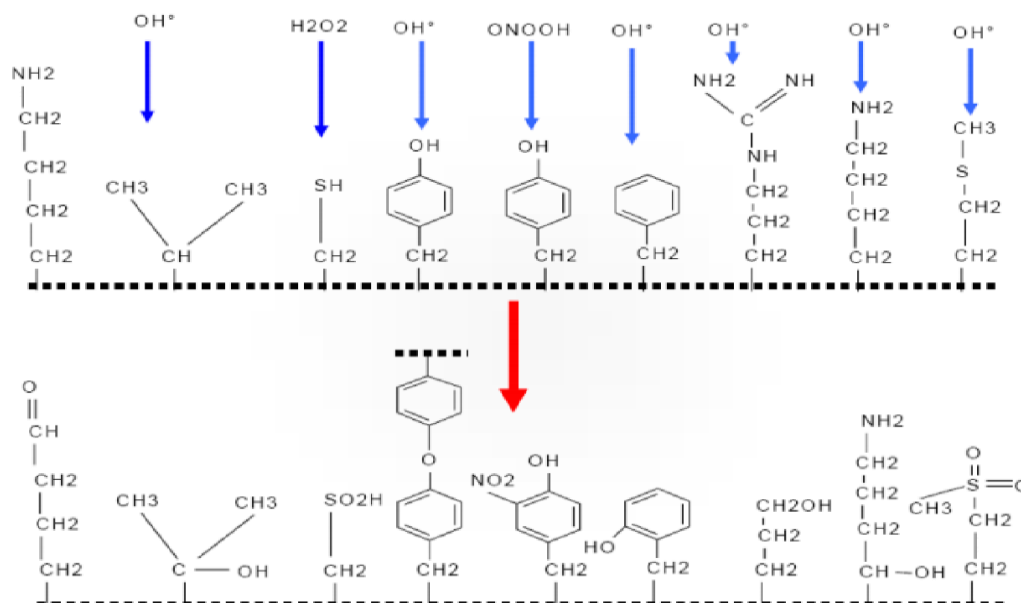
**Figure 2** : La production en cascade des radicaux libres à partir de l'anion superoxyde (**Koechlin-Ramonatxo 2006**).

La famille des espèces réactives de l'azote (RNS) regroupe des composés azotés qui dérivent du métabolisme d'O<sub>2</sub> au cours du stress oxydant (**Mongens, 2013**). De ce fait, les ROS interviennent dans la production des RNS notamment le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), formé par la réaction de O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le monoxyde d'azote (NO) (6), qui est à son tour produit à partir de l'oxydation de L-arginine sous l'action de NO-synthase (NOS) (7) (**Dröge, 2002; Fang et al., 2002**).



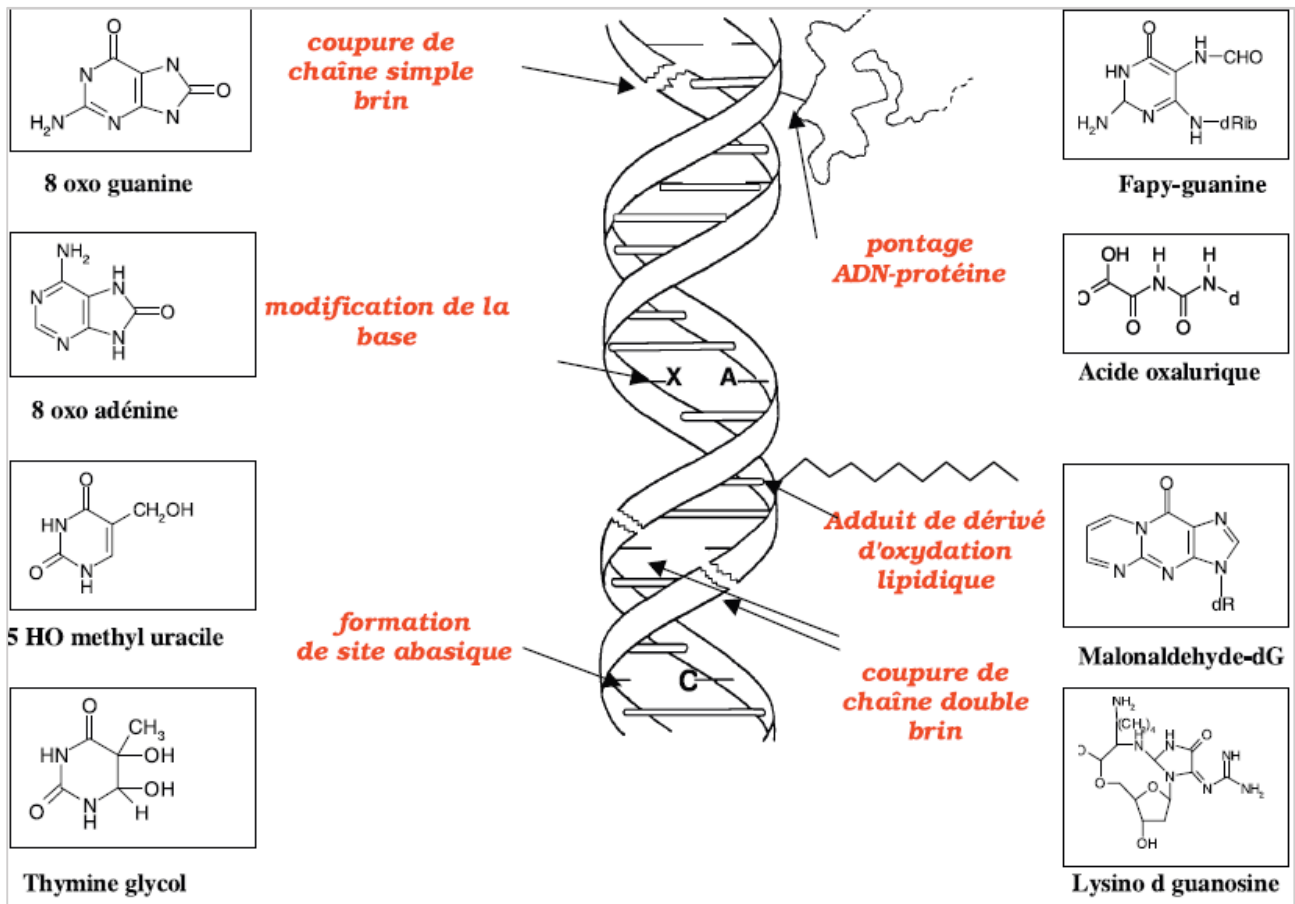
Les ROS et RNS sont des agents oxydants générés physiologiquement via plusieurs voies. Ils ont un effet bénéfique en participant à certaines fonctions biologiques, notamment dans les voies de régulation et de signalisation, précisément la signalisation redox intracellulaire où les espèces réactives permettent la transduction des signaux par modification de l'équilibre redox (**Dröge, 2002**). Dans les défenses immunitaires, les ROS et RNS sont produits au cours des réactions inflammatoires et au cours de la phagocytose, comme le O<sub>2</sub><sup>-</sup> qui joue le rôle d'un bactéricide, et <sup>•</sup>NO qui favorise la lésion des bactéries et des parasites (**Valko et al., 2006**).

Par ailleurs, les ROS et RNS sont nuisibles en cas d'une production excessive et non contrôlée. Car, ils ont la capacité d'infliger des dommages moléculaires et cellulaires traduits par l'apparition de nombreuses pathologies chroniques et aiguës (cardiovasculaires, dégénératives, métaboliques,...etc.). Selon **Favier (2003)**, la conséquence biochimique du stress oxydant est l'oxydation des biomolécules, acides nucléiques, lipides, glucides et protéines (**figure 3**).



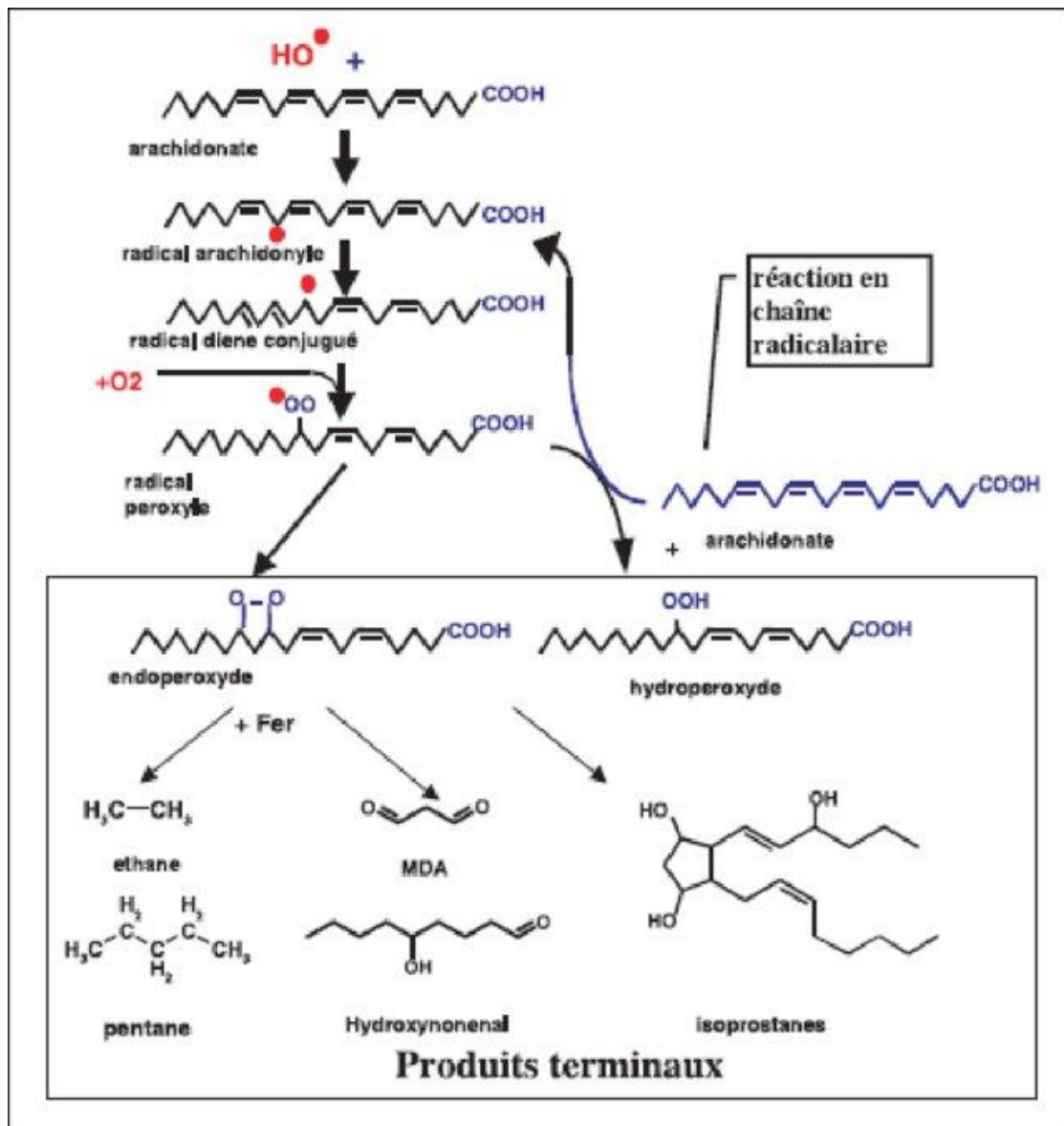
**Figure 3:** Attaque radicalaire des acides aminés (**Favier 2003**).

Les chaînes carbonylées des acides gras polyinsaturés sont des sites privilégiés des radicaux libres. Ces modifications oxydatives touchant les structures cellulaires, principalement les membranes plasmiques, provoquent des lésions au niveau des brins d'ADN, un disfonctionnements des macromolécules comme les protéines (enzymes, transporteurs, récepteurs,..., etc.) (**Figure 4**). De même, l'oxydation des macromolécules favorise la génération de nouveaux radicaux libres et des produits finaux toxiques, comme le cas de peroxydation lipidique, qui produit dès la présence de l'oxygène des hydroperoxydes (ROOH) instables (**figure 5**) (Cillard et Cillard, 2006; Stadtman et Levine, 2006; Therond, 2006).



**Figure 4:** Dommage oxydatif de la molécule de l'ADN (Favier 2003).





**Figure 5:** Produits terminaux de peroxydation lipidique par des radicaux libres (Favier 2003).

Les glucides sont eux même exposés aux dommages oxydatifs. L'attaque radicalaire de monoaldéhydes libère des cétoaldéhydes toxiques. La glycoxydation physiologique augmente au cours d'un stress oxydant associé à une hyperglycémie, car le D-glucose est le plus sensible au stress oxydatif, il se transforme en aldéhyde telle que glyoxal et méthylglyoxal (MGO) (Halliwell et Gutteridge, 2015). Ces produits toxiques induisent un vieillissement des protéines, des coupures, des dysfonctionnements et des modifications structurales et provoquent la glycation des protéines (albumine, collagène, laminine) en se condensant sur des résidus aminoacides selon une réaction non enzymatique. Ces protéines glyquées favorisent la production des AGE (*Advanced Glycation End Product*) suite à des réactions complexes et irréversibles. Les AGE sont des produits terminaux dangereux capables de stimuler des voies de signalisations qui participent au développement du stress

oxydant et des complications du diabète, en se fixant sur les récepteurs spécifiques des AGE (RAGE : *Advanced Glycation end Product Receptor*) (**Bonnefont-Rousselot et al., 2004**).

Il est intéressant de souligner que le stress oxydant pourrait être à l'origine de nombreuses pathologies, comme il pourrait être la conséquence d'une pathologie. Pour se protéger, l'organisme développe des mécanismes de détoxification contre les dommages oxydatifs. Il s'agit des antioxydants.

Les antioxydants regroupent des molécules complexes présentes à faible dose, capables de prévenir l'oxydation des biomolécules en neutralisant les radicaux libres ou en empêchant l'accumulation des biomolécules oxydées et leurs fragments toxiques (**Halliwell et Gutteridge, 2015**). Ils peuvent agir autant que piègeurs des radicaux libres, donneurs des électrons ou protons, inhibiteurs d'enzymes, ou comme agents chélateurs (**Lobo et al., 2010**).

La défense antioxydante comporte des systèmes enzymatiques et non enzymatiques, endogènes et exogènes. Le système enzymatique, représenté par superoxyde dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxydases (Px), et glutathion réductase (GR), forment la première ligne de défense et permettent l'élimination des radicaux libres via la formation des composés neutres comme l'eau (**Garait, 2006; Rioux, 2009**).

Le système non enzymatique inclut les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc), les protéines (ferritine, transferrine) et les vitamines (acides ascorbiques (vitamine C),  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)). L'acide urique et albumine représentent 85% de la capacité antioxydante dans le plasma. L'interaction des antioxydants non enzymatiques avec les radicaux libres maintient la formation des molécules plus stables, c'est-à-dire que les antioxydants perdent des électrons en gardant leur stabilité (**Liguori et al., 2018; Pincemail et al., 2002**).

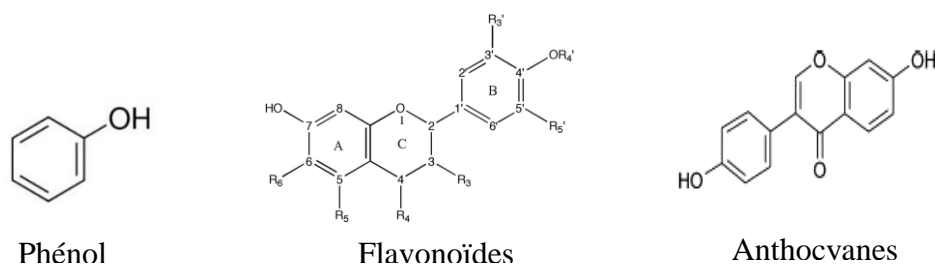
De nombreuses recherches scientifiques ont révélé que les antioxydants possèdent plusieurs propriétés supplémentaires que leur capacité à piéger les radicaux libres. La biologie moléculaire a montré leur implication dans les processus de régulation et de signalisation, citant la vitamine E capable d'inhiber la prolifération cellulaire, et le sélénium qui diminue la mitose des cellules tumorales, ce qui indique que leur activité anticancéreuse est associée à une augmentation de la réponse immunitaire. En outre, les études épidémiologiques et cliniques indiquent que les antioxydants peuvent prévenir de nombreuses pathologies et leurs complications graves associées au stress oxydatif notamment les maladies cardiovasculaires et le diabète (**Pincemail et al., 2002**).

Une autre gamme des antioxydants de synthèse, largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour protéger les aliments gras contre l'oxydation, est représentée par BHT (Hydroxytoluène butylé), BHA (Hydroxyanisole butylé), GP (Gallate de propyle) et THBQ (Tert-butyl hydroquinone). L'utilisation de ces antioxydants synthétiques, ayant une structure phénolique, a montré une certaine toxicité et des effets indésirables, contrairement aux antioxydants naturels qui sont moins dangereux et bien acceptés par l'organisme (**Lobo et al., 2010; Rolland, 2004**).

Aujourd'hui, les espèces végétales constituent une source importante et riche en molécules bioactives caractérisées par une large variété d'activités biologiques notamment l'activité antioxydante. Ces substances connaissent un intérêt croissant dans le domaine de la santé. Dans le monde, environ 25 % des prescriptions médicales sont à base de plante, et 60 à 70 % des médicaments antibactériens et anticancéreux sont d'origine végétale. En Afrique, 80 % de la population utilisent des drogues préparées à partir des végétaux qui poussent dans leur ville (**Guillouty, 2016**).

Les molécules bioactives d'origine végétale sont souvent représentées par les métabolites secondaires. C'est un groupe hétérogène de produits naturels intermédiaires des réactions biochimiques au cours du métabolisme. Ils assurent la protection des végétaux contre le stress biotique et abiotique. Les métabolites secondaires constituent le principe actif de nombreux médicaments, antibiotiques, inhibiteurs enzymatiques, immuno-modulateurs, agents anti-tumoraux... (**Tableau 1**). Ils sont identifiés et classés en fonction de leurs diversités, structures, fonctions, et voies de biosynthèse. Selon la structure chimique, on distingue trois classes majeures, les composés phénoliques, azotés et terpéniques (**Thirumurugan et al., 2018**).

Le principal groupe des métabolites secondaires chez les végétaux est représenté par les composés phénoliques. Ils correspondent à une large gamme de structure chimique des dérivés aromatiques hydroxylés non azotés, qui se trouvent libres ou engagés avec autres fonctions forment des structures plus au moins complexes (**figure 6**). Cette famille regroupe les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les anthocyanidines (**Vermerris et Nicholson, 2007**).



**Figure 6:** Structures de base de certains composés phénoliques.

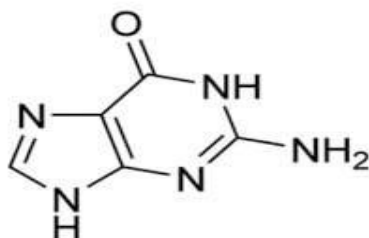
**Tableau 1:** Quelques composés phytochimiques isolés de certaines plantes et leurs propriétés biologiques (Parveen *et al.*, 2018).

Plante	Composé	Classe de composé	Effet thérapeutique
<i>Berberis vulgaris</i>	Berbérine	Alcaloïde	Antioxydant, anti-inflammatoire, anti peroxydation lipidique.
<i>Crocus sativus</i>	Crocine	Terpène (caroténoïde)	Antioxydant, anti hyperglycémie, anti-obésité, protecteur cardiovasculaire.
<i>Menthe spicata</i>	Limonène	Terpène	Antidépresseur, antifongique, antioxydant.
<i>Pinus halepensis</i>	Pinène	Terpène	Antioxydant, antifongique, broncho-dilatateur.
<i>Piper nigrum</i>	Caryophyllène	Terpène	Antioxydant, anti-inflammatoire.
<i>Thymus</i>	Myrcène	Terpène	Antiseptique, antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire.
<i>Cassia curiculata</i> <i>Ginko biloba</i>	Quercétine	Flavonoïde	Anti-inflammatoire, antioxydant, antihypertensive, anti-hyperinsulinémie.
<i>Curcuma longa</i>	Curcumine	Polyphénol	Antioxydant, anti-inflammatoire, protecteur cardiovasculaire, anti-hyperglycémie.
<i>Mangifera indica</i>	Mangiférine	Polyphénol	Anti-inflammatoire, antioxydant, anti-AGE, neuroprotecteur, anti-hyperglycémie.
<i>Vitis vinifera</i>	Resvératrol	Polyphénol	Antioxydant, anti-inflammatoire, anti-AGE, anti-hyperglycémie, anticancéreux.
<i>Zingiber coagulans</i>	Gingérole	Polyphénol	Antioxydant, anti-hyperglycémie, anti-inflammatoire, anticancéreux.
<i>Camellia sinensis</i>	Catéchine	Flavonol	Antioxydant, protecteur cardiovasculaire, régulateur de la thermogénèse, prévention de cancer.

Les groupements hydroxyles des composés phénoliques leur confèrent de nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques. Ils sont responsables d'un pouvoir antioxydant élevé résumé à une neutralisation des radicaux libres et empêchement de leurs réactions. Ils régulent le fonctionnement du système immunitaire, et inhibent la prolifération des cellules cancéreuses. Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, tels que les enzymes responsables de la libération des substances endogènes responsables de l'asthme. De plus, les tanins qui sont caractérisés par leur pouvoir de

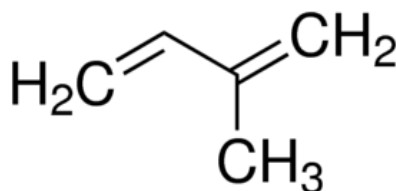
former des complexes avec les macromolécules en particulier les protéines, inhibent la peroxydation lipidique (Clérivet *et al.*, 1996; Macheix *et al.*, 2005).

Les composés azotés représentés par les alcaloïdes, sont des composés organiques plus au moins basiques, hétérocycliques, et azotés (figure 7). Ils forment un groupe très hétérogène classé selon leurs voies de biosynthèse en alcaloïdes vrais, pseudo et proto-alcaloïdes (Hughes *et al.*, 1976).



**Figure 7:** Structure de base des alcaloïdes.

Les composés terpéniques est une classe de substances naturelles extrêmement abondante, représentée majoritairement par les huiles essentielles. L'isoprène (figure 8), le squelette de base, est constitué de cinq carbones en forme cyclique ou en chaîne ouverte, engagés avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone,...) (Malecky, 2008).



**Figure 8:** Isoprène, structure de base des terpènes.

Les terpénoïdes possèdent divers activités biologiques, ils ont principalement un effet, antimicrobien et antiviral, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tumoral, analgésiques, antispasmodique et antitussives (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

De nombreuses plantes aromatiques et médicinales sont testées pour leurs effets antioxydant. Cependant, le **tableau 2** présente quelques exemples des plantes qui ont une activité antiradicalaire sur DPPH.

**Tableau 2:** Pouvoir antiradicalaire de quelques plantes.

Espèces	Partie utilisée	Piégeage du DPPH (IC <sub>50</sub> µg/ml)	Référence
<i>Ammoides verticillata</i>	Partie aérienne	15,37	<b>Attou et al., 2017</b>
<i>Pistacia lentisuc</i>	Feuilles	29,64	<b>Bouyahya et al., 2019</b>
<i>Laurus nobilis</i>	Feuilles	18 ,93	<b>Dudonné et al., 2009</b>
<i>Lavundula augustifolia</i>	Fleurs	1,46	<b>Dudonné et al., 2009</b>
<i>Allium tuberosum</i>	Feuilles	6,5	<b>Katsube et al., 2004</b>

La biodiversité climatique et végétale en Algérie lui accorde une richesse en plantes médicinales largement utilisées en médecine traditionnelle locale. Plusieurs études scientifiques à l'université de Tlemcen se sont intéressées aux plantes médicinales locales dans le cadre de la valorisation de leurs activités biologiques. Au laboratoire Antibiotique, Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, la recherche s'intéresse à une gamme de plantes médicinales locales ou du Sud-Ouest algérien, pour étudier leurs propriétés phytochimiques et biologiques. Dans le présent travail nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis* et *Centaurea pungens*.

*Centaurea Pungens*, appartient au genre centaurée et à la famille des astéracées (composées), est une plante herbacée annuelle ou vivace, à fleurs de couleurs qui varient entre le rose, pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Cette plante qui pousse spontanément, est largement distribuée dans le monde. En Algérie ce genre regroupe environ 45 espèces, dont sept espèces sont distribuées dans le désert. *Centaurea pungens* est une de ces espèces (**Hellwig, 2003**).

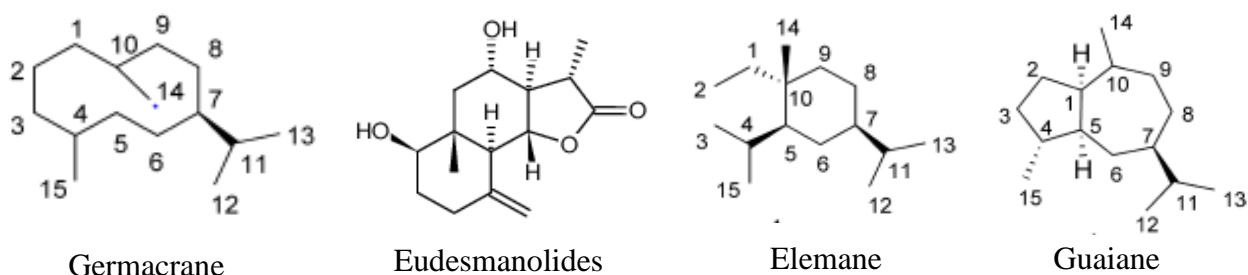
Elle est répandue dans des pâturages rocheux et sableux en Algérie dans les régions de Bechar et Adrar. C'est une plante herbeuse rampante, parfois forme des touffes. Des tiges non aillée portent des feuilles pentalobées revêtues en poils blancs courts et raides. Fleurs violettes réunies en capitules globuleux (**Figure 9**). Les bractées involucreaux portant plusieurs épines plus au moins teintés de brun à la base. Cette espèce est caractérisée par un goût amer (**Ozenda, 1983**).



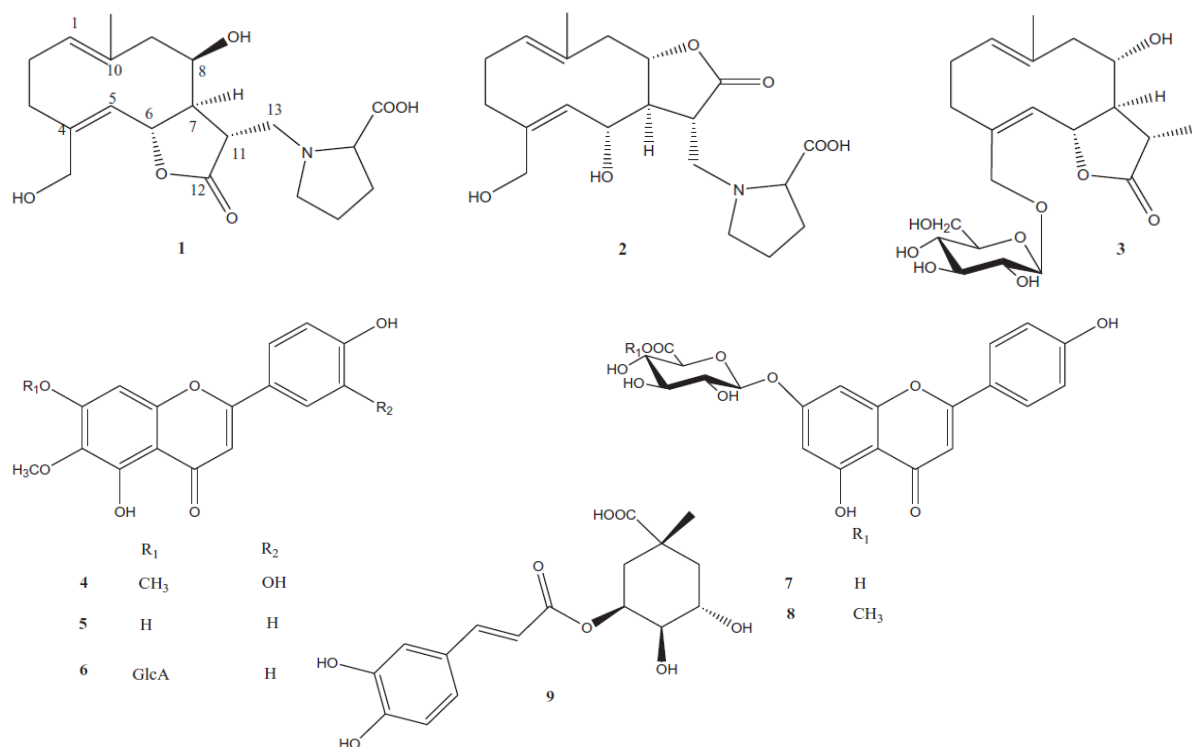
**Figure 9:** *Centaurea pungens*(Booth, 2009).

En médecine populaire locale dans la région d'Adrar *C. Pungens* est utilisée pour des fins thérapeutiques contre le diabète, les maladies de la peau (allergie), la fièvre, et les maladies du tube digestif (Labeled *et al.*, 2019).

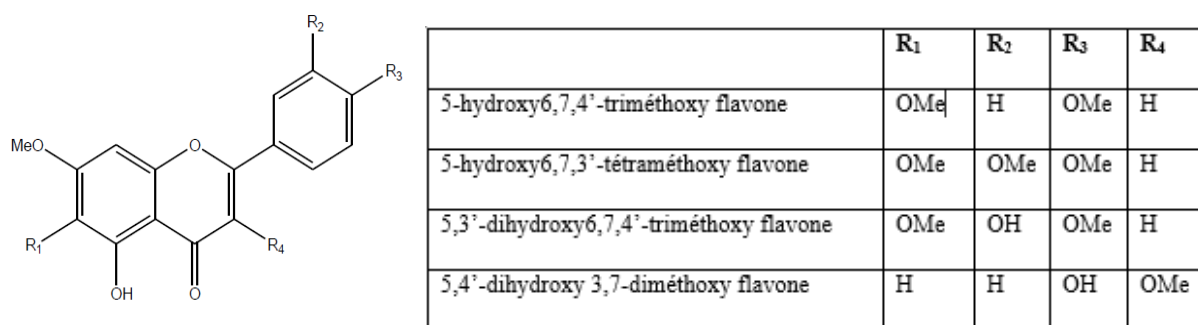
Les effets thérapeutiques que présente *C. pungens* sont relatifs à sa composition chimique, qui confère à la plante une variété d'activités biologiques et pharmacologiques ; antibactérienne, antifongique, antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique (Adekenov, 2017; Bruno *et al.*, 2013). Elle contient les flavonoïdes, stéroïdes, alcaloïdes et les lactones sesquiterpéniques (figure10) (Azzouzi Djihane 2017; Labeled *et al.*, 2019). Ces derniers sont les principaux composés caractéristiques des centaurées, présents dans la partie aérienne. Labeled *et al.* (2019), ont identifiés dans la partie aérienne de *C. pungens* deux nouvelles molécules lactones sesquiterpéniques conjuguées aux acides aminés (la proline) : centaureolide A (1) et centaureolide B (2) ; un sesquiterpène de type germacrane (3), cinq flavonoïdes (4-8) et un dérivé de l'acide quinique (9) (figure 11). Autres flavonoïdes ont été déterminés dans cette espèce (figure 12) (Azzouzi Djihane 2017).



**Figure 10:** Lactones sesquiterpènes isolés de *C.Pungens* (Bruno *et al.*, 2013).



**Figure 11:** Structure chimique de certains phytoconstituants isolés de la partie aérienne de *Centaurea pungens* (Labeled et al., 2019).



**Figure 12:** Structure chimique des flavonoïdes isolés de *C.Pungens* (Azzouzi Djihane 2017).

Le nombre modeste des travaux scientifiques réalisés sur les activités biologiques de *c. pungens*, a permis de mettre en relief principalement l'effet antimicrobien de lactones sesquiterpéniques (les composés amers) et des flavonoïdes (Labeled et al. ; 2017). Une activité antiradicalaire sur le DPPH et anti-péroxydation lipidique ont été évalués sur les extraits aqueux et méthanolique (Hamdi I. et Belkacem F. 2017).



La deuxième espèce végétale qui a fait l'objet de notre étude est *Pinus halepensis*, couramment appelé le pin d'Alep, très répandu en Algérie et dans la région méditerranéenne. Il appartient à la famille des pinacées, appelée aussi les résineux du fait de leur richesse en résine. Cet arbre toujours vert et vivace, dépasse les 20 mètres de hauteur souvent penchés et peu droit, un cîné écrasé irrégulier et clair mais ses branches sont assez étalées. L'écorce épaisse est très utilisée dans le domaine industriel. Les aiguilles sont de fausses feuilles persistantes et filiformes (**figure 13**). Les cônes qui caractérisent les conifères remplacent le fruit, sont formés d'écailles et renferment à l'intérieur les graines (**Prévosto, 2013**).



<https://www.google.com/search?q=pinus+halepensis>

**Figure 13:** *Pinus halepensis* (Mill).

Localement, le pin d'Alep connu sous le nom de Senouber (الصنوبر), présente une grande importance socio-économique et écologique. Il est utilisé en médecine traditionnelle, le plus souvent comme antiseptique puissant des infections des voies respiratoires pulmonaires et urinaires. Il est également utilisé dans le traitement de la grippe, sinusite, rhumatisme, les calculs biliaires, le soulagement des problèmes gastro-intestinaux tel que les ulcères de l'estomac et dans le traitement des maladies cardio-vasculaire (**Mesboua et Saidi, 2019**). En usage externe, la résine peut être mélangée avec l'huile d'olive ou le miel et appliquée sur les parties infectées comme préventives. L'huile de pin, riche en acide gras insaturé, trouve son utilisation dans la cuisine comme ingrédient pour les soupes et le vinaigre (**Fekih et al., 2014; Postu et al., 2019**).

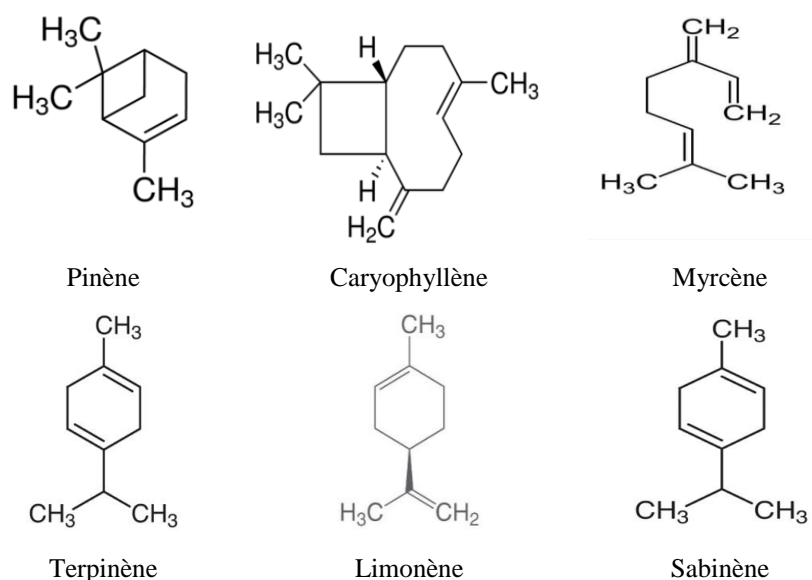
Les analyses phytochimiques pour l'identification des principes actifs dans différentes parties de *P. halepensis* notamment les feuilles et les graines, ont concerné majoritairement les huiles essentielles, et à degrés moindre les autres métabolites secondaires. Ils ont révélé la richesse de cette espèce en métabolites secondaires, les polyphénols (50%), l'acide gallique, acide coumarique, acide

protocatéchique, acide vanillique, 4-hydrobenzoïque, et en flavonoïdes spécifiquement les flavonols tels que quercétine (26,2%), isorhamnétine (26,2%), kaempférol (23,2%) (**Pasqualini et al., 2003**). Autres éléments ont été détecté dans les feuilles tel que l'aluminium, calcium, potassium, magnésium, manganèse, sodium, zinc, sélénium, molybdène, barium (**Zeiner et al., 2019**). Selon les travaux de **Cheikh-Rouhou et al., (2006)** les graines de *P. halepensis* oléagineuse comportent une composition chimique variable en protéines, lipides et métabolites secondaires et en macroéléments (**tableau 3**).

**Tableau 3:** Composition chimique des graines de *P.halepensis*.

Composants	Teneur en %
<b>Protéines</b>	22,7
<b>Acides aminés essentielles</b>	70
<b>Lipides</b>	43,3
Acide oléique	27,3
Acide linoléique	48,8
Acide palmitique	8,75
<b>Sucres</b>	5,55
<b>Phénols</b>	3,71
<b>Flavonoïdes</b>	2,17
<b>Magnésium, potassium, calcium</b>	1

Les feuilles (aiguilles) et les graines de *P. halepensis* sont très riches en huiles essentiels, dont les analyses chromatographiques réalisées sur une espèce algérienne, ont montrés un mélange complexe de composants (plus de 41 composés) avec des fractions cohérentes de monoterpènes, sesquiterpènes et des composés hydrocarboniques. Les composés prédominants en commun identifiés sont ( $\alpha/\beta$ ) pinène, ( $\alpha/\beta$ ) caryophyllène, myrcène, sabinène (**figure 14**). Autres composés minoritaires ont été marqué tel que, limonène, thygène, 3-carène,  $\alpha$ -terpinène, terpinène 4-acétate,  $\gamma$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinolène et phénul-éthyl-isolvalerate (**Dob et al., 2005; Mitić et al., 2019; Nina Sadou et al., 2015**).



**Figure 14** : Composés majoritaires des huiles essentielles de *P. halepensis*.

De nombreuses propriétés biologiques, antioxydante, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, antiseptique, anti-tumorale,... ont été démontrées par de nombreuses études scientifiques réalisées sur différents extraits de *P. halepensis* (Fekih *et al.*, 2014). Le **tableau 4** résume certaines propriétés. Parmi les activités biologiques les plus étudiées de cette espèce, l'activité antimicrobienne et antioxydante. Le **tableau 5** regroupe quelques travaux réalisés en l'Algérie sur l'activité antioxydante des extraits de différentes parties de *P.halepensis* (feuilles, cônes, graines, écorce) en utilisant différents tests (DPPH, ABTS, TPTZ, FRAP et inhibition de peroxydation lipidique).

**Tableau 4**: Quelques propriétés biologiques de *Pinus halepensis*.

Partie de la plante	Activités biologiques	Références
Graines	Antioxydant Anti-inflammatoire Anticoagulant Antibactérien Antifongique Anti-hémolytique Antidiabétique Hypocholestérolémie Gastro-protecteur	Abbou <i>et al.</i> , 2019; Benzitoune et Boutouil, 2018; Guemiri e Karouche, 2017
Feuilles	Antioxydant Antibactérien	Bouyahya <i>et al.</i> , 2019; Nina Sadou <i>et al.</i> , 2015
Ecorce	Antioxydant Anti-hyperglycemie	Houairi Souhila, 2019; Najoua Salhi, 2020
Cônes	Antioxydant antibactérien	Al-Bazaz <i>et al.</i> , 2018

**Tableau 5:** Activité antioxydante des différents de *P. halepensis* récoltés en Algérie.

Partie utilisée	Extrait testé	Test d'évaluation de l'activité antioxydante	IC <sub>50</sub> (µg/ml) ou pourcentage d'inhibition (%)	Références
<b>Feuilles</b>	Aqueux :	DPPH	IC <sub>50</sub> = 210,68	
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> = 242,2	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> = 218,8	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> = 246,5	
<b>Feuilles</b>	Aqueux :	FRAP	IC <sub>50</sub> =814,14	<b>Benaziza, (2017)</b>
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> =841,7	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =205,4	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =921,7	
<b>Feuilles</b>	Aqueux :	β-carotène	IC <sub>50</sub> =987,2	
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> =1028	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =597,4	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =871	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	DPPH	IC <sub>50</sub> =7,3	
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> =58,78	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =26,85	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =29,61	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	FRAP	IC <sub>50</sub> =142,39	<b>Benaziza, (2017)</b>
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> =767,17	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =435,2	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =165,29	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	β-carotène	IC <sub>50</sub> =420	
	Eau-acétone :		IC <sub>50</sub> =255,8	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =310,7	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =301,9	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	DPPH	IC <sub>50</sub> = 11,81	
	Eau-méthanol :		IC <sub>50</sub> =7,45	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =8,5	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =12,3	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	FRAP	IC <sub>50</sub> =138	<b>BENTRAR, (2018)</b>
	Eau-méthanol :		IC <sub>50</sub> =106	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =135	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =201,88	
<b>Cônes</b>	Aqueux :	β-carotène	IC <sub>50</sub> =286,4	
	Eau-méthanol :		IC <sub>50</sub> =320,64	
	Acétate d'éthyle :		IC <sub>50</sub> =212,59	
	N-butanol :		IC <sub>50</sub> =457,49	
<b>Résine de l'écorce</b>	Phénolique (éthanol 95%)	FRAP	0.63	<b>Kheyar-kraouche, et mechouche, (2017)</b>
		DPPH	70,86	
<b>Ecorce</b>	Aqueux	DPPH	IC <sub>50</sub> = 0,08	<b>Houairi souhila, (2019)</b>
	Méthanol		IC <sub>50</sub> = 0,02	

	Polysaccharidique			
<b>Graines délipidées</b>	Extraction enzymatique :	DPPH	24,34	<b>Slimani et Derbal Laidli, (2018)</b>
	Extraction par l'eau chaude :		35,62	
<b>Graines dilipidées</b>	AP : acétonique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> =79,90	<b>Abbou et al. (2019)</b>
	EP : éthanolique polysaccharidique	DPPH	IC <sub>50</sub> = 82,02	
	PP : propanolique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> = 85,97	
<b>Graines dilipidées</b>	AP : acétonique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> = 57,29	<b>Abbou et al. (2019)</b>
	EP : éthanolique polysaccharidique	ABTS	IC <sub>50</sub> = 99,54	
	PP : propanolique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> = 676	
	AP : acétonique polysaccharidique		EC <sub>50</sub> = 46,40	<b>Abbou et al. (2019)</b>
	EP : éthanolique polysaccharidique	FRAP	EC <sub>50</sub> =164,5	
	PP : propanolique polysaccharidique		EC <sub>50</sub> = 173,7	
	AP : acétonique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> = 27,20	
<b>Graines délipidées</b>	EP : éthanolique polysaccharidique	TPTZ	IC <sub>50</sub> =28,10	<b>Abbou et al. (2019)</b>
	PP : propanolique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> = 28,75	
	AP : acétonique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> =142,3	
	EP : éthanolique polysaccharidique	Peroxydation lipidique	IC <sub>50</sub> =39,51	
	PP : propanolique polysaccharidique		IC <sub>50</sub> =4,88	



# MATÉRIEL ET MÉTHODES



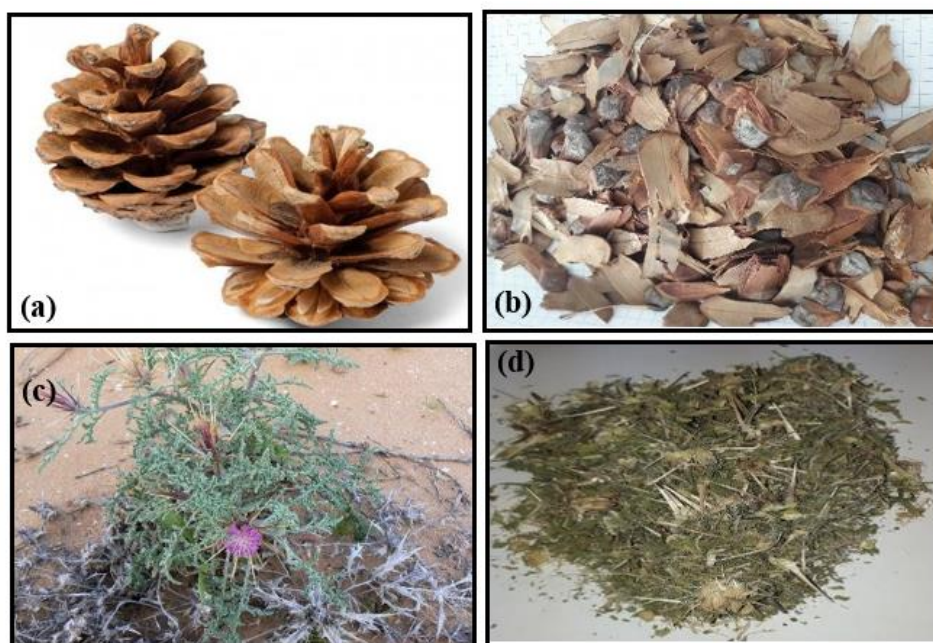
La partie expérimentale de la présente étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie au département de biologie, Faculté SNV-STU à l'université de Tlemcen. Le plan expérimental de cette étude s'est déroulé comme suit :

- Une étude phytochimique qui porte sur une préparation des extraits à partir de cônes de pin d'Alpe et la partie aérienne de *Centaurea pungens*, ainsi que le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux.
- Une étude biologique, qui porte sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante en utilisant le test du DPPH et du FRAP.

## 1. Matériel végétal

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à deux espèces végétales : *Pinus halepensis* et *Centaurea Pungens*. La partie utilisée de *Pinus halepensis* est les fruits appelés les cônes (**figure 15 a et b**) récoltés en mois de janvier 2020, dans la région de Lalla Setti, Wilaya de Tlemcen à l'ouest de l'Algérie. La partie aérienne de *Centaurea Pungens* a été récoltée, en mois de décembre 2019, dans la région d'Adrar au sud de l'Algérie (**Figure 15 c et d**). Les espèces ont été identifiées par Dr. Baba Ali Ibrahim, au laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen (Algérie).

Au laboratoire, à l'abri de lumière et à température ambiante, le matériel végétal récolté est séché puis finement broyer à l'aide d'un mortier. Le broyat récupéré et conserver à température ambiante jusqu'au jour d'utilisation.



<https://www.teline.fr/fr/photos/asteraceae/centaurea-pungens#photo-4>

**Figure 15:** Matériel végétal utilisé. (a) : cônes récoltés de *Pinus halepensis* ; (b) : cônes découpées ; (c) : *Centaurea Pungens* ; (d) : partie aérienne broyée de *C. Pungens*.

## 2. Extractions

La préparation des extraits a été réalisée par une décoction sous reflux pendant 30 min du matériel végétal, en utilisant un mélange hydro-organique (eau-méthanol ou eau-acétone). Le fractionnement des extraits bruts se fait par une extraction liquide /liquide en utilisant l'acétate d'éthyle et le n- butanol. **La figure 16** résume le protocole d'extraction des différents extraits des deux espèces.

### 2.1 Extrait brut eau-acétone de *Centaurea pungens*

L'extrait brut hydro-acétone (**E Ac**) a été préparé par une décoction sous reflux pendant 30 min de 100 g de la partie aérienne de *C. pungens*, dans 400 ml du solvant eau-acétone (30/70). Après extraction, la solution filtrée et centrifugée pendant 5 min à 3000 tours. L'évaporation à sec du surnageant permettra la récupération de l'extrait brut eau-acétone sous forme solide.

### 2.2 Extraits acétate d'éthyle et n-butanol de *Centaurea pungens*

Les fractions acétate d'éthyle (**F AcEt**) et n- butanol (**F n-BuOH**) de *C. pungens* sont obtenues par extraction liquide/liquide de l'extrait brut eau-acétone, préparé précédemment, en utilisant trois fois l'acétate d'éthyle (v/v). La phase aqueuse récupérée, est par la suite fractionnée trois fois avec du n-butanol (v/v). Après fractionnement, les phases organiques sont évaporées à sec et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol sont récupérées sous forme solide.

### 2.3 Extrait brut eau-méthanol et eau-acétone de *Pinus halepensis*

Dans un ballon rodé, 100 g de cônes découpés est mis à une décoction sous reflux pendant 30 min dans 300 ml du solvant d'extraction (20/80 ; v/v), eau-méthanol pour extrait brut eau-méthanol (**E MeOH**), et eau-acétone pour extrait brut eau-acétone (**E Ac**). Après extraction, le mélange est filtré puis centrifugé pendant 5 min à 3000 tours/min. La solution récupérée est évaporée à sec pour obtenir les extraits bruts, eau-méthanol et eau-acétone, respectivement.

### 2.4 Extraits acétate d'éthyle et n-butanol de *Pinus halepensis*

Les extraits acétate d'éthyle et n-butanol sont récupérés par fractionnement (liquide-liquide) des extraits bruts eau-méthanol et eau-acétone préparés précédemment. La phase aqueuse de l'extrait eau-acétone (30/70) ou de l'extrait eau-méthanol (20/80) est fractionnée par une extraction liquide/liquide dans une ampoule à décanter en utilisant en premier lieu l'acétate d'éthyle (volume/volume) trois fois. Après décantation, la phase aqueuse récupérée subit une deuxième extraction liquide-liquide par le n-butanol (trois fois). Les deux phases organiques



obtenues, acétate d'éthyle et n-butanol, ont été évaporée à sec pour obtenir les fractions acétate d'éthyle (**F AcEt**) et n-butanol (**F n-BuOH**) sous forme de produit solide.

A la fin de chaque extraction l'extrait sec récupéré est pesé pour calculer son rendement selon la formule ci-dessous, puis conservé à température ambiante et à l'abri de lumière jusqu'au jour de son utilisation.

$$\text{Rendement \%} = \frac{\mathbf{m}}{\mathbf{M}} \times 100$$

**m** = masse de l'extrait récupéré.

**M** = masse de la matière végétal.

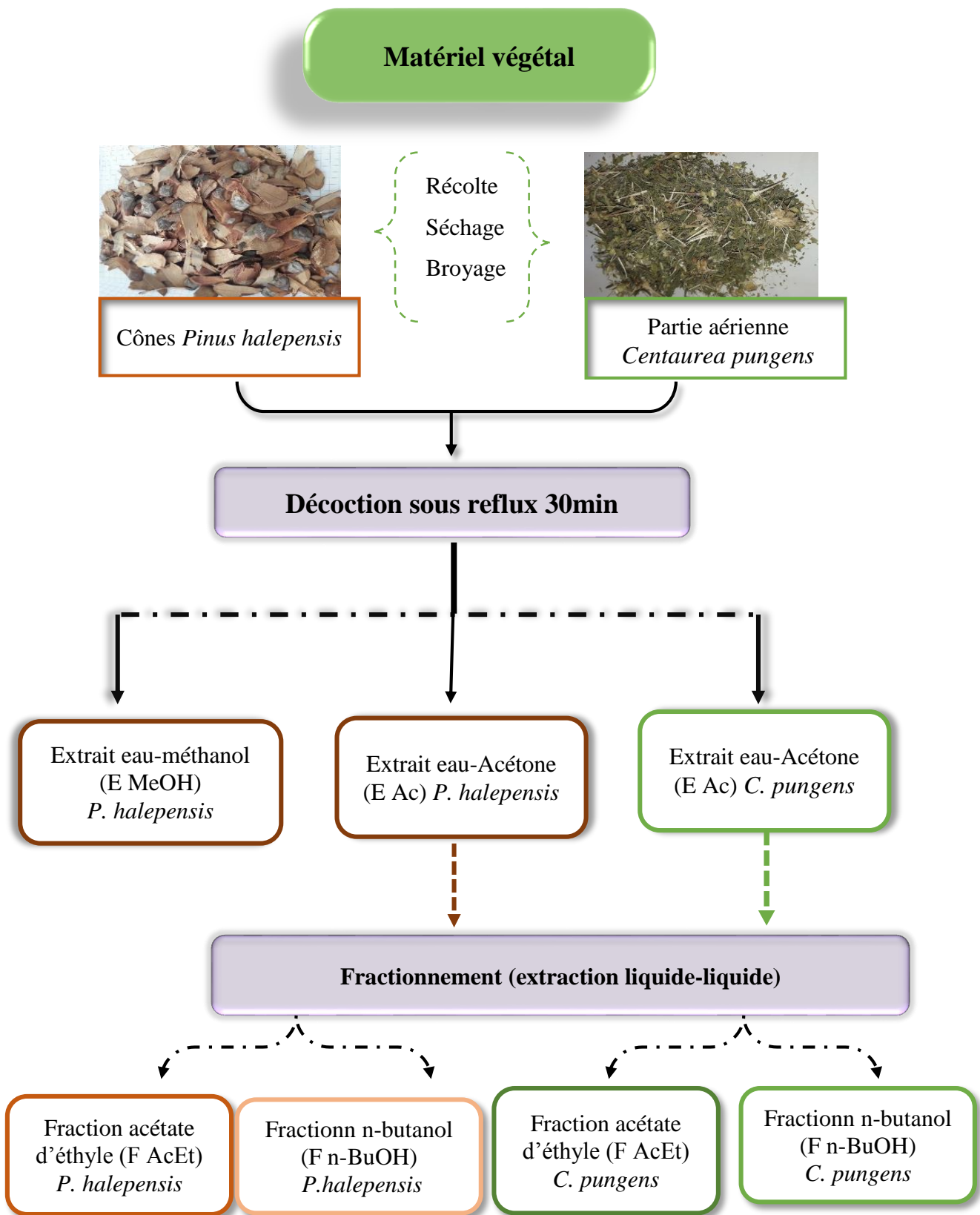


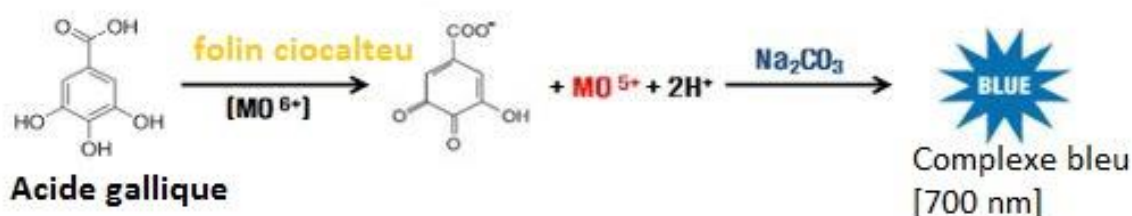
Figure 16: Organigramme explicatif de la préparation des extraits de *P.halepensis* et *C.pungens*.

### 3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de *Centaurea pungens* et de *Pinus halepensis*

#### 3.1 Dosages de polyphénols totaux

##### Principe

L'estimation de la teneur en polyphénols dans les différents extraits a été réalisée par la méthode de folin-ciocalteu. Ce dernier est un réactif de couleur jaune, constitué par un mélange de l'acide phosphotungstique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) et de l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), et qui est réduit en oxyde de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) lors de l'oxydation des polyphénols présents dans le milieu réactionnel basique. Ceci favorise l'apparition de la couleur bleue indicative du complexe formé par l'interaction entre le folin-ciocalteu et les groupements hydroxyles (OH) des polyphénols (**figure 17**). Cette coloration est proportionnelle à la teneur en polyphénols (**Bunzel et Schendel, 2017; Otto folin and Vintila ciocalteu., 1927**).



**Figure 17:** réaction explicatif de dosage des polyphénols par folin ciocalteu (Hu *et al.*, 2017)

##### Mode opératoire

**Le tableau 6** résume le mode opératoire du dosage de polyphénols cité ci-dessous (**Benariba *et al.*, 2013**):

- 100  $\mu$ l de chaque extrait préparé à une concentration de 1 mg/ml est déposé en triplicata au fond des tubes à hémolyse.
- 2 ml de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) fraîchement préparé à 2 % est ajouté dans chaque tube.
- Les tubes subissent une agitation pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex, puis une première incubation à température ambiante pendant 5 min.
- 100  $\mu$ l de réactif folin-ciocalteu 0,2 N préparé est ajouté au milieu réactionnel, cette étape nécessite l'obscurité car le réactif est rapidement oxydé en présence de lumière. Les tubes sont agités rapidement avant une deuxième incubation à température ambiante, et l'abri de lumière pendant 30 min.
- Après incubation on procède à la mesure de l'absorbance à 700 nm contre un tube blanc

contenant eau distillée, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et le folin-ciocalteu.

Selon le même mode opératoire nous avons utilisé une gamme étalon de l'acide gallique à différents concentrations (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/ml). Cette gamme étalon nous permettra de déterminer, la concentration de polyphénols totaux exprimée en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg E) et calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = \frac{a \cdot f}{C}$$

**a** : concentration finale des polyphénols déterminée à partir de la courbe d'étalon.

**f** : facteur de dilution (22).

**C** : concentration de l'extrait (1 mg/ml).

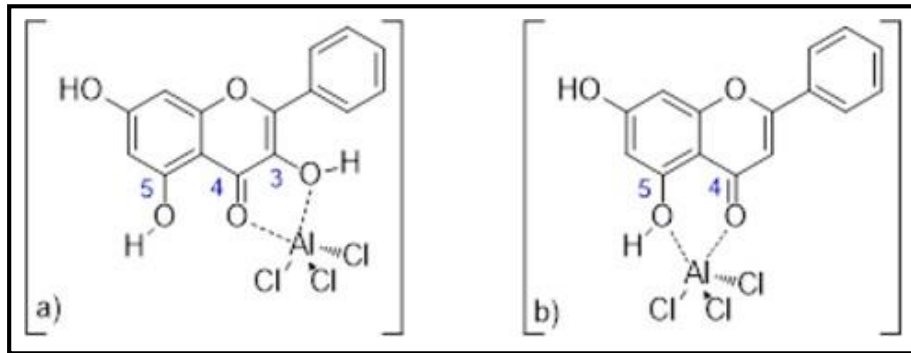
**Tableau 6:** Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux.

Concentration acide gallique (µg/ml)	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	Extrait	Blanc
Acide gallique (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
Extrait (ml)												0,1	
Eau distillée (ml)													0,1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>1<sup>ère</sup> incubation à température ambiante ; pendant 5min</b>													
Folin-ciocalteu (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>2<sup>ème</sup> incubation à température ambiante ; à l'obscurité ; pendant 30min</b>													
<b>Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 700 nm</b>													

### 3.2 Dosage de flavonoïdes totaux

#### Principe

La détermination du taux de flavonoïdes a été effectuée par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). Ce dernier en milieu alcalin réagit avec les atomes d'oxygène du groupement hydroxyle (OH) libre des flavonoïdes en entraînant la formation d'un complexe stable de couleur jaune (**figure 18**) (Magalhães *et al.*, 2012; Mammen et Daniel, 2012).



**Figure 18:** Complexe stable des flavonols (a) et flavone (b) avec  $\text{AlCl}_3$  (Boisard *et al.*, 2014)

### Mode opératoire

Le **tableau 7** résume le mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux cité ci-dessous (Benhammou, 2012) :

- 1000  $\mu\text{l}$  d'eau distillée est mélangée avec 250  $\mu\text{l}$  de chaque extrait, testés en triplicata.
- Dans chaque tube on ajoute 75  $\mu\text{l}$  de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15%.
- Après agitation et incubation des tubes pendant 6 min à température ambiante, 75  $\mu\text{l}$  chlorure d'aluminium préparer à 10 % est ajouté dans chaque tube.
- Une deuxième incubation de l'ensemble des tubes a été effectuée pendant 6 min à Température ambiante.
- Après incubation, 1000  $\mu\text{l}$  d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4 % est ajoutée avant d'ajuster le volume réactionnel à 2,5 ml.
- La mesure de l'absorbance a été effectuée à la spectrophotométrie à 510 nm après une troisième incubation pendant 15 min à l'abri de lumière.

La gamme étalon de catéchine a été préparée dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations croissantes (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/ml}$ ).

Les concentrations de flavonoïdes dans chaque échantillon est déterminée à partir de la courbe d'étalon de catéchine sont exprimées en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = \frac{a \cdot f}{C}$$

**a** : Concentration finale de flavonoïdes déterminée à partir de la courbe d'étalon.

**f** : Facteur de dilution (10).

**C** : Concentration de l'extrait (1 mg/ml).

**Tableau 7:** Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux.

Concentration catéchine (µg/ml)	2	5	10	20	50	100	200	300	400	500	Extrait	Blanc
Catéchine (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250		
Extrait (ml)											250	
Eau distillée (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NaNO <sub>2</sub> (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
<b>1<sup>ère</sup> incubation pendant 6 min à température ambiante</b>												
AlCl <sub>3</sub> (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
<b>2<sup>ème</sup> incubation pendant 6 min à température ambiante</b>												
NaOH (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Ajuster le volume total à 2500 µl</b>												
<b>3<sup>ème</sup> incubation à température ambiante pendant 15min</b>												
<b>Lecture au spectrophotomètre à 510nm</b>												

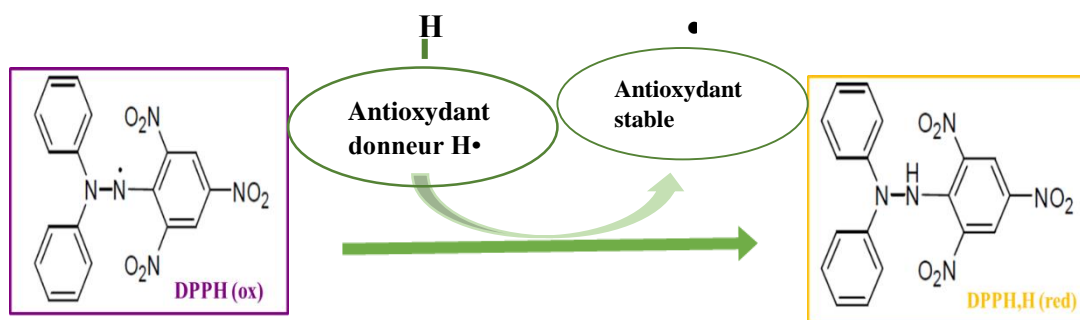
#### 4. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante des différents extraits préparés a été effectuée par des tests *in vitro* en utilisant le test du piégeage des radicaux libres sur le DPPH, et le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

##### 4.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

###### Principe

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits a été réalisée par le test antiradicalaire sur le DPPH, en mesurant la capacité des extraits à piéger les radicaux libres. Le DPPH• (2,2 diphényl- 1-picryl hydrazyl) est un radical libre et stable de couleur mauve. En présence d'un antioxydant, le DPPH• accepte un hydrogène et se transforme à sa forme réduite DPPH<sub>2</sub> (2,2 diphényle-1-picryl hydrazine) de couleur jaune résiduelle du groupement picryl (**figure 19**). Ce test est bien corrélé aux polyphénols totaux et la décoloration violette est proportionnelle à la capacité antioxydante (Nadal, 2009).



**Figure 19:** Réaction générale d'un antioxydant avec le radical DPPH.

### Mode opératoire

- 50 µl de chaque concentration, de chaque extrait, déposé en triplicata dans les tubes et sont mélangés avec 1950 µl de la solution du DPPH à 0,0025 %. La solution DPPH est remplacée par 1950 µl de méthanol dans les tubes blancs.
- Le tube du contrôle négatif est préparé par mélange de 50 µl de méthanol et 1950 µl de solution du DPPH. Son tube blanc contient uniquement 2 ml du méthanol.
- L'acide ascorbique préparé à différentes concentrations dans les mêmes conditions a été utilisé comme contrôle positif.
- Après incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesuré au spectrophotomètre à 700 nm. La moyenne de l'absorbance de chaque échantillon permettra le calcul du pourcentage de réduction selon la formule suivante :

$$\text{DPPH}\% = \frac{(\text{Acont} - \text{Aext})}{\text{Acont}} \times 100$$

**DPPH%** : Pourcentage de réduction du DPPH.

**A. contr** : Absorbance du témoin négatif.

**A. ext** : Absorbance de l'extrait.

La gamme d'acide ascorbique représente le contrôle positif est préparée à différentes concentrations (40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 µg/ml) (**Benariba et al., 2013**).

**Tableau 8:** Mesure de l'activité antiradicalaire des extraits par la méthode DPPH.

<b>Acide ascorbique (µg/ml)</b>	40	60	80	100	120	140	160	180	200	<b>Extrait</b>	<b>Control négatif</b>
<b>Acide ascorbique (µl)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
<b>les extraits (µl)</b>										50	
<b>Control négatif (µl)</b>											50
<b>DPPH (µl)</b>	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950
<b>Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</b>											
<b>Mesure de l'absorbance à 517 nm</b>											

#### 4.2 Test du pouvoir réducteur du Fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)

##### Principe

Le pouvoir réducteur du fer des différents extraits a été évalué par le test de ferricyanide de potassium. Ce test est basé sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ), ce qui produit le ferrocyanide de potassium. Selon la réaction de fenton, le  $Fe^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle ( $OH\bullet$ ) alors que en présence d'un antioxydant il se réduit en  $Fe^{2+}$  et empêche la formation de ce radical. Cette réaction est révélée par l'utilisation de  $FeCl_3$  qui forme avec le fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ) un complexe de couleur bleu-vert appelé le bleu de Prusse (Prussian blue) caractérisé par un maximum d'absorbance à 700 nm (Boubekeur, 2019).

##### Mode opératoire (tableau n°9) ;

- une aliquote de 100 µl de chaque extrait, préparé à différentes concentrations, déposée en triplicata au fond des tubes et mélangée avec 250 µl de PBS de (0,2N ; pH=6,6) et 250µl de  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.
- L'ensemble des tubes est incubé à 50°C pendant 20min.
- Après incubation, la réaction est arrêtée par l'addition de 250 µl de TCA (acide trichloracétique) à 10 % au mélange réactionnel. Puis ce dernier est centrifugé à 2000 tr/min pendant 10 min.
- 500 µl de chaque surnageant est dilué à un demi par addition de 500 µl de l'eau distillée. Ensuite 100 µl du révélateur chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1% est ajoutés dans les tubes. Directement



on procède à la mesure de la densité optique à 700 nm contre le tube blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait.

L'activité antioxydante par la méthode FRAP est exprimée par EC50 qui correspond à la concentration de l'extrait ayant présenté après réaction une absorbance de 0,5. Cette valeur est déterminée à partir de la courbe DO=f (concentration) (**Bourkhiss et al., 2010**).

Comme control positif le BHA (Butyl hydroxy Anisol) est préparé dans les mêmes conditions à différentes concentrations (20, 40, 60, 80, 100 ; 120, 140, 160, 180, 200µg/ml).

**Tableau 9:** Mesure du pouvoir réducteur du fer des extraits par la méthode du FRAP.

<b>Concentration BHA (µg/ml)</b>	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	<b>Extrait</b>	<b>Blanc</b>
<b>BHA (ml)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
<b>Extraits (ml)</b>											0,1	
<b>eau distillée (ml)</b>												0,1
<b>PBS (ml)</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (ml)</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>Incubation dans l'étuve pendant 20 min à 50°C</b>												
<b>TCA (ml)</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>Centrifugation des tubes pendant 10 min à 2000tour/min</b>												
<b>Surnageant (ml)</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Eau distillée (ml)</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>FeCl<sub>3</sub> (ml)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Mesure de l'absorbance à 700 nm</b>												



RÉSULTATS ET  
INTERPRÉTATIONS



## 1. Rendements des extraits de *Centaurea pungens*

Les extraits eau-acétone et ces fractions acétate d'éthyle et n-butanol sont obtenus par extraction de la partie aérienne de *C. pungens*. Les caractères physico-chimiques de chaque extrait ont été résumés dans le **tableau n°10**. Selon le tableau, l'extrait eau-acétone a donné un rendement élevé 6,09%, tandis que, les fractions n-butanol et acétate d'éthyle ont donnés des rendements plus faibles 1,21% et 0,94%, respectivement.

**Tableau 10** : Caractéristiques des extraits de *C. pungens*.

Extraits	Rendement(%)	Aspect/ couleur	Solubilité
<b>Eau-acétone</b>	6,01	Poudre marron foncée	Eau-méthanol
<b>Acétate d'éthyle</b>	0,94	Poudre marron	Eau distillée
<b>n-butanol</b>	1,21	Pâte verte	Eau-acétone

Les extraits eau-acétone et acétate d'éthyle sont récupérés sous forme d'une poudre de couleur marron foncée. Ils sont solubles dans les solvants eau-méthanol et eau-distillée, respectivement. Tandis que l'extrait n-butanol a été récupéré sous forme de pâte de couleur verte foncée soluble dans le mélange eau-acétone.

## 2. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Centaurea pungens*

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les différents extraits de *C.pungens* a été déterminée par méthode spectrophotométrique en utilisant le Folin ciocalteu pour les polyphénols, et le chlorure d'aluminium pour les flavonoïdes. Les absorbances de l'acide gallique et de la catéchine ont utilisés comme courbes étalons sont représentés dans les **figures 20 et 21**, respectivement.

Les résultats obtenus concernant le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans les différents extraits, exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique/mg d'extrait ( $\mu\text{g E AG/mg E}$ ) et en  $\mu\text{g}$  équivalent catéchine/mg d'extrait ( $\mu\text{g EC/mg E}$ ), sont représentés dans le **tableau 11**.

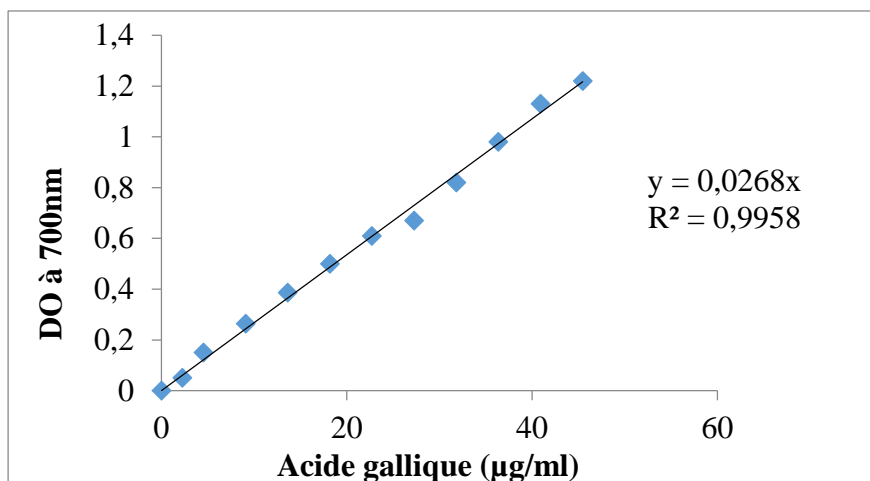


Figure 20: Courbe étalon de l'acide gallique.

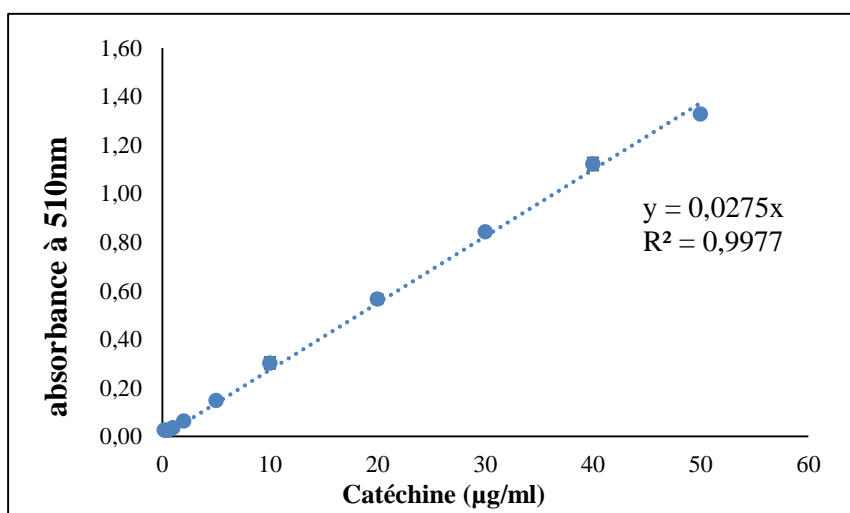


Figure 21: Courbe étalon de la catéchine.

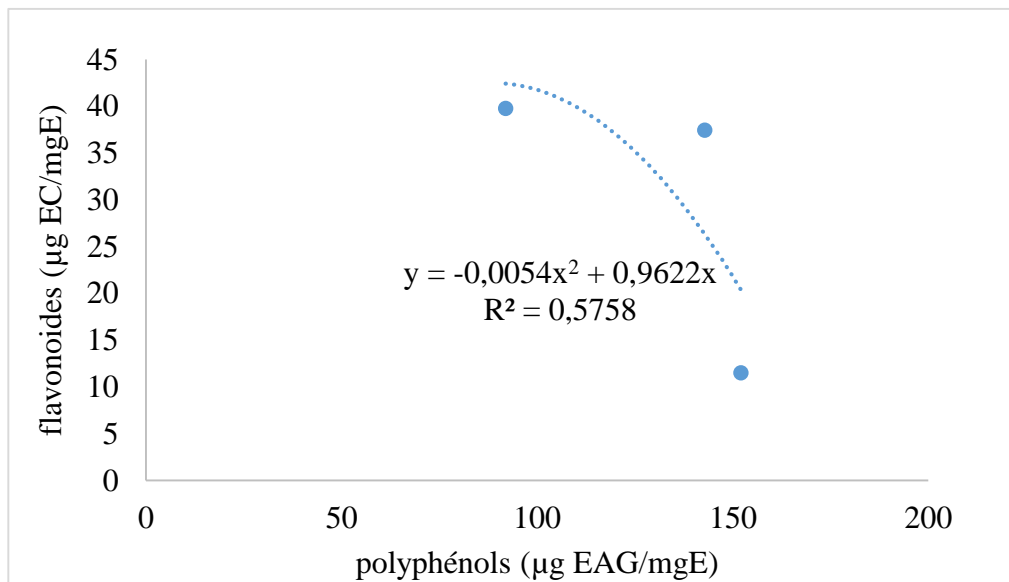
Les résultats représentés dans le **tableau 11**, révèlent des teneurs élevées en polyphénols dans les différents extraits de *C. pungens* variant entre 91,94 et 152,13 µg EAG/mgE. L'extrait eau-acétone renferme le taux le plus élevé en polyphénols mais le plus faible en flavonoïdes (11,51 µg EC/mg E), suivi par l'extrait n-butanol et acétate d'éthyle. Ces deux derniers présentent des teneurs comparables en flavonoïdes (plus de 37 µg EC/mg E).

Selon les résultats obtenus on note la richesse des extraits testés de *C. pungens* en polyphénols, tandis que la teneur en flavonoïdes est moyennement faible, ne dépasse pas 40 µg EC/mg E, ce qui explique que les flavonoïdes ne constituent pas une classe majoritaire de polyphénols dans cette plante contrairement à *P. halepensis*, deuxième espèce étudiée dans ce travail.

**Tableau 11:** Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *C. pungens*.

	<b>Polyphénols (<math>\mu\text{g EAG/mg}</math>)</b>	<b>Flavonoïdes (<math>\mu\text{g EC/mg E}</math>)</b>
<b>Eau-acétone</b>	152,13 $\pm$ 0,07	11,51 $\pm$ 0,006
<b>Acétate éthyle</b>	91,94 $\pm$ 0,03	39,76 $\pm$ 0,091
<b>n-butanol</b>	142,83 $\pm$ 0,01	37,45 $\pm$ 0,002

On remarque que la teneur en flavonoïdes est non relative au taux de polyphénols dans chaque extrait. La **figure 22** a révélé une faible corrélation entre le taux de polyphénol et de flavonoïdes ( $R^2=0,575$ ). Ce qui explique que dans la fraction des polyphénols, les flavonoïdes ne représentent pas le constituant majeur.



**Figure 22:** Corrélation entre le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits de *C. pungens*.

### 3. Rendement des extraits de *Pinus halepensis*

Après plusieurs étapes d'extraction des cônes de *Pinus halepensis* nous avons récupéré quatre extraits : eau-méthanol, eau-acétone, les fractions acétate d'éthyle et n-butanol récupérés à partir de l'extrait eau-acétone. Le **tableau 12** résume l'aspect physicochimique de chaque extrait.

Les différents extraits récupérés ont présenté des rendements variables. L'extrait eau-méthanol a donné le rendement le plus élevé 3,38 %, suivi par l'extrait eau-acétone, n-butanol et acétate d'éthyle avec des rendements de 2,38 ; 1,66 et 0,13 %, respectivement.

**Tableau 12:** Caractéristiques des extraits des cônes de *P.halepensis*.

Extrait	Rendement(%)	Aspect/ couleur	Solubilité
Eau-méthanol	3,38	Poudre cristallisée marron	Eau-méthanol
Eau -acétone	2,38	Poudre cristallisée marron	Eau-méthanol
Acétate d'éthyle	1,66	Pâte hygroscopique Marron/rouge	Eau-acétone
n-butanol	0,13	Poudre Marron claire	Eau-méthanol

La couleur des extraits varie entre le marron claire et le marron foncé avec un aspect cristallisé. Les extraits eau-méthanol, eau-acétone et n-butanol récupérés sous forme de poudre sont solubles dans le mélange eau-méthanol, à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle récupéré sous forme de pâte hygroscopique soluble dans eau-acétone.

#### 4. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Pinus halepensis*

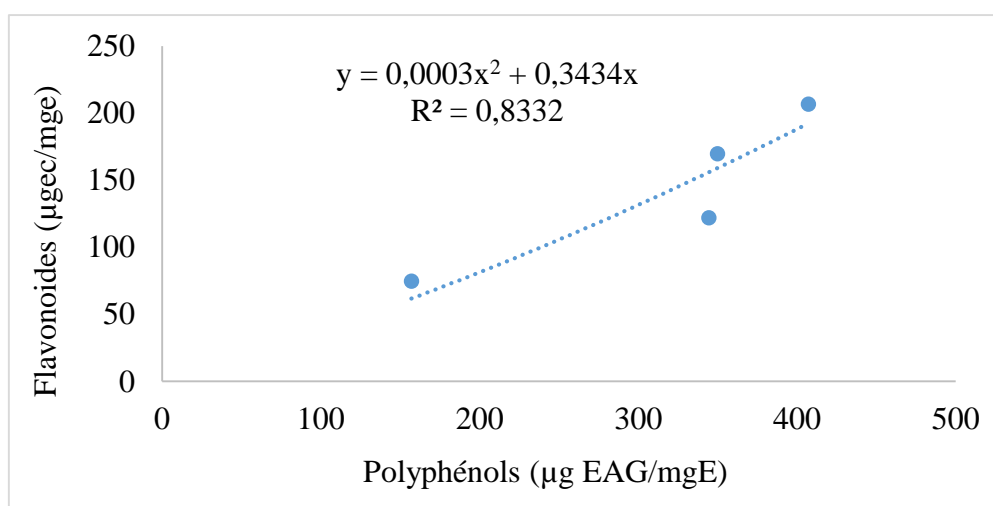
Les polyphénols et les flavonoïdes totaux dans les extraits de *P. halepensis* ont été déterminés à partir des équations de la régression linéaire des courbes étalons de l'acide gallique et de la catéchine **figure 22** et **23**. Les résultats sont exprimés en ( $\mu\text{g EAG/mg E}$ ) et en ( $\mu\text{g EC/ mgE}$ ) des polyphénols et flavonoïdes, respectivement (**tableau 13**).

Dans le **tableau 13** on remarque des taux élevés en polyphénols dans la majorité des extraits, variant entre 157,06 et 407,16  $\mu\text{g EAG/mg}$ . De même, le taux de flavonoïdes est important, et il varie entre 74,91 et 206,79  $\mu\text{g EC/mg E}$ . L'extrait n-butanol présente la teneur la plus élevée en polyphénols (407,16  $\mu\text{g E AG/mg E}$ ) et en flavonoïdes (206,79  $\mu\text{g EC/mg E}$ ) par rapport aux autres extraits. Les extraits eau-méthanol et eau-acétone présentent des taux comparables en polyphénols 344,502 et 349,975  $\mu\text{g E AG/mg E}$ , respectivement. Alors que l'extrait acétate d'éthyle renferme la teneur la plus faible en polyphénols 157,06  $\mu\text{g E AG/mg E}$  et en flavonoïdes 206,79  $\mu\text{g EC/mgE}$ .

**Tableau 13:** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de *P.halepensis*.

Extrait	Polyphénols (µg EAG/mgE)	Flavonoïdes (µg EC/mgE)
Eau-méthanol	344,50 ±0,01	122,06 ±0,003
Eau-acétone	349,97 ±0,03	169,82 ±0,015
Acétate éthyle	157,06 ±0,01	74,91 ±0,001
n-butanol	407,15 ±0,02	206,79 ±0,003

On remarque que la teneur en flavonoïdes est relative au taux de polyphénols dans chaque extrait. La **figure 23** a révélé une forte corrélation entre le taux de polyphénol et de flavonoïdes ( $R^2=0,833$ ). Ce qui explique que dans la fraction des polyphénols, les flavonoïdes représentent le constituant majeur.



**Figure 23:** Corrélation entre le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits des cônes de *P. halepensis*.

### 5. Analyse comparative des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les extraits de *P. halepensis* récolté dans la région de Tlemcen

Au cours de notre étude nous avons réalisé une analyse comparative sur les travaux antérieurs concernant le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les différents extraits de *Pinus halepensis*, récoltés dans la région de Tlemcen. Le **tableau n°14** résume ces différents travaux réalisés au département de biologie à l’université de Tlemcen. Il s’agit des travaux des étudiants du master réalisés, au laboratoire Antibiotique, Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et activité Biologique, par Benaziza Asma (2017) et Bentrar Faiza (2018).

Dans ce tableau, et comparativement à nos résultats on remarque que les résultats des travaux antérieurs ont révélé un taux de flavonoïdes relatif à celui de polyphénols. Nous avons également constaté que dans ces extraits, la fraction des flavonoïdes représentent les composants majeurs des polyphénols pour *P. halepensis*. Il est à noter que les extraits des cônes renferment des teneurs supérieures à celle des feuilles. De ce fait, les cônes sont plus riches en composés phénoliques par rapport aux feuilles. Nous avons également constaté que nos extraits de cônes présentent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes comparables aux résultats obtenus dans les travaux antérieurs.

**Tableau 14:** Comparaison des résultats des travaux antérieurs sur le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *P. halepensis* récoltés dans la région de Tlemcen.

Parties utilisées	Extraits	Polyphénols (µg EAG/mgE)			Flavonoïdes (µg EC/mgE)		
		Benaziza A. (2017)	Bentrar F. (2018)	Présente étude	Benaziza A. (2017)	Bentrar F. (2018)	Présente étude
Cônes	Aqueux	651,8	538,32	/	280,2	137,21	/
	Eau-méthanol (30/70)	/	501,38	344,50	/	171,08	122,061
	Eau-acétone (20/80)	503,84	/	349,97	155,56	/	169,818
	<b>Fractions de l'extrait aqueux</b>						
	Acétate d'éthyle	486,99	/	/	205,11	/	/
	n-butanol	446,26	/	/	140,56	/	/
	<b>Fractions de l'extrait eau-acétone</b>						
	Acétate d'éthyle	/	550,43	157,06	/	162,22	74,909
	n-butanol	/	55,61	407,16	/	168,11	206,78
	Feuilles	Aqueux	284,27	/	/	88,33	/
Eau-acétone (20/80)		143,64	/	/	45,33	/	/
Acétate d'éthyle		282,5	/	/	98,66	/	/
n-butanol		141,06	/	/	60,92	/	/



## 6. Activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis*

### 6.1 Effet de l'extrait eau-méthanol sur le piégeage du radical libre DPPH

Les résultats de la capacité antiradicalaire de vitamine C et l'extrait eau-méthanol des cônes de *P. halepensis* sur DPPH sont représentés dans les **tableaux 15 et 16**, respectivement.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition et IC<sub>50</sub>. On remarque que l'acide ascorbique présente un effet antioxydant sur le DPPH à faible concentration, 4,5µg/ml assure l'inhibition de 66,67% du DPPH avec une valeur IC<sub>50</sub> de 3,73µg/ml.

**Tableau 15:** Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en pourcentage.

Acide ascorbique (µg/ml)	1	1,5	2	3	3,5	4	4,5	IC <sub>50</sub>
Inhibition DPPH %	7 ±0,002	9 ±0,02	21,89 ±0,01	21,47 ±0,01	30,98 ±0,009	61,77 ±0,02	66,67 ±0,04	<b>3,73</b>

Dans le **tableau n°16**, l'extrait au-méthanol présente un effet inhibiteur du radicale DPPH avec des pourcentages de réduction de DPPH qui augmentent proportionnellement aux concentrations de l'extrait. Le pourcentage le plus élevés 23,14 % est marqué avec une concentration de 250 (µg/ml). La valeur d'IC<sub>50</sub> est de l'ordre de 13,13 (µg/ml).

**Tableau 16:** Effet de l'extrait eau-méthanol de *P.halepensis* sur la réduction de DPPH exprimé en pourcentage.

Extrait eau- méthanol (µg/ml)	0,31	0,63	1,25	2,5	5	6,25	IC <sub>50</sub>
Inhibition DPPH %	1,80 ±0,01	2,74 ±0,006	3,74 ±0,02	11,93 ±0,02	19,31 ±0,005	23,14 ±0,006	<b>13,13</b>

### 6.2 Effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction du fer FRAP

Le Butyl Hydroxy Anisol (BHA) est utilisé comme contrôle positif dans la détermination du pouvoir réducteur du fer par l'extrait eau-méthanol de *P. halepensis* (**tableau 17**).

**Tableau 17:** Effet BHA sur la réduction du fer (test du FRAP).

BHA (µg/ml)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Abs (700nm)	0,091	0,150	0,214	0,402	0,537	0,615	0,721	0,806	0,951	1,060
	±0,05	±0,06	±0,06	±0,04	±0,03	±0,03	±0,04	±0,02	±0,03	±0,09

Les résultats mentionnés dans le **tableau 18** correspondent aux absorbances de l'effet de l'extrait eau-méthanol des cônes de *P.halepensis* sur la réduction du fer (FRAP).

Les valeurs d'absorbances indiquent une activité réductrice du fer moyenne pour l'extrait eau-méthanol. La valeur d'EC50 déterminée est de l'ordre de 783,39 µg/ml.

**Tableau 18:** Absorbances de l'effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction de fer (FRAP).

Extrait eau-méthanol (µg/ml)	6,25	12,5	25	50	100	200	EC <sub>50</sub>
Abs (700nm)	0,005	0,028	0,046	0,043	0,061	0,136	<b>783,39</b>
	±0,003	±0,02	±0,01	±0,009	±0,009	±0,007	

L'extrait eau-méthanol des cônes de *P.halepensis* testé dans la présente étude, montre une activité antiradicalaire sur DPPH plus importante par rapport au pouvoir réducteur du fer.

## 7. Analyse comparative de l'activité antioxydante des extraits de *P. halepensis* récolté dans la région de Tlemcen

Dans cette partie de notre travail, on s'intéresse à une analyse comparative de nos résultats avec les travaux antérieurs, réalisés par **Benaziz A. (2017)** et **Bentrar F. (2018)**, sur l'activité antioxydante des extraits des cônes et des feuilles de *Pinus halepensis*, récolté dans la région Tlemcen.

Le **tableau 18** résume les valeurs de IC<sub>50</sub> de l'activité antioxydante évaluée par le test de piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur du fer et le test du blanchiment de β-carotène.

L'extrait eau-méthanol des cônes de la présente étude a marqué un effet inhibiteur du DPPH et réducteur du fer, avec des IC<sub>50</sub> de 13,13 %g/ml et 783,39 %g/ml, respectivement. Ces résultats sont supérieurs aux celles déterminé par **Benaziza, (2017)** pour le même extraits, mais inférieurs ou proche aux IC<sub>50</sub> des extraits déterminés par **Bentrar, (2018)**.

D'après cette analyse comparative, nous avons constaté que les différents extraits des cônes présentent une activité antioxydante plus forte que celle des feuilles. De même, ils présentent un effet antiradicalaire (DPPH) plus élevé par rapport à l'effet réducteur du fer (FRAP) et inhibiteur de peroxydation lipidique (test de  $\beta$ -carotène).

**Tableau 19:** Comparaison des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis*.

Parties utilisées Extraits	IC <sub>50</sub> DPPH (µg/ml)			
	Benaziza (2017)		Bentrar (2018)	Présente étude
	Feuilles	Cônes	Cônes	Cônes
Aqueux	210,68	7,3	11,81	/
Eau-méthanol (30/70)	/	/	7,45	13,13
Eau-acétone (20/80)	242,2	58,78	/	/
Acétate d'éthyle	218,8	26,85	8,5	/
n-butanol	246,5	29,61	12,3	/
	IC <sub>50</sub> FRAP (µg/ml)			
Aqueux	814 ,14	142,39	138	/
Eau-méthanol	/	/	106	783,39
Eau-acétone	841,7	767,17	/	/
Acétate d'éthyle	205,4	435,2	135	/
n-butanol	921,7	165,29	201,88	/
	IC <sub>50</sub> β-carotène (µg/ml)			
Aqueux	987,2	420	286,42	/
Eau-méthanol (30/70)	/	/	320,64	/
Eau-acétone (20/80)	1028	255,8	/	/
Acétate d'éthyle	597,4	310,7	212,59	/
n-butanol	871	301,9	457,49	/



# DISCUSSION



Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives à effet antioxydant isolés des plantes, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique des extraits des cônes de *Pinus halepensis* (famille des pinacées) et *Centaurea pungens* (famille des astéracées), récoltées dans la région de Tlemcen et d'Adrar, respectivement ; ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante en utilisant le test du DPPH et du FRAP. Dans le cas de *P. halepensis* nous avons effectué une analyse comparative entre nos résultats et ceux des travaux antérieurs sur l'activité antioxydante.

La décoction sous reflux de la partie aérienne de *C. pungens*, nous a permis de récupérer des extraits avec des rendements variables entre 0,94 et 6,01%. Les rendements des extraits de *P. halepensis* ont été importants, par rapport aux extraits de *C. pungens*, notamment l'extrait eau-méthanol 3,38% suivi par l'extrait eau-acétone, n-butanol et acétate d'éthyle avec des rendements qui varient entre 0,13 et 2,38%. Ces rendements sont plus au moins supérieurs aux rendements récupérés par **Benaziza, (2017) et Bentrar, (2018)**. La variation des rendements peut être liée à la diversité structurale des composés chimiques que contient la plante, ainsi que la méthode et le nombre d'extractions effectués, le temps et la température, et les caractères physico-chimiques du solvant et des substances extraites (**Abe et al., 2010 ; Koffi et al. 2010; Mahmoudi Souhila et al., 2012**).

Les dosages phytochimiques des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *C. pungens*, ont révélé la richesse de cette plante en polyphénols (91,94 à 152,12 µg EAG/ mg E). Les flavonoïdes varient entre 11,515 et 39,75 µg EC/mg E. L'extrait eau-acétone contient la teneur la plus élevée en polyphénols, et la teneur faible en flavonoïdes. La variation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux peut être attribuée à la solubilité de ces molécules dans les solvants d'extraction ; de plus leur degré de polymérisation et leur interaction avec autres composés leur permettent de former des complexes insolubles ce qui diminue leur taux dans les extraits récupérés (**Seidel, 2012**).

Nos résultats des dosages sont similaires aux résultats obtenus au cours des études réalisées sur des espèces du genre centaurée. *C. sphaerocephala* renferme un taux de 357µg EAG/ mg E et 283,2 µg EC/mg E de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extraits acétate d'éthyle ; l'extrait n-butanol contient 202,5µg EAG/ mg E et 273,8µg EC/mg E de polyphénols et de flavonoïdes, respectivement. Ces résultats sont supérieurs aux celles de *C. pungens* (**Lahneche et al., 2019**). En outre, les teneurs en polyphénols dans les extraits de *C. pungens* sont plus élevées par rapport aux extraits aqueux et méthanol de *C. calitrapa* (37,66µg EAG/ mg E et 37,59 µg EC/mg E), *C. spicata* (32,99µg EAG/ mg E et 17,24µg EC/mg E), respectivement (**Erol-Dayi et al., 2011**). **Nejad Ebrahimi et al., (2008)** ont démontré que les teneurs en composés phénoliques et en métabolites

secondaires, varient quantitativement d'une plante à une autre, Ce qui peut être lié principalement aux facteurs écologiques et environnementaux.

Peu de travaux scientifiques ont été réalisés sur l'activité antioxydante de *c. pungens*. **Hamdi I. et Belkacem F. (2017)** ont révélé une faible activité antiradicalaire sur le DPPH de l'extrait aqueux et méthanolique, avec des valeurs de IC<sub>50</sub> élevées, variant entre 1637,86 et 1196,46 µg/ml, respectivement. Plusieurs études ont relié l'activité antioxydante des extraits de plantes à leurs teneurs en polyphénols, et à la structure de ces composés notamment la structure des flavonoïdes. Les groupement hydroxyles des composés phénoliques joue un rôle indispensable dans la neutralisation des radicaux libres (**Amić *et al.*, 2003; Khelef, 2019**).

Le dosage spectrophotométrique de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits de *P. halepensis* ont montré la richesse de cette plante en ces composés. La fraction n-butanol a marqué une forte teneur en polyphénols 407,16 µg EAG/mgE et flavonoïdes 206,79 µg EC/mgE par rapport aux extrait eau-méthanol, eau-acétone et la fraction acétate d'éthyle, qui ont notés de faibles teneurs 157,06 µg EAG/mgE et 74,91 µg EC/mgE. Les teneurs élevées en flavonoïdes indiquent que ces molécules sont les constituants majeurs dans la classe des polyphénols extraits à partir des cônes de *P. halepensis*. Les variations marquées entre les extraits testés reposent sur les caractéristiques du solvant extracteur tel que le volume, miscibilité et la polarité ; le méthanol, acétone, acétate d'éthyle et le n-butanol permettent une extraction sélective des polyphénols et de flavonoïdes. En outre, la miscibilité entre l'eau et le méthanol ainsi que leur polarité proche permet la formation d'un mélange qui aboutit à un enrichissement de l'extrait en polyphénols (**Bourgou *et al.*, 2016**). Aussi, la diversité structurale des composés phénoliques est responsable de la variabilité des propriétés physico-chimiques qui influencent sur les paramètres d'extraction comme le coefficient de partage (**Mahmoudi *et al.*, 2012**).

Les extraits de cônes entiers (non découpés) comprennent un taux moyennement important en polyphénols 51,92 mg/g de poids sec de la plante, et en flavonoïdes 3,26 mg/g de poids sec de la plante, tandis que l'extrait méthanol des graines renferme de très faibles valeurs 0,72 et 0,35 mg/g de poids sec de la plante, respectivement (**Dhibi *et al.*, 2012**). Les extraits aqueux et éthanolique de l'écorce sont riches en polyphénols (401,85 et 423,51 mg EAG/g E) et en flavonoïdes (738,97 et 865,40 mg ER/g E) (**Salhi, 2020**). Ces résultats sont comparables à ceux démontrés par **Houairi S. (2019)**.

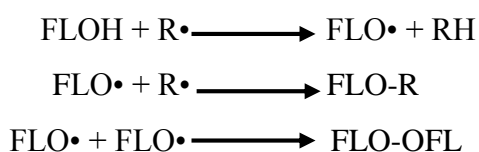
Il ressort à travers l'étude comparative des travaux antérieurs, que les extraits de *P. halepensis* récolté dans la région de Tlemcen sont riches en polyphénols et en flavonoïdes (**Benaziza A. 2017 ;**

**Bentrar F., 2018, et la présente étude**) par rapport aux résultats obtenus dans la région de Monastir-Tunisie (**Dhibi et al., 2012**). Ces différences peuvent être expliquées par la période de récolte, les cônes utilisés, leur stade de maturation, et le facteur climatique et écologique (sol, humidité, sécheresse, altitude) qui peuvent influencer la composition chimique de la plante.

L'activité antioxydante de l'extrait eau-méthanol des cônes de *P. halepensis* a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et le test de réduction du fer (FRAP). Il a été obtenu des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de 13,13 et 783,39 µg/ml pour la méthode du DPPH et du FRAP, respectivement. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'extrait sont plus élevées par rapport à l'IC<sub>50</sub> des contrôles, l'acide ascorbique et le BHA, dont leurs valeurs sont 3,73 et 96,15 µg/ml, respectivement. L'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la valeur de IC<sub>50</sub>, plus la valeur est faible plus le pouvoir antioxydant de l'extrait est important. De ce fait, on peut conclure que l'extrait eau-méthanol présente une activité antioxydante importante. D'autre part, l'extrait eau-méthanol dans la présente étude a montré des propriétés antioxydantes sur le DPPH et le FRAP comparables à celles obtenus par **Benaziza A. (2017)** et qui restent faibles à celles déterminées dans l'extrait eau-méthanol par **Bentrar F. (2018)**.

Les travaux antérieurs réalisés par **Benaziza A. (2017) et Bentrar F. (2018)** ont révélé dans les différents extraits de *Pinus halepensis* des valeurs d'IC<sub>50</sub> très importantes, avec un effet remarquable des cônes par rapport aux feuilles. Ils ont également démontré un effet antiradicalaire sur le DPPH plus intéressant par rapport à l'effet réducteur du fer (FRAP) et inhibiteur de la peroxydation lipidique (β-carotène). Ces résultats sont relativement comparables avec les résultats déterminés par **Abbou et al., (2019) et Amari, (2017)**. Ces auteurs présumant une forte capacité antioxydante des différents extraits de *Pinus halepensis* attribuée à leurs richesses en polyphénols notamment en flavonoïdes.

La capacité antioxydante des polyphénols est distribuée de leur structure chimique et à la configuration des groupements hydroxyle sur les cycles (**Adida et al., 2016**). **Amić et al., (2003)** a expliqué la capacité antioxydante des flavonoïdes (FLOH) par la capacité de réduire les radicaux libres par transfert d'hydrogène de la fonction hydroxyle. Il se produit suite à cette réaction des molécules stables (RH) et des radicaux flavoxyle (FLO•) qui se transforment en composés non réactifs et subissent des changements structuraux sur le noyau aromatique ou en interagissant entre eux selon différentes réactions ;





D'autre part, le caractère acide de la fonction phénol et la possibilité d'établir les liaisons hydrogènes favorisent l'activité antioxydante des composés phénoliques, qui permettent de prévenir la formation des radicaux libres catalysés par un métal tel que le fer selon la réaction de Fenton (**Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Nijveldt *et al.*, 2001**).

A l'issue des résultats obtenus, les analyses phytochimiques des extraits analysés, ont démontré la richesse *P. halepensis* en composés phénoliques, et son pouvoir antioxydant remarquable par rapport aux extraits de *C. pungens*.



# CONCLUSION



Dans le concept de la recherche de nouveaux composés naturels biologiquement actifs en vue d'une application thérapeutique, nous nous sommes intéressés à la recherche de l'effet antioxydant des extraits de cônes de *Pinus halepensis* et de la partie aérienne de *Centaurea pungens*.

Les principaux résultats ont démontré la richesse de *P. halepensis* en composés phénoliques, et un pouvoir antioxydant important sur le FRAP et le DPPH par rapport aux extraits de *C. pungens*, qui sont moyennement riches en composés phénoliques. Ces composés, grâce à leur structure chimique confèrent aux extraits de plantes diverses propriétés biologiques.

En perspectives, ces résultats préliminaires nécessitent d'éventuelles études complémentaires qui s'intéressent à :

- ✓ L'analyse phytochimique afin d'isoler et identifier les composés chimiques que contiennent ces deux espèces *C. pungens* et *P. halepensis*
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes *in vitro* tels que : ORAC (*oxygen Radical Absorbance Activity*), ABTS (Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), et par des méthodes *in vivo* en mesurant l'activité des enzymes antioxydantes.
- ✓ La recherche d'autres activités biologiques comme l'activité antidiabétique, antibactérienne et antifongique.



RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES



- 1) **Abbou, A., Kadri, N., Debbache, N., Dairi, S., Remini, H., Dahmoune, F., Berkani, F., Adel, K., Belbahi, A., & Madani, K. (2019).** Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 663-670.
- 2) **Abe, E., Delye, S. G., & Alvarez, J. C. (2010).** Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 22, No. 2, pp. 51-59). EDP Sciences.
- 3) **Adekenov, S. M. (2017).** Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. *Fitoterapia*, *121*, 16-30.
- 4) **Adida, H., Benariba, N., Bechiri, A., Chekroun, E., & Djaziri, R. (2016).** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*, *14*(4), 207-212.
- 5) **Al-Bazaz, H. K., Al-jubori, I. S., Eldalawy, R., & Nasser, N. M. (2018).** Antimicrobial and Antioxidant Activity *Pinus halepensis* Miller. Cone Extract which grown in Iraq. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *11*(11), 4977-4980.
- 6) **Amari, M. (2017).** Contribution à l'étude des activités biologiques de la résine de *Pinus halepensis* Mill.
- 7) **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, *76*(1), 55-61.
- 8) **Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouni, H. A. (2017).** Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie*, 1-7.
- 9) **Azzouzi, D., & Mekkiou, R.** *Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre Centaurea (Asteraceae)* (Doctoral dissertation).
- 10) **Baraka-Vidot, J. (2014).** *Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion – Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée* (Doctoral dissertation).
- 11) **Beaudeau, J. L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., & Legrand, A. (2006, November).** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 373-381). Elsevier Masson.

- 12) Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., & Sener, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35-40.
- 13) Benaziza, A. (2017). *Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de feuilles et de cônes de Pinus halepensis (Pin d'Alep)* (mémoire de master, université de Tlemcen). 77.
- 14) Benhammou, N. (2012). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien* (Doctoral dissertation).
- 15) Bentrar, F. (2018). *Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice et l'alpha des extraits de cônes de pinus halepensis (pin d'Alep)* (mémoire de master, université de Tlemcen).
- 16) Benzitoune, N. E. I., & Boutouil, D. (2018). Mise en évidence de quelques activités biologiques d'un extrait polyphénolique des graines de *Pinus halepensis*.
- 17) Bernard, P. (2013). *Le pin d'Alep en France: 17 fiches pour connaître et gérer*. Editions Quae.
- 18) Boisard, S. (2014). *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
- 19) Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J. L., Therond, P., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J. (2004, May). Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. In *Annales pharmaceutiques francaises* (Vol. 62, No. 3, pp. 147-157).
- 20) Booth, G. (2009, 13 février). *Centaurea pungens* ? Biodiversidad Virtual Plantas. <https://www.biodiversidadvirtual.org/herbarium/Centaurea-pungens-img6620.html>
- 21) Boubekour, H. (2019). *Activités biologiques d'Helichrysum stoechas* (Doctoral dissertation).
- 22) Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- 23) Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège*.
- 24) Bouyahya, A., Assemian, I. C. C., Mouzount, H., Bourais, I., Et-Touys, A., Fellah, H., ... & Bakri, Y. (2019). Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs?. *Industrial Crops and Products*, 128, 62-69.

- 25) Bouyahya, A., Belmehdi, O., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(3), 117.
- 26) Bruno, M., Bancheva, S., Rosselli, S., & Maggio, A. (2013). Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, <sup>13</sup>C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry*, 95, 19-93.
- 27) Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M. C., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *médecine/sciences*, 22(1), 47-53.
- 28) Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, 12(5), 407-415.
- 29) Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- 30) Clérvet, A., Alami, I., Breton, F., Garcia, D., & Sanier, C. (1996). Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta botanica gallica*, 143(6), 531-538.
- 31) Couaillet, L. (2015). Le stress oxydant au cours du diabète de type 2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique.
- 32) Dhibi, M., Mechri, B., Brahmi, F., Skhiri, F., Alsaif, M. A., & Hammami, M. (2012). Fatty acid profiles, antioxidant compounds and antiradical properties of *Pinus halepensis* Mill. cones and seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1702-1708.
- 33) Dob, T., Berramdane, T., & Chelgoum, C. (2005). Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie*, 8(11-12), 1939-1945.
- 34) Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- 35) Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- 36) Ehrhart, A. S. (2011). *La phytothérapie : se soigner par les plantes*. Editions Eyrolles.
- 37) Erol-Dayi, Ö., Pekmez, M., Bona, M., Aras-Perk, A., & Arda, N. (2011). Total phenolic contents, antioxidant activities cytotoxicity of three *Centaurea* species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptoisimopappa* *C. spicata*. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(2), 31-36.

- 38) Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- 39) Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.
- 40) Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., ... & Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease*, 4(2), 97-103.
- 41) Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650.
- 42) Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Doctoral dissertation).
- 43) Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- 44) Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R., ... & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 119(5), e39-e75.
- 45) Guemiri, H., & Karouche, I. (2017). *Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de deux plantes médicinales locales: Pinus halepensis Mill. et Pinus pecea L* (Doctoral dissertation, Université de Bouira).
- 46) Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- 47) Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions*, 91(2-3), 133-140.
- 48) Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- 49) Hamdi, I., Belkacem, F., & Fondougouma, O. (2017). *Evaluation de l'activité antifongique des extraits aqueux et méthanoulique d'une plante endémique de la wilaya d'Adrar contre la maladie de Bayoud* (Doctoral dissertation, Université Ahmed Draïa-ADRAR).
- 50) Hellwig, F. H. (2004). Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean—history of ecogeographical radiation. *Plant Systematics and Evolution*, 246(3-4), 137-162.



- 51) **Hu, S., Kim, J. A., Moon, M. H., Lee, S. H., Yoon, H. S., & Hong, J. H. (2018).** Standardization for Analysis Method of Total Polyphenol in Complex of Picao Preto. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 33(1), 44-49.
- 52) **Hughes, D. W., Holland, H. L., & MacLean, D. B. (1976).** <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of some isoquinoline alkaloids and related model compounds. *Canadian Journal of Chemistry*, 54(14), 2252-2260.
- 53) **Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (2004).** Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin–Ciocalteu assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2391-2396.
- 54) **Khelef, Y., Chouikh, A., Rebiai, A., & Neffar, S. (2019).** Biochemical, quantitative and qualitative phenolic compounds, anti-free radical's activities of *Calligonum comosum* collected from different sites in the Algerian Desert. *Biharean Biologist*, 13(2), 71-76.
- 55) **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- 56) **Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., & Soro, S. (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)*, 5(3), 550-558.
- 57) **Labed, F., Masullo, M., Mirra, V., Nazzaro, F., Benayache, F., Benayache, S., & Piacente, S. (2019).** Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 133, 51-55.
- 58) **Lahneche, A. M., Boucheham, R., Ozen, T., Altun, M., Boubekri, N., Demirtas, I., ... & Zama, D. (2019).** In vitro antioxidant, DNA-damaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephala*L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3).
- 59) **Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001).** Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 829-838.
- 60) **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- 61) **Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2018).** Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757.
- 62) **Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

- 63) Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpénoïdes. In *Pharmacognosy* (p. 233-266). Elsevier.
- 64) 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.
- 65) Magalhães, L. M., Almeida, M. I. G., Barreiros, L., Reis, S., & Segundo, M. A. (2012). Automatic aluminum chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas. *Food Analytical Methods*, 5(3), 530-539.
- 66) Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- 67) Malecky, M. (2008). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* (Doctoral dissertation, Paris, AgroParisTech).
- 68) Mammen, D., & Daniel, M. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food chemistry*, 135(3), 1365-1368.
- 69) McCreath, B. S., & Delgoda, R. (2016). *Pharmacognosy : Fundamentals, Applications and Strategies* (1re éd.). Academic Press.
- 70) Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy* (p. 233-266). Elsevier.
- 71) Mesboua, B., & SAIDI, S. (2019). Etude synergique sur l'activité anti-hémolytique des protéines de deux espèces végétales *Allium sativum* et *Pinus halepensis* Mill.
- 72) Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Stojanović-Radić, Z. Z., Mihajilov-Krstev, T., Jovanović, N. M., ... & Stojanović, G. S. (2019). Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 140, 111702.
- 73) Nadal, B. (2009). *Synthèse et Evaluation de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants* (Doctoral dissertation).
- 74) Nejad Ebrahimi, S. (2008). Hadian b, Mirjalili MH, Sonboli C, Yousefzadie D. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chem*, 110, 927-931.
- 75) Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.

- 76) Ozenda, P. (1983).** *Flore du Sahara (French Edition)* (2e éd., rev.complétée éd.). Editions du Centre national de la recherche scientifique.
- 77) Pasqualini, V., Robles, C., Garzino, S., Greff, S., Bousquet-Mélou, A., & Bonin, G. (2003).** Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*, 52(1), 239-248.
- 78) Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
- 79) Postu, P. A., Sadiki, F. Z., El Idrissi, M., Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., & Hritcu, L. (2019).** *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108673.
- 80) Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. (2016).** Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*, 148, 183-193.
- 81) Rioux, C. (2009).** Stress oxydatif et prévention des maladies chroniques : la supplémentation s'impose-t-elle?.
- 82) Rolland, Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(6), 419-424.
- 83) Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015).** Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 30, 33-39.
- 84) SALHI, N. (2020).** *etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et anti hyperglycémiant des extraits aqueux et éthanolique de l'écorce de pinus halepensis.* (thèse doctorat, université mohammed v-rabat faculte de medecine et de pharmacie).
- 85) Seidel, V. (2012).** Initial and bulk extraction of natural products isolation. In *Natural products isolation* (pp. 27-41). Humana Press.
- 86) Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017).** Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- 87) Slimani, C., & Derbal laidli, A. (2018).** *Evaluation de quelques activités biologiques des extraits polysaccharidiques des graines de Pinus halepensis Mill* (Doctoral dissertation, Université de Bouira).
- 88) Souhila, H. (2019).** *Evaluation de l'Activité anti-radicalaire de Pinus halepensis Mill* (Doctoral dissertation).
- 89) Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2006).** Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.

- 90) Therond, P. (2006, November).** Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 383-389). Elsevier Masson.
- 91) Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S., & Vijayakumar, R. (2018).** An introductory chapter: secondary metabolites. *Second metab—sources Appl*, 1-21.
- 92) Trierweiler, B., & Weinert, C. H. (2019).** Post-Harvest treatments and related food quality. In *Food Tech Transitions* (pp. 49-63). Springer, Cham.
- 93) Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- 94) Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007).** *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- 95) Zeiner, M., Kuhar, A., & Juranović Cindrić, I. (2019).** Geographic differences in element accumulation in needles of Aleppo Pines (*Pinus halepensis* Mill.) grown in Mediterranean region. *Molecules*, 24(10), 1877.

## Absract

The objective of the present study relates to a phytochemical analysis of aqueous and organic extracts (water-acetone, water-methanol, n-butanol and ethyl acetate) of *Pinus halepensis* cone extracts and of the aerial part of *Centaurea pungens* extracts, as well as the evaluation of their antioxidant activity.

The obtained results about the determination of polyphenols and flavonoids in the tested extracts revealed a high content of polyphenols and flavonoids. *Pinus halepensis* cone extracts have the highest level compared to *C. pungens* extracts, mainly n-butanol extract, 407.16 µg EAG / mgE of polyphenols and 206.79 µg EC / mgE of flavonoids. *C. pungens* ethyl acetate extract contains the lowest content of polyphenols (91.94 µg EAG / mgE) but a high content of flavonoids (39.76 µg EC / mgE) compared to the other extracts from the plant.

The results of the antioxidant activity, revealed that the water-methanol extract of *Pinus halepensis* cone extract shows a promising anti-free radical activity on DPPH, characterized by an IC50 value of 13.13 µg / ml. The reducing power of iron (FRAP test) of this extract is also important with an EC50 value of 783.39µg / ml.

**Keywords:** *Pinus halepensis*, *Centaurea pungens*, total polyphenols, total flavonoids, DPPH, FRAP.

## المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو اجراء تحليل كيميائي نباتي للمستخلصات العضوية (ماء -أسيتون، ميثانول مائي، ن-بيوتانول، أسيتات إيثيل)، لكل من نبات الصنوبر *Centaurea pungens* وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة.

أظهرت النتائج المتحصل عليها حول تقدير البوليفينول والفلافونويد في كل من المستخلصات المختبرة وجود نسب عالية، حيث سجلت مستخلصات نبات الصنوبر نسب اعلى من البوليفينول والفلافونويد مقارنة بمستخلصات *C.pungens* خاصة المستخلص ن-بيوتانول الذي سجل 407,16 (مكغ معادل لحمض الغاليك لكل مغ من المستخلص) و206,79 (مكغ معادل للكاتشين لكل مغ من المستخلص) من البوليفينول والفلافونويد على التوالي. المستخلص اسيتات إيثيل الذي يحوي نسب اقل من البوليفينول والفلافونويد على مغ من المستخلص) في القابل سجل هذا المستخلص اعلى نسبة من الفلافونويد 39,75 (مكغ معادل للكاتشين لكل مغ من المستخلص) بالنسبة للمستخلصات الاخرى لهذه النبتة.

وضحت نتائج النشاط المضاد للأكسدة ان مستخلص ميثانول-المائي لنبات الصنوبر يمتلك نشاطا مضاد للجذور الحرة DPPH بقيمة 13,13 مكغ/مل، كما اظهر هذا المستخلص خاصية معتبرة لارجاع الحديد (اختبار FRAP) بقيمة 783,39مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: الصنوبر ، *Centaurea pungens* ، البوليفينول والفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، الجذور الحرة DPPH ، ارجاع الحديد FRAP.