

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE BATNA 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET
DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES
ORGANISMES



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT (LMD)

Présentée par :

M^{elle} MOUFFOUK CHAIMA

Filière

SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité

**BIOTECHNOLOGIE DES MOLECULES BIOACTIVES ET
PATHOLOGIES MOLECULAIRES**

Thème

**Evaluation des activités biologiques
et étude de la composition chimique
de la plante *Scabiosa stellata* L.**

Soutenue publiquement le 29/01/2019 devant le jury:

Président	SENATOR Abderrahmane	Professeur	Université Batna 2
Rapporteur	HAMBABA Leila	Professeur	Université Batna 2
Co-rapporteur	HABA Hamada	Professeur	Université Batna 1
Examineurs :	BEDJOU Fatiha	Professeur	Université Bejaia
	LAROUUI Salah	Professeur	Université Batna 2
	BENKIKI Naima	Maitre de conférences A	Université Batna 2

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour achever cette thèse.

Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD, spécialité Biotechnologie des molécules bioactives et pathologies moléculaires, a été réalisé au sein du Laboratoire de chimie des matériaux et des vivants: activité et réactivité (LCMVAR) et le laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E) de la faculté des sciences de la matière, Université de Batna-1, sous la direction des Professeurs **HAMBABA LEILA** et **HABA HAMADA**.

*J'*exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance a mes Directeurs de thèse Madame **HAMBABA Leila** Professeur au département de Biochimie et microbiologie à l'université de Batna-2 et Monsieur **HABA Hamada** Professeur au département de chimie à l'université de Batna-1 pour l'intérêt qu'ils ont manifestés pour la réalisation de ce travail, d'avoir encadrés et dirigés ce travail avec une grande rigueur scientifique, leur disponibilité, leurs conseils et la confiance qu'ils m'ont accordé et qui a permis de réaliser ce travail. Ce travail n'aurait pas été le même sans votre encadrement.

Mes vifs remerciements vont à Professeur **SENATOR Abderrahmane** de l'université de Batna-2, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

*J'*adresse également mes vifs remerciements à: Madame le Professeur **BEDJOU Fatiha** de l'université de Bejaia, Monsieur le Professeur **LAROUI Salah** de l'université de Batna-2 et Madame le Docteur **BENKIKI Naima** Maître de conférences A de l'université de Batna-2 pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse de doctorat.

Un très précieux remerciement va à Docteur **MOUFFOUK Soumia** enseignante au département de chimie à l'université de Batna-1, qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution de cette thèse en me prodiguant toute aide possible, pour

son soutien et son encouragement permanent durant toutes mes années d'étude, de m'avoir supporté le long de ce travail sans jamais m'avoir privé de son savoir.

Je tiens à remercier également Docteur **BENCOUICI Chawki** Maître de conférences B au centre de recherche et de biotechnologie -Constantine-pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également Docteur **MOUFFOUK Sara** enseignante au département de biologie des organismes à l'université de Batna-2, pour son aide constante, sa marque de sympathie et ses précieux conseils

Un grand respectueux remerciement va à Monsieur **ABDESSAMAD Saleh**, responsable des laborantins de santé publique et enseignant à l'institut nationale paramédicale-Batna, qui n'a pas hésité de m'aider, J'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement, son savoir et de sa grande expérience.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **HACHEMI Messaoud** enseignant au département de biologie des organismes à l'université de Batna-2, pour son aide.

Je remercie également Docteur **KHADRAOUI Hachani**, Maître de conférences hospitalo-universitaire et responsable du laboratoire d'anatomie pathologique (CAC Batna), ainsi que toutes les techniciennes du laboratoire pour leur aide afin de réaliser et interpréter les coupes histologiques.

Je n'oublie pas de remercier vivement les laborantines du (CHU, EPH et CAC Batna) et CRBT Constantine en particulier : **Lynda, Souhila, Wahiba et Meriem**.

Finalement, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce travail.

Dédicace

À ma chère mère

L'exemple de la force et mon grand secours qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir en permanence durant toutes les années de mes études.

Sans toi, je n'ai pas pu être ce que je suis et je ne saurais pu progresser et achever ce travail.

Puisse Dieux, le tout puissant te préserve et t'accorde une longue heureuse vie.

À mon cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, ma formation et mon bien être.

À la mémoire de mon grand père

À mes chères sœurs

À mon frère

À la petite agronome Nada Aicha

À mes chères nièces et neveux.

À mes chères amies : Nardjess, Mounira, Warda et Samiha.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Partie I : Rappel bibliographique

Chapitre I : Description de la plante

I-	La famille Dipsacaceae	
	I-1- Répartition géographique.....	4
II-	Le genre <i>Scabiosa Linnaeus, Sp.</i>	
	II-1- Description botanique.....	4
	II-2- Répartition géographique.....	5
	II-3- Usage en médecine traditionnelle.....	5
	II-4- Activités biologiques	5
	II-5- Composition chimique.....	6
III-	L'espèce <i>Scabiosa stellata L.</i>	
	III-1- Etymologie.....	6
	III-2- Répartition géographique	7
	III-3- Description botanique.....	7
	III-4- Classification botanique.....	7
	III-5- Usage en médecine traditionnelle.....	8

Chapitre II : radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants

I-	Radicaux libres	
	I-1-Définition.....	9
	I-2-Sources	9
II-	Stress oxydatif	
	II-1- Définition	10
	II-2- Conséquences moléculaires du stress oxydatif.....	11
	II-3-Conséquences pathologiques du stress oxydatif	13
III-	Antioxydants et systèmes de défense	
	III-1-Définition.....	14
	III-2- Mode d'action.....	14
	III-3- classification des antioxydants.....	14

Chapitre III : Inflammation et anti-inflammatoires

I-	Inflammation	
	I- 1- Définition.....	18

I-2- Etiologies.....	18
I-3- Acteurs et déroulement de la réaction inflammatoire	18
I-4- Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique	22
II- Les anti-inflammatoires	
II-1- Anti-inflammatoires non stéroïdiens	25
II-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens	25
II-3- Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	26
Chapitre IV : Antibiotiques et antibiorésistance	
I- Antibiotiques	
I-1- Définition.....	27
I-2- Mode d'action des antibiotiques	27
I-3- Toxicité des antibiotiques.....	29
II- Résistances aux antibiotiques	
II- 1-Types de résistance bactérienne.....	29
II-2- Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques	30
Chapitre V : Les saponines	
I- Généralités	32
II- Structure	32
III- Biosynthèse	33
VI- Propriétés biologiques des saponosides	33

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

Partie biologique

I- Matériel biologique	
I-1- Matériel végétal.....	36
I-2- Matériel animal.....	36
I-3- Matériel bactérien.....	36
I-4- <i>Armatia salina</i> L.....	37
II- Obtention des extraits végétaux	38
III- Analyse qualitative	40
IV- Analyse quantitative	
IV-1- Dosage des polyphénols totaux	42
IV-2- Dosage des flavonoïdes totaux	42
IV-3- Dosage des tanins condensés	43
V- Activité antioxydante	
V-1- piégeage des radicaux libres DPPH.....	43

V-2-piégeage des radicaux libres ABTS.....	44
V-3- Pouvoir réducteur.....	45
V-4- Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	46
V-5- Test du blanchiment du β -carotène.....	46
V-6- Capacité antioxydante totale (CAT)	47
V-7- Chélation du fer ferreux.....	48
V-8- Chélation des ions métalliques.....	48
VI- Activité antibactérienne	49
VII- Evaluation de la cytotoxicité <i>in-vitro</i> sur les larves d'<i>Artemia salina</i>	51
VIII- Activité hémolytique	52
IX- Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	53
X- Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase	53
XI- Evaluation de la toxicité aiguë	54
XII- Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	57
XIII- Activité antipyrétique	58
XIIII- Analyses statistiques.....	59

Partie phytochimique

I-Chimie extractive	
I-1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	60
I-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)	60
I-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	60
II- Chimie structurale	
II-1- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	60
II-2- Spectrométrie de masse (SM).....	61
III- Contrôle chromatographique des extraits.....	61
IV-Etude de l'extrait <i>n</i>-BuOH de l'espèce <i>Scabiosa stellata</i>	
V-Purification	
V-1- Etude de la fraction F-6'	63
V-2- Etude de la fraction F-7'	65

Chapitre II : Résultats et discussion

Partie biologique

I- Extraction	66
II- Analyse qualitative	66
III- Analyse quantitative.....	68
IV- Activités biologiques <i>in vitro</i>	
IV-1- Activité antioxydante.....	70
IV-1-1- Piégeage des radicaux libres DPPH.....	70
IV-1-2- Piégeage des radicaux libres ABTS.....	74
IV-1-3- Pouvoir réducteur.....	75

IV-1-4- Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	77
IV-1-5- Test du blanchiment du β -carotène.....	79
IV-1-6- Capacité antioxydante totale (CAT)	81
IV-1-7- Chélation du fer ferreux et des ions métalliques.....	83
VI-2-Activité antibactérienne.....	84
IV-3- Test de toxicité <i>in vitro</i> sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	89
IV-4- Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	90
IV-5- Activité hémolytique.....	92
IV-6- Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase	94
V- Activités biologiques <i>In vivo</i>	
V-1- Evaluation de la toxicité aigue	
V-1-1- Toxicité aigüe de l'extrait acétate d'éthyle.....	96
V-1-2- Toxicité aigüe de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	101
V-2- Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	107
V-3- Activité antipyrétique	111

Partie phytochimique

1- Identification structurale des composés isolés	
1-1- Identification structurale du composé 1	113
1-2- Identification structurale du composé 2	135
Conclusion générale et perspectives	142

Références bibliographiques

Annexes

Publications

Résumés

| Liste des abréviations

ABTS :	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ACh :	Acétylcholine
AChE :	Acétylcholinestérase
AcOEt :	Acétate d'éthyle
AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS :	Anti-inflammatoires stéroïdiens
ALAT :	Alanine l'aminotransférase
Arb :	Arabinose
ASAT :	Aspartate aminotransférase
BChE :	butyrylcholinestérase
BHA :	hydroxyanisole butylé
BHT :	Hydroxytoluène butylé
CAT :	Catalase
CC :	Chromatographie sur colonne ouverte
CCE :	Chromatographie sur couche épaisse
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CHCl₃ :	Chloroforme
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CoA :	Coenzyme-A
COSY H-H :	Correlation spectroscopy H-H
COX :	Cyclooxygénase
<i>d</i> :	Doublet
<i>dd</i> :	Doublet de doublets
DL₅₀ :	Dose létale 50
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO :	Densité optique
DPPH :	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<i>dq</i> :	Doublet de quadruplets
EC₅₀ :	Concentration efficace 50
EDTA :	Acide ethylenediaminetetra-acétique
EOR :	Espèces oxygénées réactives
EP :	Ether de pétrole
ERA :	Espèces réactives de l'azote
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
F :	Fraction

| Liste des abréviations

Gal :	Galactose
Glc :	Glucose
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HCl :	Acide chlorhydrique
HMBC :	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC :	Heteronuclear single quantum correlation
Hz :	Hertz
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50%
IL :	Interleukine
J :	Constante de couplage en Hz
LC₅₀	Concentration létale 50
m :	Multiplet
m/z :	Masse/charge d'un ion
NADHH⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
n-BuOH :	n-Butanol
O₂⁻ :	Anion superoxyde
OH[•] :	Radical hydroxyle
PBS :	Phosphate buffered salin
PNN	Polynucléaires neutrophiles
ppm :	Partie par million
R :	Radical
Rha	Rhamnose
RMN ¹³C :	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
RMN ¹H :	Résonance magnétique nucléaire du proton
RNS :	Espèces réactives de l'azote
RO[•] :	Radical alkoxyde
ROO[•] :	Radical peroxyde
ROOH :	Peroxyde organique
RP-18 :	Silice greffée en C-18
s :	Singulet
SiO₂ :	Gel de silice normale
sl :	Singulet large
SOD :	Superoxyde dismutase
TCA :	Acide trichloracétique
td :	Triplet de doublets

| Liste des abréviations

uma :	Unité de masse atomique
VLC :	Chromatographie liquide sous vide
XO :	Xanthine oxydase
Xyl :	Xylose
δ :	Déplacement chimique en ppm

Liste des figures

Figure 1	Répartition géographique de L'espèce <i>Scabiosa stellata</i> L.....	7
Figure 2	L'espèce <i>Scabiosa stellata</i> L (Aspects des fleurs, feuilles et rameaux)....	8
Figure 3	Atteintes ciblées des radicaux libres.....	13
Figure 4	Réactions catalysées par les systèmes antioxydants primaires.....	15
Figure 5	Antioxydants secondaires.....	17
Figure 6	Médiateurs lipidiques de l'inflammation.....	21
Figure 7	Principales étapes de l'inflammation aigüe.....	24
Figure 8	Mode d'action des antibiotiques.....	28
Figure 9	Mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques.....	30
Figure 10	Principaux squelettes stéroïdiques.....	32
Figure 11	Principaux squelettes triterpéniques.....	33
Figure 12	<i>Artemia salina</i> (L.)	37
Figure 13	Cycle de développement d' <i>Artemia salina</i>	38
Figure 14	Schéma d'extraction de la plante <i>Scabiosa stellata</i> L.....	39
Figure 15	Réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle en diphényle picryl hydrazine	44
Figure 16	L'acide 2,2'- azino-bis (3-éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide)	44
Figure 17	Structure de la molécule du β -carotène.	47
Figure 18	Préparation du milieu de culture.....	49
Figure 19	Ensemencement des bactéries.....	50
Figure 20	Dépôt des disques imprégnés par les extraits et incubation des boites.....	50
Figure 21	Prélèvement et préparation de la suspension érythrocytaire.....	52
Figure 22	Administration et observation des rats traités (test de toxicité aigüe)	54
Figure 23	Examens d'anatomie-pathologiques.	57
Figure 24	Administration et injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche.	58
Figure 25	CCM des extraits bruts de la plante <i>S.stellata</i>	61
Figure 26	CCM récapitulatives des différentes fractions de l'extrait <i>n</i> -butanolique de la plante <i>S. stellata</i>	62
Figure 27	Plaque CCM du produit 2.....	64
Figure 28	Plaque CCM du produit 1.....	65
Figure 29	Résultats du screening phytochimique de l'espèce <i>Scabiosa stellata</i> L.	67
Figure 30	Profil de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres DPPH ...	71
Figure 31	Profil de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres ABTS	74

Liste des figures

Figure 32	Profil du pouvoir réducteur des extraits bruts de <i>Scabiosa stellata</i>	76
Figure 33	Capacité antioxydante par réduction de cuivre des extraits de la plante <i>S. stellata</i>	78
Figure 34	Activité antioxydante par test du blanchiment du β -carotène.....	80
Figure 35	Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique (capacité antioxydante totale).....	82
Figure 36	Comparaison de la capacité antioxydante totale extraits bruts obtenus à partir de <i>scabiosa stellata</i>	82
Figure 37	Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (EDTA).....	83
Figure 38	Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (Extrait AcOEt).....	84
Figure 39	Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (Extrait n-BuOH).....	84
Figure 40	Souches sensibles pour l'extraits éther de pétrole de l'espèce <i>S.stellata</i>	86
Figure 41	Souches sensibles à l'extraits n-butanolique de l'espèce <i>S.stellata</i>	87
Figure 42	Souches sensibles à l'extraits acétate d'éthyle de <i>S.stellata</i>	88
Figure 43	Pourcentage de mortalité observé après le traitement des <i>napauli</i> avec les extraits bruts de <i>S.stellata</i> .	89
Figure 44	Profil de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de l'espèce <i>Scabiosa stellata</i> .	95
Figure 45	Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).	98
Figure 46	Photos représentatives des coupes histologiques des reins des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).	99
Figure 47	Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).	100
Figure 48	Signes de toxicité observés chez les rats traités par l'extrait n-butanolique.	102
Figure 49	Photos représentatives des coupes histologiques du foie des rats traités par l'extrait n-BuOH ($\times 20$)	103
Figure 50	Photos représentatives des coupes histologiques du rein des rats traités par l'extrait <i>n</i> -BuOH ($\times 20$).	104
Figure 51	Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait <i>n</i> -BuOH ($\times 20$)	105
Figure 52	L'œdème de patte observé chez les rats injectés par la carragénine.....	108
Figure 53	Effet de l'administration orale de l'extrait AcOEt sur l'œdème de la patte de rat induite par le carraghénine..	109

Liste des figures

Figure 54	Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH sur l'œdème de la patte de rat induite par le carraghénine.. .. .	110
Figure 55	Pourcentages d'inflammation observés au cours de toutes les périodes d'essais sur tous les traitements testés.....	110
Figure 56	Spectre RMN ¹ H du composé 1	113
Figure 57	Partie du spectre RMN ¹ H du composé 1 indique la présence de trois protons anomères.....	114
Figure 58	Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé 1	114
Figure 59	Corrélations COSY H-H du composé 1	115
Figure 60	Spectre HSQC <i>J</i> -modulé (Partie génine) du composé 1	116
Figure 61	Partie du spectre HMBC du composé 1	117
Figure 62	Corrélations HMBC des protons H ₃ -24 et H-5.....	117
Figure 63	Partie du spectre HMBC montre les couplages des protons H ₃ -25, H ₃ -26 et H-9.....	119
Figure 64	Spectre COSY H-H du composé 1	120
Figure 65	Corrélations HMBC du proton éthylénique H-12.....	120
Figure 66	Corrélations HMBC des protons H-11a et H-11b.....	121
Figure 67	Corrélations HMBC du méthyle-27	122
Figure 68	Corrélations HMBC des protons H-18 et H-16.....	122
Figure 69	Partie du spectre COSY H-H du composé 1	123
Figure 70	Partie du spectre HMBC du composé 1	124
Figure 71	Corrélations HMBC du cycle D.....	124
Figure 72	Corrélations NOESY de la partie génine du composé 1	126
Figure 73	Corrélations COSY H-H du premier sucre (Arabinose)	126
Figure 74	Spectre HSQC de la partie osidique.....	127
Figure 75	Spectre HMBC de la partie osidique du composé 1	128
Figure 76	Corrélations COSY H-H du deuxième sucre (α-L-rhamnose)	129
Figure 77	Corrélations COSY H-H du groupement méthyle de α-L-rhamnose	129
Figure 78	Partie du spectre TOCSY du composé 1	130
Figure 79	Corrélations COSY H-H du troisième sucre (β-D-xylose)	131
Figure 80	Corrélations TOCSY du troisième sucre (β-D-xylose)	132
Figure 81	Partie du spectre HMBC du composé 1 montre les points de branchement entre la génine tritérpnique et les unités osidiques	132

Liste des figures

Figure 82	Spectres RMN ^1H des composés 1 et 2 dans le (CD_3OD)	136
Figure 83	Corrélations HMBC de la génine triterpénique.....	137
Figure 84	Partie du spectre RMN ^1H du composé 2 présente les quatres protons anomères.....	137
Figure 85	Partie du spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé 2	138
Figure 86	Corrélations COSY H-H du quatrième sucre (β -D-glucose)	138
Figure 87	Partie du spectre TOCSY du composé 2	139
Figure 88	Corrélations HMBC du composé 2 montrent le branchement des unités osidiques par la génine triterpénique.....	139

Liste des tableaux

Tableau 1	Genres représentatifs de la famille Dipsacaceae.....	4
Tableau 2	Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Scabiosa</i> L.....	6
Tableau 3	Espèces réactives d'oxygène d'intérêt biologique.....	9
Tableau 4	Espèces réactives d'azote d'intérêt biologique.....	10
Tableau 5	Sources et effets biologiques majeurs de quelques cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire	21
Tableau 6	Estimation de la toxicité des extraits sur les larves d' <i>Artemia salina</i> .	52
Tableau 7	Répartition des lots traités.....	57
Tableau 8	Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -BuOH de l'espèce <i>S. stellata</i>	62
Tableau 9	Rassemblement des fractions de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	63
Tableau 10	Rassemblement des sous fractions de la fraction F-6.....	63
Tableau 11	Rassemblement des sous fractions de la fraction F-7'.....	65
Tableau 12	Couleur et rendement de différents extraits obtenus à partir de <i>Scabiosa sellata</i>	66
Tableau 13	Résultats du criblage phytochimique des extraits de <i>S. stellata</i>	66
Tableau 14	Teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits obtenus de l'espèce <i>S. stellata</i> .	68
Tableau 15	Résultats des activités antioxydantes de l'espèce <i>S. stellata</i> par (DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur	72
Tableau 16	Résultats des activités antioxydantes des extraits organiques de l'espèce <i>Scabiosa stellata</i> par (β -carotène, CAT, chélation du fer ferreux et des ions métalliques	79
Tableau 17	Activité antibactérienne des extraits de l'espèce <i>Scabiosa stellata</i> exprimée en les diamètres des zones d'inhibition en mm \pm SD.	86
Tableau 18	Résultats de l'activité anti-inflammatoire <i>invitro</i> la plante <i>S. stellata</i>	91
Tableau 19	Résultats de l'activité hémolytique des extraits bruts de <i>S. stellata</i>	93
Tableau 20	Effets de l'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Scabiosa stellata</i> sur les paramètres biochimiques des rats	96
Tableau 21	Effet de l'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Scabiosa stellata</i> sur les paramètres hématologiques des rats traités	101
Tableau 22	Effets de l'administration de l'extrait <i>n</i> -butanolique de <i>Scabiosa stellata</i> sur les paramètres biochimiques des rats	103
Tableau 23	Effets de l'administration de l'extrait <i>n</i> - butanolique de <i>S.stellata</i> sur les	106

Liste des tableaux

	paramètres hématologiques des rats traités	
Tableau 24	Effets antipyrétiques des extraits issus de la plante <i>Scabiosa stellata</i>	111
Tableau 25	Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé 1 dans le méthanol deutéré	133
Tableau 26	Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé 2 dans le méthanol deutéré	140

Introduction

Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène sont utilisées par les organismes vivants en raison de leur réactivité bénéfique dans de nombreux processus biologiques, tels que les mécanismes de défense ou les molécules de signalisation. Ces espèces sont utiles et bénéfiques en faibles concentrations dans la cellule par l'équilibre entre système prooxydant/antioxydant qui conduit à l'homéostasie (**Rahal et al., 2014**). Cependant, un déséquilibre entre les sources de radicaux libres et les systèmes antioxydants mène au stress oxydatif (**Birbenet et al., 2012**). Ce dernier est la cause de plusieurs dysfonctionnements métaboliques et endommage les macromolécules biologiques (lipides, ADN et protéines) (**Therond 2006, Mahjoub et Masrou-Roudsari, 2012**). Il induit de nombreuses maladies liées au vieillissement comme le cancer (**Sosa et al., 2013**), les troubles cardiovasculaires (**Csányi et Miller, 2014**), l'hypertension (**Kerr et al., 1999**), les maladies neurodégénératives (**Sayre et al., 2001**), le diabète et l'asthme (**Fitzpatrick et al., 2009**).

L'une des implications les plus courante du stress oxydatif est la maladie d'Alzheimer cette dernière est un trouble neurodégénératif du système nerveux central qui se développe progressivement. Actuellement, le seul traitement pour cette maladie est l'utilisation des inhibiteurs d'acétyl- et de la butyryl-cholinestérase (**Szwajgier 2015**). Plusieurs inhibiteurs synthétiques sont utilisés cliniquement mais ils présentent une efficacité limitée et des effets secondaires, c'est pourquoi la recherche de nouveaux agents biologiquement actifs à partir de sources naturelles représente un domaine d'investigation prometteur (**D'Ascenzio et al., 2015**).

L'organisme humain est exposé à une multitude de microorganismes qui peuvent envahir ses tissus dans certaines conditions causant des maladies infectieuses graves. Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal les plus utilisés pour lutter contre ces infections. Mais L'utilisation, souvent abusive, de ces antibiotiques favorise l'évolution des bactéries vers des stades de résistance entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques ; ce qui a poussé un grand nombre de gens à fuir ces traitements pour se diriger vers la médecine douce ou naturelle, qui s'est montrée aussi efficace que les remèdes chimiques et moins nuisibles et pour la plupart des cas, sans danger.

L'inflammation est une réaction de défense du corps à diverses attaques qui peuvent être physiques, chimiques, biologiques ou infectieuses (**Vane et Botting., 1987**) conduisant à des complications pathologiques telles que la polyarthrite rhumatoïde. Le traitement actuel de l'inflammation implique l'utilisation des médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules sont efficaces mais leur utilisation prolongée peut entraîner des effets indésirables graves tels que des saignements gastro-intestinaux et des ulcères peptiques (**Yamada et al., 1987**).

Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouveaux agents thérapeutiques avec peu d'effets secondaires pour prévenir l'apparition de maladies oxydatives, microbiennes et inflammatoires. Dans ce contexte, de nombreux chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales comme source alternative et importante de composés naturels pour compléter le corps par des molécules bioactives exogènes à effet thérapeutique.

Cependant, l'administration prolongée de molécules bioactives à des doses élevées ou faibles produits des effets nocifs ou toxiques, pour cela la toxicité aigüe des extraits de plantes doit être évaluée pour déterminer la dose létale 50 (DL₅₀) avant tout usage. Ainsi l'utilisation des plantes pourrait affecter les membranes des cellules spécialement les érythrocytes induisant l'anémie hémolytique, ce qui nécessite une évaluation de leur activité hémolytique avant leur administration. Et même si des effets toxiques ou hémolytiques sont détectés ceci indique la probabilité des plantes à exprimer des propriétés cytotoxiques et lytiques.

Ainsi, la présence d'une multitude de composés responsables des effets pharmacologiques dans les extraits de la plante, exige un fractionnement et ainsi que leur élucidation structurale.

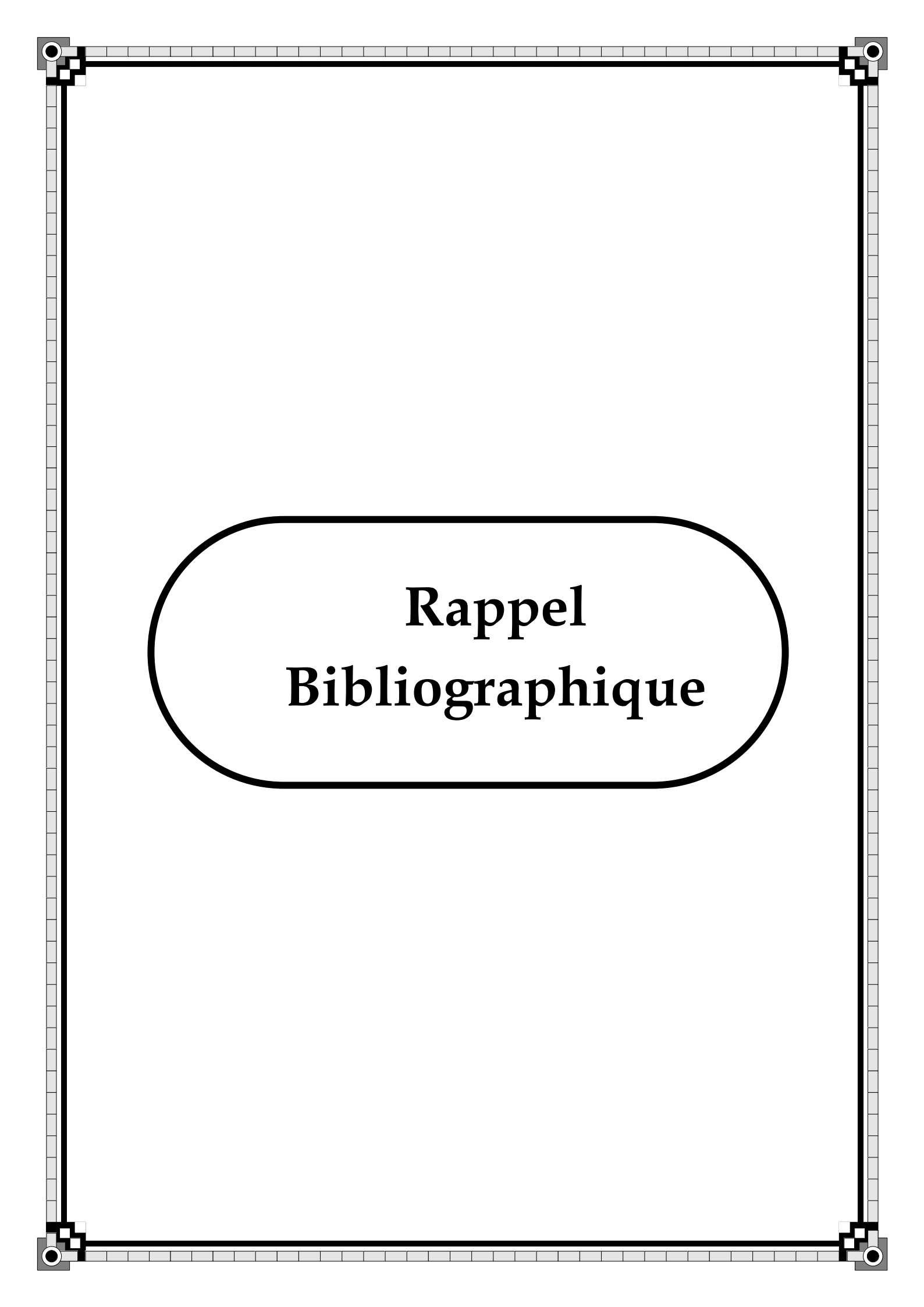
Dans ce contexte, s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est l'exploitation de nouvelles molécules bioactives à partir de la plante *Scabiosa stellata* et leur utilisation comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques ayant des effets secondaires, par l'évaluation de ces activités biologiques et l'étude de sa composition chimique.

Le travail est réparti en deux volets :

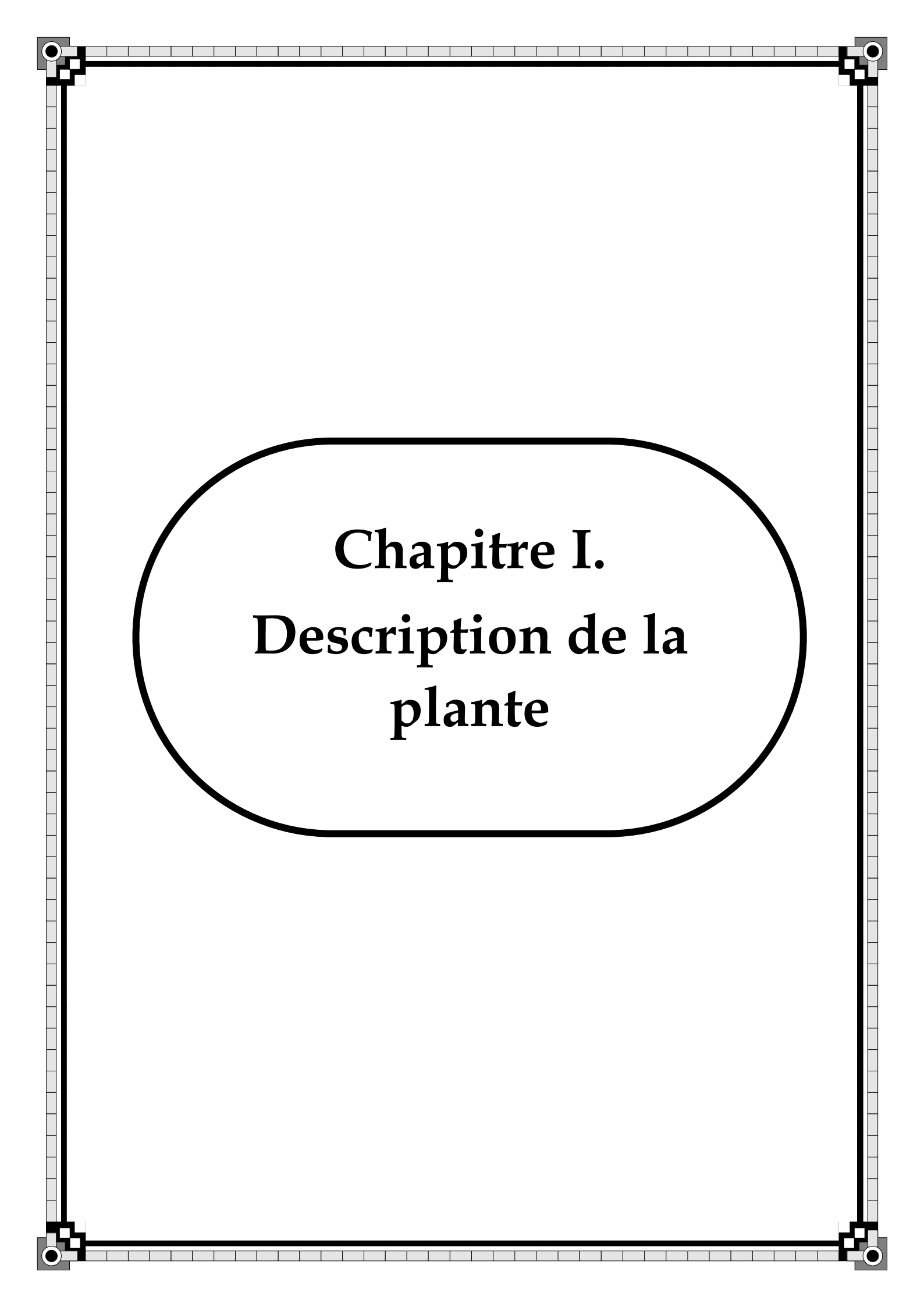
- ❖ Le premier volet est consacré à l'étude bibliographique en se basant sur les données générales sur la plante à étudier, les généralités sur les différents phénomènes traités

(stress oxydatif, inflammation et antibiorésistance) ainsi que les saponines autant que des métabolites secondaires et leurs propriétés biologiques.

- ❖ Le second volet est réservé à l'étude expérimentale comprenant les parties suivantes :
 1. La récolte et l'identification de l'espèce végétale d'intérêt, l'extraction et le criblage phytochimique des extraits ainsi que les dosages quantitatifs des taux de polyphénols, flavonoïdes et des tanins condensés.
 2. L'évaluation des activités biologiques *in vitro* : L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits organiques issus de la plante par huit méthodes différentes. Ainsi que l'évaluation de leur cytotoxicité sur les larves *d'Artemia salina* de leur l'activité anticholinestérase, hémolytique et antibactérienne.
 3. L'évaluation des activités biologiques *in vivo* : la toxicité aigüe des extraits ainsi que leurs activités anti-inflammatoires et antipyrétiques ont été réalisées.
 4. L'étude phytochimique : la dernière étape consiste à l'étude phytochimique de la plante d'intérêt par l'isolement et la caractérisation des biomolécules en utilisant différentes méthodes spectroscopiques.



**Rappel
Bibliographique**



Chapitre I.
Description de la
plante

I- La famille Dipsacaceae

La famille Dipsacaceae est une petite famille d'herbes et d'arbustes annuels dérivée de l'ordre Dipsacales (**Backlund et Bremer, 1997**). Elle est divisée en trois tribus (Dipsaceae, Knautieae et Scabioseae) et neuf genres (**Tableau 1**) comprenant 350 espèces (**Verlaque 1977 ; Verlaque 1984**).

Tableau 1 : Genres représentatifs de la famille Dipsacaceae

Genres	Nombre d'espèces
<i>Dipsacus</i> L.	20
<i>Cephalaria</i> Schrader	85
<i>Knautia</i> (L.) Coulter	80
<i>Succiça</i> Necker	03
<i>Succisella</i> Beck	04
<i>Pycocomon</i> Hoffm & Link	01
<i>Pterocephalus</i> (Vaill.) Adams	34
<i>Tremastelma</i> Rafin.	01
<i>Scabiosa</i> L.	80

I-1- Répartition géographique

Les plantes de cette famille ont une distribution méditerranéenne, avec des extensions au Moyen-Orient et à l'extrême-Orient (Chine et au Japon) et en Afrique (**Caputo et Cozzolino, 1994**).

II- Le genre *Scabiosa* Linnaeus, Sp. (Quezel et Santa, 1963)

II-1- Description botanique

Les plantes de ce genre sont des herbes pérennes, annuelles ou biennales ayant des feuilles so placées en face, parfois moulées, simples, entières ou dentées. Ou Les inflorescences de cymes sont compactes en formant une extrémité et les fleurs bisexuelles, presque toujours sous-tendues par 1 ou 2 objets tubulaires, dentaires ou subenties (epicalyx) blanches, roses, violettes ou bleuâtres. Avec un récipient poilu ou nu et un calyx généralement petit, cupulaire avec 4 à 5 segments, ou avec jusqu'à 10 dents.

Leur corolle symptomatique est constituée de 4 à 5 lobes plus au moins irrégulier avec quarts étamines ou rarement 2 ou 3 insérés au sommet du tube de la corolle.

L'ovaire inférieur est fermé et comprend un seul ovule, apical et pendulaire avec des fruit achène, entouré et couronné par un calice persistant.

II-2- Répartition géographique

Les plantes de ce genre sont réparties principalement dans les régions tempérées et subtropicales. En Eurasie tempérée de Nord et dans l'Afrique tropicale et l'Australe (**Carlson et al., 2012**).

II-3- Usage en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Scabiosa* sont largement utilisées en médecine traditionnelle :

Les parties aériennes de *S. atropurpurea* L. sont utilisées comme diurétique (**Bonet et Valles, 2007**) et comme hypoglycémiant (**Bonet et al., 1999**).

L'espèce *Scabiosa succisa*, est reconnue par ses propriétés expectorantes, épurantes, diaphorétiques, digestives et sécrétoires salivaires. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle et est bénéfique dans le traitement de nombreuses maladies humaines telles que la bronchite, la pneumonie bronchique, la grippe et l'asthme (**Bussman et al., 2010**). Elle est aussi recommandée dans le cas de certaines dermatoses et l'ulcère (**Girre 1980**).

Les inflorescences de *Scabiosa comosa* Fisch. ex Roem. Et Schult (SC) et *S. tschilliensis* Grunning (ST) sont utilisés contre les maladies du foie (**Chinese pharmacopoeia committee 1998**).

La décoction de la partie aérienne de *S. columbaria* est traditionnellement utilisée contre la diphtérie (**Rigat et al., 2007**).

II-4- Activités biologiques

Plusieurs études ont prouvé l'effet antidiabétique et la capacité des plantes de ce genre à réduire la production et l'absorption du glucose intestinal par l'inhibition de l' α -glucosidase (**Hlila^a et al., 2015**) et contre le diabète induit par l'alloxane (**Elhawary et al., 2011**).

Les extraits bruts des plantes de ce genre possèdent aussi des activités anti-inflammatoires et anti-nociceptives (**Kupeli et al., 2007 ; Wang et al., 2006**), analgésiques et antipyrétiques (**Requena et al., 1987**), antimicrobienne (**Besbes et al., 2012**), hépatoprotectives, antioxydantes et antivirale (**Elhawary et al., 2011; Hlila^b et al., 2015; Wang et al., 2006 ; Wang et al., 2013 ; Rahmouni^b et al., 2018**), cytotoxique (**Lehbili^a et al., 2018 ; Lehbili^b et al., 2018**).

II-5- Composition chimique

Des études phytochimiques antérieures sur ce genre ont permis de dévoiler la présence des métabolites secondaires principalement des saponines triterpéniques, iridoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, polyphénols. Les résultats des différentes études sont reportées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Scabiosa* L.

Espèce	Types de métabolites isolés	Référence
<i>S. tenuis</i> et <i>S. argentea</i>	Flavonoïdes	(Perdetzoglou <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. stellata</i>	Flavonoïdes, Iridoid glucosides, saponosides, triterpénoïdes, lipoides et polyphénols	(Lehbili ^a <i>et al.</i> , 2018 ; Lehbili ^b <i>et al.</i> , 2018 ; Rahmouni ^a <i>et al.</i> , 2018; Rahmouni ^b <i>et al.</i> , 2018)
<i>S. rotata</i>	Saponosides triterpénoïdes	(Baykal <i>et al.</i> , 1998 ; Baykal <i>et al.</i> , 1997 ; Baykal 1999)
<i>S. hymettia</i>	Flavonoïdes, coumarines, iridoïdes , Polyphénols	(Christopoulou <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. ochroleuca</i>	Flavonoïdes glycosylé	(Zemtsova <i>et al.</i> , 1968)
<i>S. caucasica</i>	Flavonoïde et acide oléanolique	(Garaev <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. tschiliensis.</i>	Saponines, triterpénoïdes	(Zheng <i>et al.</i> , 2004)
<i>S. bipinnata</i>	Saponines, alcaloïdes et Polyphénols	(Kuril'chenko <i>et al.</i> , 1971)
<i>S. atropurpurea</i>	Composés phénoliques	(Elhawary <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. atropurpurea subsp. maritima</i>	Iridoides glucosides	(Polat <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. columbaria</i>		(Horn <i>et al.</i> , 2001)
<i>S. variifolia</i>		(Papalexandrou <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. comosa</i>	Polyphénols, triterpènes et stérols	(JI <i>et al.</i> , 2014)

III- L'espèce *Scabiosa stellata* L.

III-1- Etymologie

Scabiosa stellata (L.) Rafn ou *Lomelosia stellata* (L.) Raf. reconnue par les noms : Nouarat laklab , scabieuse étoilée et Ping Pong.

III-2- Classification botanique

La Classification botanique de l'espèce *Scabiosa stellata* L. se présente comme suit:

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheabionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnolipsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Dipsacales</i>
Famille	<i>Dipsacaceae</i>
Genre	<i>Scabiosa</i> L.
Espèce	<i>Scabiosa stellata</i> L.

III-3-Répartition géographique

L'espèce *Scabiosa stellata* L se trouve en Europe (Espagne, Portugal, Baléares, Sardaigne, Italie et Dalmatie), au nord de l'Afrique (Algérie, Tunisie et Maroc) et à l'Est de l'Asie (Figure 1) (Carlson *et al.*, 2012).

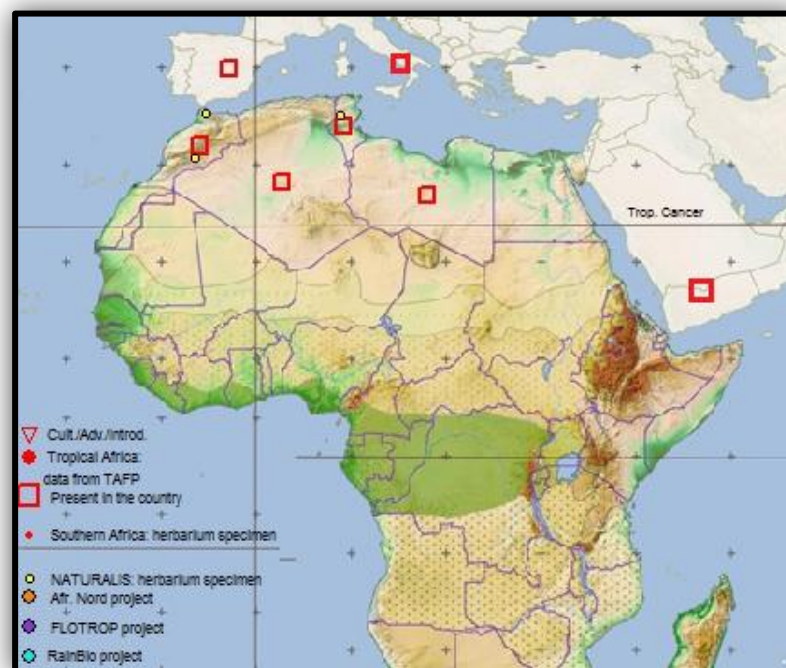


Figure 1 : Répartition géographique de l'espèce *Scabiosa stellata* L. (African Plant Database)

II-4- Description botanique

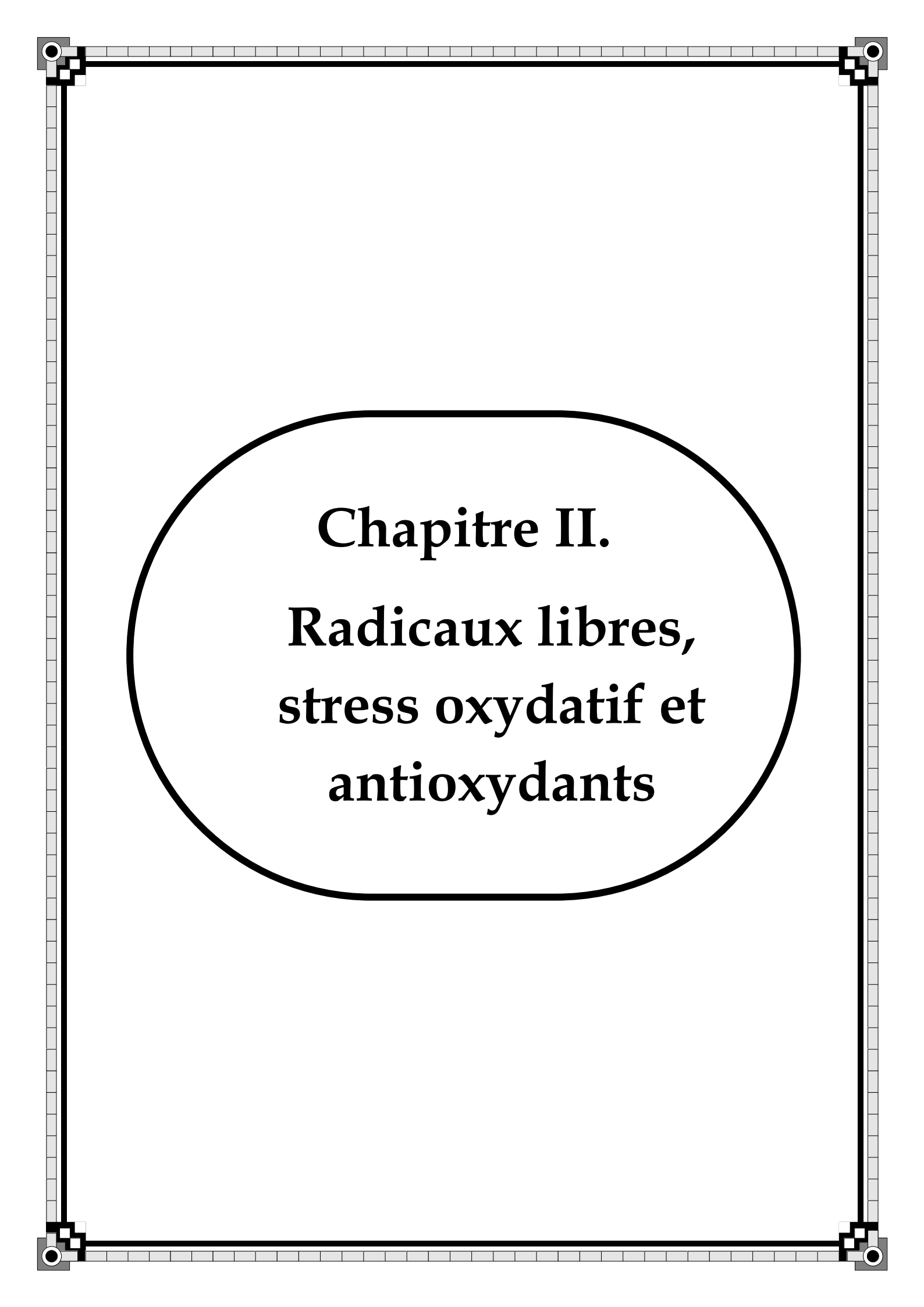
Scabiosa stellata est une plante annuelle hispide de petite taille de (10 à 30 cm) à rameaux dichotomes et très florifère qui produit des grappes de fleurs bleuâtres en forme de boule, rayonnantes, à 5 lobes inégaux. Les feuilles sont radicales dentées ou incisées (Quezel et Santa, 1963) (Figure 2).



Figure 2 : L'espèce *Scabiosa stellata* L. aspects des fleurs, feuilles et rameaux
(African Plant Database)

III-5- Usage en médecine traditionnelle

L'espèce *Scabiosa stellata* est bénéfique pour le traitement de nombreuses maladies respiratoires à savoir : bronchite, pneumonie bronchique, grippe et asthme. Elle est utilisée comme : expectorant, purifiant, diaphorétique, gastrique, apéritif et digestif (Wannes et Marzouk, 2016). Selon la population marocaine cette plante est employée comme cataplasme, associée à la graisse de poulet et à l'huile d'olive contre les fissures au talon (Kahouadji., 1995 ; Bammi et Douira, 2002).



Chapitre II.

**Radicaux libres,
stress oxydatif et
antioxydants**

I- Radicaux libres

I-1- Définition

Les radicaux libres sont des entités chimiques possédant un électron non apparié (célibataire) sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron célibataire a pris naissance suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant (**Halliwell et Gutteridge, 2015**). Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres (**Phaniendra *et al.*, 2015**).

I-2-Sources

I-2-1-Sources endogènes

Parmi Les réactions enzymatiques, plusieurs sont considérées comme source principale les espèces réactives d'oxygène (ROS) incluant : NADPH oxydase, lipoxygénase, xanthine oxydase (enzyme dans le foie).

La mitochondrie est un élément fondamental pour le fonctionnement de la cellule, c'est au niveau de cet organite que s'effectue la respiration cellulaire. La consommation de l'oxygène et les différentes réactions du transfert des électrons (énergie) produisent en performance les espèces réactives d'oxygène. Les ions métalliques présents dans l'organisme ex ; fer cuivre, peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles (**Poprac *et al.*, 2017**).

I-2-2- Sources exogènes

Les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou certains médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense ainsi que le tabagisme. (**Kalam *et al.*, 2015**).

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) (**Tableaux 3 et 4**) (**Weidinger et Kozlov, 2015**).

Tableau 3 : Espèces réactives d'oxygène d'intérêt biologique

Espèces réactives	Symbole	Réactivité
Radical superoxyde	O_2^{\bullet}	Généré dans les mitochondries et dans le système cardiovasculaire.
Radical hydroxyle	HO^{\bullet}	Très réactif, généré lors d'une surcharge de fer

Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Formé dans notre corps par un grand nombre de réactions et produit des espèces puissantes comme HO^\bullet
Radical peroxy	ROO^\bullet	Réactif et formé à partir de lipides, de protéines, d'ADN, de sucres etc. pendant les dommages oxydatifs
Hydro-peroxyde organique	$ROOH$	Réagit avec des ions métalliques transitoires pour produire des espèces réactives
L'oxygène singulet	1O_2	Très réactif, formé lors de la photosensibilisation et certaines réactions chimiques
Ozone	O_3	Peut réagir avec diverses molécules pour former l'oxygène singulet 1O_2

Tableau 4 : Espèces réactives d'azote d'intérêt biologique

Espèces réactives	Symbole	Réactivité
Oxide nitrique	NO^\bullet	Neurotransmetteur et régulateur de pression sanguine, peut produire des oxydants puissants pendant les états pathologiques
Peroxynitrite	$ONOO^-$	Formé de NO^\bullet et superoxyde, hautement réactif
Acide peroxynitrique	$ONOOH$	Forme protonée de $ONOO^-$
Dioxyde d'azote	NO_2	Formé lors de la pollution par le dioxyde atmosphérique

On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires (Valko *et al.*, 2016 ; Lushchak., 2014). La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où il se trouve (Kehrer *et al.*, 2015).

II- Stress oxydatif

II-1-Définition

Le stress oxydant peut être défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue en radicaux libres, ou une diminution de la capacité de défenses antioxydantes (Sies 2015 ; Sies 2018). Ce déséquilibre peut survenir suite à l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyper-LDLémie, hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme...) (Favier 2003).

II-2-Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de macromolécules biologiques (ADN, protéines, lipides et glucides), et des lésions secondaires

dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés lors de l'oxydation de ces macromolécules (Therond 2006 ; Mahjoub et Masrour-Roudsari, 2012).

II-2-1- Altérations de la molécule d'ADN

L'oxydation de la molécule d'ADN par les radicaux libres peut induire des lésions simples voir importantes et dangereuses pour la cellule à savoir : des lésions isolées des bases azotées ou des cassures simples (SSB), des lésions complexes (les cassures du double brin) et d'autres lésions (Kryston *et al.*, 2011 ; Nassour 2015 ; Sies 2015).

Les radicaux libres peuvent aussi altérer le fonctionnement des protéines qui entrent en contact avec l'ADN (histones, enzymes et facteurs de la réplication et de la transcription, enzymes des pontages des protéines) (Corne 2010 ; Silerme 2014), comme ils peuvent attaquer la liaison entre les bases azotées et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sur celui même, créant une coupure de chaîne simple brin (Favier 2003).

Les dommages oxydatifs dans l'ADN sont réparés principalement par la voie de réparation de l'excision de base, les cellules activent leurs points de contrôle du cycle cellulaire, ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et empêche la réplication des dommages et de l'ADN défectueux (Barzilai et Yamamoto, 2004 ; Scott *et al.*, 2014). Cependant l'accumulation des dommages dans la molécule d'ADN résultant d'une mauvaise réparation ou d'une réparation incomplète peut entraîner une mutagenèse et, par conséquent, une transformation en cellules cancéreuses, en particulier si le dommage est associé à une voie apoptotique déficiente (Whitaker *et al.*, 2017 ; Kabzinski *et al.*, 2016).

II-2-2- Oxydation des protéines

Les radicaux libres peuvent entrer en réaction avec certains acides aminés libres ou avec leur résidus. Les réactions typiques entre ces derniers comprennent l'addition ou le transfert d'électrons et l'abstraction d'hydrogène (Štefanić *et al.*, 2009). Ces réactions induisent ainsi des modifications au niveau de leur structure et par conséquent la modification de leur activité (enzymatique, de signalisation ou de transport) (Davies 2016).

L'oxydation des protéines peut entraîner la conversion de certains résidus d'acides aminés en dérivés carbonylés suite à : l'hydroxylation des groupes aromatiques et des chaînes latérales d'acides aminés aliphatiques, la sulfoxydation des résidus methionine et la chloration des groupes aromatiques et des groupes amino-primaires (Liu *et al.*, 2017). Ce qui entraîne le clivage de la chaîne polypeptidique et la formation d'agrégats protéiques réticulés. De plus, des groupes fonctionnels de protéines peuvent réagir avec des produits d'oxydation d'acides

gras polyinsaturés et avec des dérivés glucidiques (glycation/ glycoxydation) pour produire des dérivés inactifs (**Stadtman et Levine, 2003**).

Le niveau de protéines oxydées augmente avec le vieillissement et dans le cas de certaines maladies liées à l'âge. Cependant, l'accumulation de protéines oxydées est une fonction complexe qui dépend du taux de formation de ROS, des niveaux d'antioxydants et la capacité d'élimination par protéolyse des formes oxydées. Elle dépend également des facteurs génétiques et de styles de vie individuels (**Stadtman 2002**).

II-2-3- Oxydation des lipides

Les ROS induisent la peroxydation des composants de la membrane cellulaire, en particulier les lipides membranaires (phospholipides et acides gras polyinsaturés) (**Matsuda et al., 2012**). Les ROS détachent l'hydrogène à partir de la chaîne d'acide gras polyinsaturé, ceci induit la réduction du ROS en eau et la transformation de l'acide gras en un radical libre. Ce radical s'attache à la charge des molécules d'oxygène ce qui favorise la génération du radical peroxyde. Le radical libre peroxyde a la capacité de détacher les atomes d'hydrogène d'autres acides gras polyinsaturés pour générer des peroxydes lipidiques. Comparés aux lipides, les peroxydes lipidiques sont moins stables et peuvent se décomposer en radicaux libres. Ce processus est accéléré par la présence d'ions de fer et de cuivre (Fe^{2+} , Cu^{2+}) (**Lorrain et al., 2012; Getzoff et al., 1983**). La forte réactivité des radicaux peroxydes avec les molécules lipidiques, ainsi que l'instabilité chimique des peroxydes lipidiques, contribuent à une rétroaction positive impliquant ainsi la peroxydation rapide de la majorité des lipides de la membrane cellulaire. D'autres constituants de la membrane cellulaire, comme les acides aminés ou les protéines, sont également impliqués dans le processus de peroxydation lipidique, mais avec une vitesse assez ralentie (**Matsuda et al., 2012 ; Kwiecien et al., 2010**).

Les peroxydes lipidiques sont métabolisés par la voie de β -oxydation en malondialdéhyde (MDA) et en 4-hydroxynonéal (4-HNE) (**Esterbauer et al., 1991**), qui sont responsables d'une pléthore d'événements pathophysiologiques cellulaires à savoir :

- ❖ La modification des propriétés des membranes cellulaires en insérant des groupes polaires dans les molécules de phospholipides situées à l'intérieur de la bicouche lipidique ; de cette façon, la partie interne lipidique de la membrane devient hydrophobe et plus perméable (**Kwiecien et al., 2010**).
- ❖ Les altérations du potentiel de la membrane vers une dépolarisation et l'inhibition de l'activité des transporteurs de protéines, entraînant une perturbation du transport actif à travers la membrane (**Kwiecien et al., 2014 ; Kourie 1998**).

- ❖ Les produits de la peroxydation lipidique découplent la phosphorylation de la chaîne respiratoire au sein des mitochondries, résultant d'une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne pour les protons. Ce mécanisme crée l'équilibre des concentrations de protons entre les deux côtés de la membrane mitochondriale interne (Nagano *et al.*, 2012).
- ❖ Les produits aldéhydiques de la peroxydation lipidique, tels que le MDA, réagissent avec les groupes amines de la protéine membranaire pour donner des bases de Schiff et, par conséquent, la membrane cellulaire devient plus rigide (Kwiecien *et al.*, 2002).
- ❖ Le 4-HNE modifie la croissance cellulaire et présente des propriétés de signalisation. Il se diffuse facilement dans les tissus en formant des lésions distantes et, de la même façon que le MDA, il peut réagir avec les groupes thiol et amine des protéines cellulaires, entraînant des perturbations métaboliques cellulaires. D'autres propriétés importantes du 4-HNE sont la stimulation de la chimiotaxie des neutrophiles, qui facilitent la destruction tissulaire dépendante des ROS, résultant de la génération intracellulaire de ROS (Kwiecien *et al.*, 2014).

II-3-Conséquences pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydant provoque des dommages sur tout l'organisme (Sivanandham 2011), en accélérant le vieillissement et l'apparition de plusieurs maladies cardiovasculaires (Siti *et al.*, 2015 ; Csányi et Miller, 2014), neurodégénératives (Kim *et al.*, 2015 ; Blesa *et al.*, 2015; Sarrafchi *et al.*, 2016 ; Tramutola *et al.*, 2017), le cancer (Thanan *et al.*, 2014; Sosa *et al.*, 2013), le diabète (Rani *et al.*, 2016), l'hypertension (Montezano *et al.*, 2015), l'insuffisance rénale (Tucker *et al.*, 2015), des maladies pulmonaires (Duecker *et al.*, 2018; Can *et al.*, 2015), l'obésité (Furukawa *et al.*, 2017) et l'asthme (Aldakheel *et al.*, 2016) (Figure 3).

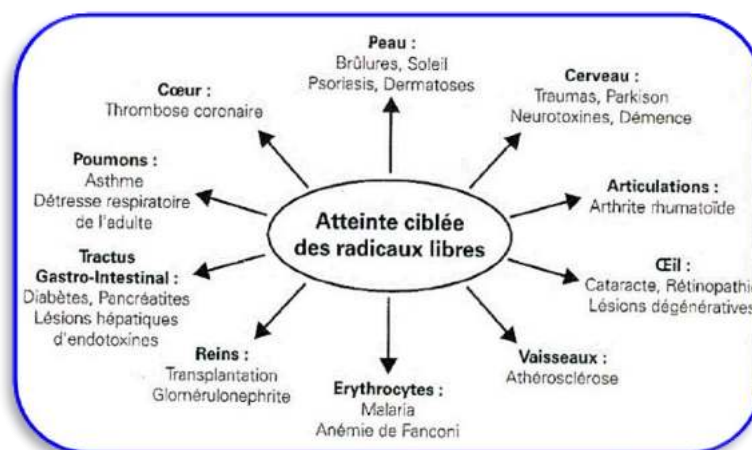


Figure 3 : Atteintes ciblées des radicaux libres (Lafon, 2008).

III-Antioxydants et systèmes de défense

Pour faire face aux attaques dues aux espèces réactives d'oxygène, les organismes ont développé des systèmes d'action anti-oxydante qui visent à éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation et à induire la synthèse des antioxydants ainsi qu'à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

III-1-Définition

Toute substance capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation cellulaire est considérée comme un antioxydant. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques et de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Carocho et Ferreira, 2013 ; Godic *et al.*, 2014).

III-2- Mode d'action

Les antioxydants peuvent agir en (Pisoschi et Pop, 2015) :

- ❖ Réduisant ou en dismutant les ERO
- ❖ Piégeant les ERO pour former un composé stable
- ❖ Séquestrant les métaux de transition libres
- ❖ Générant du glutathion (GSH)

III-3- Classification des antioxydants

L'homéostasie rédox de la cellule est assurée par son système complexe de défense antioxydante endogène. Ce système comprend des enzymes antioxydantes endogènes comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et des composés non enzymatiques comme le glutathion, les protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine) et les piégeurs de bas poids moléculaire, comme l'acide urique, le coenzyme Q et l'acide lipoïque (Poljsak *et al.*, 2013).

III-3-1-Les antioxydants primaires

a- Les superoxydes dismutases (SOD)

C'est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée éliminé à son tour par deux autres enzymes (la catalase et la glutathion peroxydase).

Trois types de superoxydes dismutases peuvent être rencontrés dans les tissus des mammifères qui diffèrent par leur localisation : la SOD₁ cytosolique (Cu et Zn dépendante), la SOD₂ mitochondriale (Mn-dépendante) et la SOD₃ extracellulaire (**Pisoschi et Pop, 2015; Surai 2015 ; Azadmanesh et Borgstahl, 2018**).

b- La catalase

C'est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et les hépatocytes. Elle catalyse la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (généralement produit par la SOD) en eau (**Glorieux et al., 2015; Kevil 2017**).

c- La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi détoxifier d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (**Speeckaert et al., 2018**) (**Figure 4**).

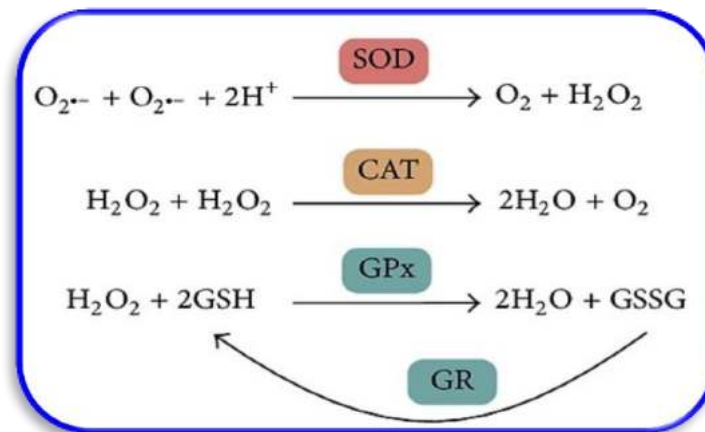


Figure 4 : Réactions catalysées par les systèmes antioxydants primaires (**Peng et al., 2014**)

d- Les chélateurs de métaux

Plusieurs protéines sériques circulantes peuvent prendre en charge les ions métalliques libres potentiellement toxiques (Fer et Cuivre). Elles agissent comme des chélateurs et maintiennent les ions métalliques sous leur forme inactive par rapport à la combinaison possible avec le peroxyde d'hydrogène. Il s'agit de la transferrine et de la lactoferrine pour le fer et la céruléoplasmine pour le cuivre (**Junior et al., 2015 ; Sigel 2017 ; Gull et al., 2017**).

III-3-2-Les antioxydants secondaires

a- *L'acide ascorbique (vitamine C)*

L'acide ascorbique (AA), est une vitamine hydrosoluble connue par ses propriétés réductrices et pour son utilisation à grande échelle en tant qu'agent antioxydant dans les aliments et les boissons; il est également important à des fins thérapeutiques. L'acide ascorbique joue un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire, dans la cicatrisation, l'ostéogenèse, la détoxification de l'organisme, l'absorption du fer, la biosynthèse du collagène, la prévention de la coagulation des vaisseaux sanguins et beaucoup d'autres processus métaboliques (**Kamiloglu *et al.*, 2016; Pescheux 2016 ; Pehlivan 2017 ; Bivona *et al.*, 2017 ; Granger et Eck, 2018**).

L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés, son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH⁻) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH•) stabilisé par résonance. Il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles ·OH, mais aussi avec les radicaux superoxydes O₂• et les radicaux peroxydes RO₂•. En réagissant avec ces divers oxy radicaux, l'ascorbate est oxydé en radical ascorbyle (Asc•-) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).

L'ascorbate possède la propriété de réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l'α-tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Asc•-) (**Barrouin-Melo *et al.*, 2018**).

b- *La vitamine E ou α-tocophérol*

La vitamine E est un antioxydant liposoluble protecteur des structures membranaires et des lipoprotéines. Elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques (RO₂) qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice, celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde.

Bien que la concentration d'α-tocophérol soit relativement faible *in vivo*, le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs (dont le plus important est l'ascorbate), lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (**Pisoschi et Pop, 2015; Kamal-Eldin et Budilarto, 2014**) (**Figure 5**).

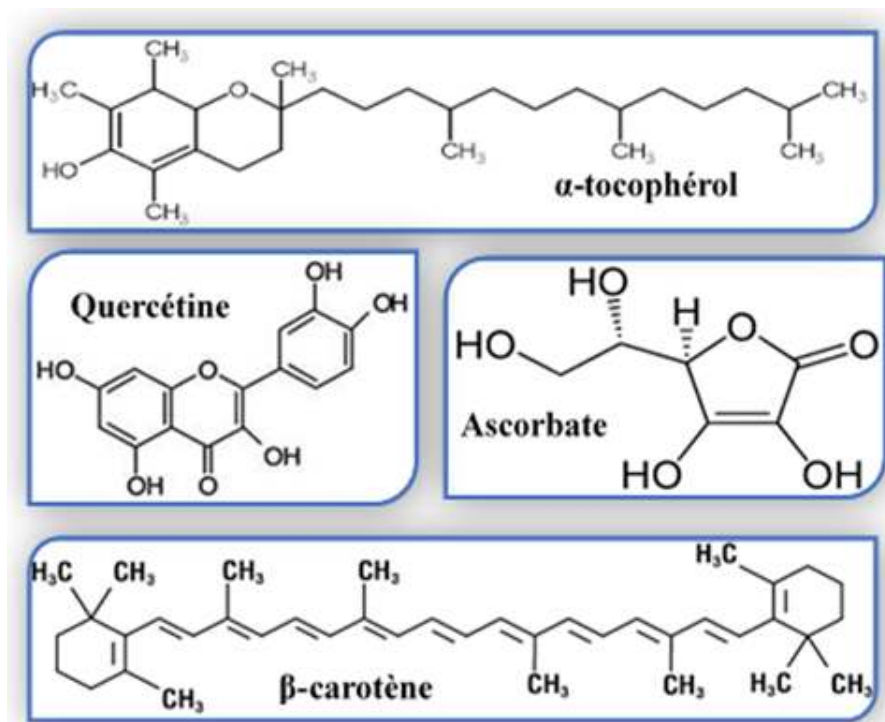
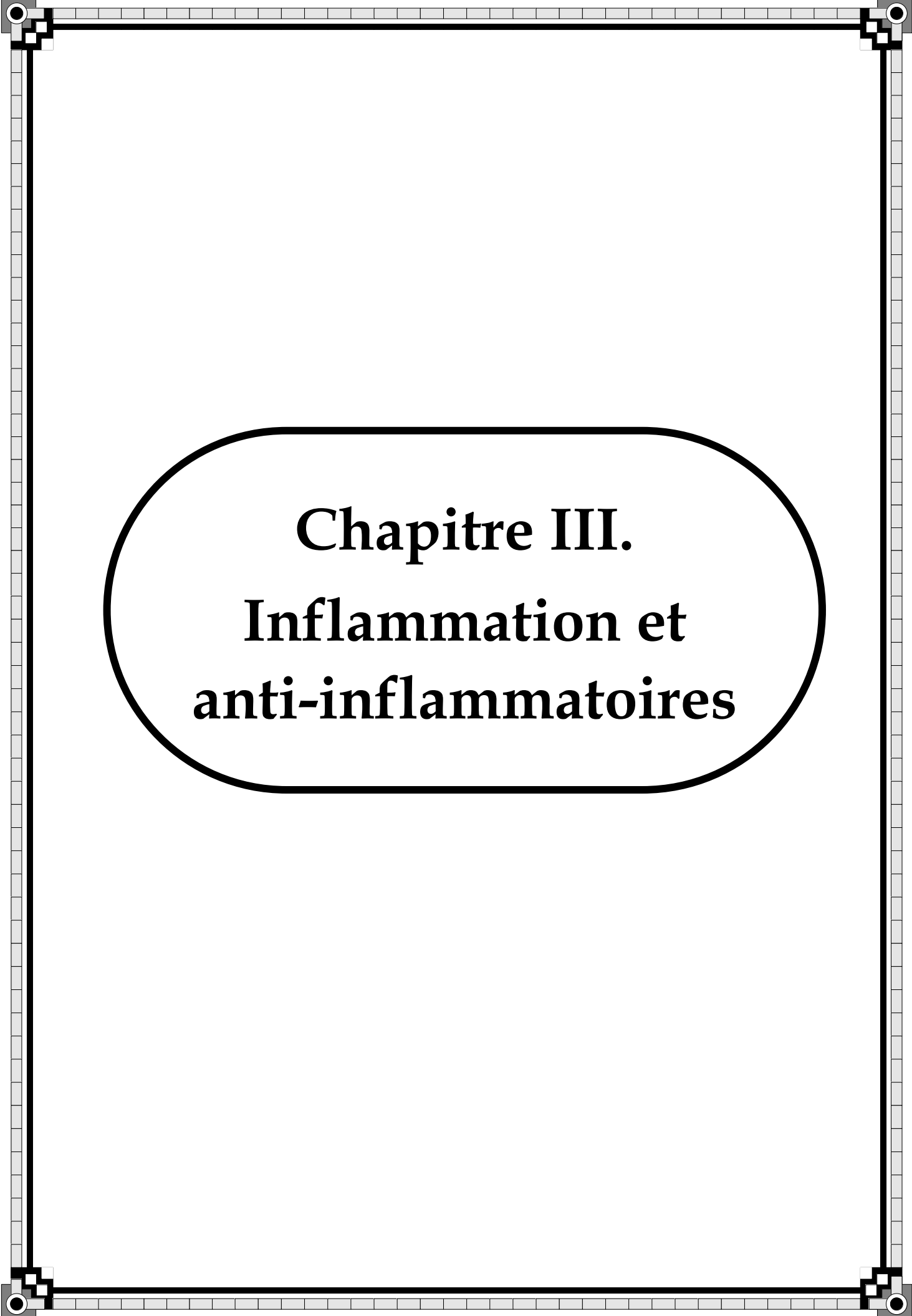


Figure 5 : Antioxydants secondaires.

a- Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes RO_2 . Ils sont susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (De Beer *et al.*, 2017 ; Nichols et Katiyar, 2010).

Les flavonoïdes aussi sont connus par leur activité antioxydants. En effet, ils peuvent agir de différentes façons dans la régulation du stress oxydatif. Ces molécules peuvent capter directement les espèces réactives de l'oxygène, elles ont aussi le pouvoir de chélation de métaux de transition (cuivre et fer) et la capacité d'inhiber certaines enzymes responsables de la production des ROS (cyclooxygénase et lipoxygénase) (Alrawaiq et Abdullah, 2014).



Chapitre III.
Inflammation et
anti-inflammatoires

I- Inflammation

I- 1- Définition

La réponse inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre des agressions qui entraîne une altération tissulaire ou une infection. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (Ashley *et al.*, 2012).

I-2- Etiologies

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples :

- ❖ Agent infectieux : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons)
- ❖ Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations
- ❖ Agents chimiques : caustiques, toxines, venins
- ❖ Corps étrangers : exogènes ou endogènes
- ❖ Défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie
- ❖ Agression dysimmunitaire (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité)

I-3- Acteurs et déroulement de la réaction inflammatoire

I-3-1- La composante cellulaire

a- Les granulocytes

Les granulocytes sont les cellules les plus nombreuses dans le sang périphérique. Ils regroupent (Davoine et Lacy, 2014):

- ❖ **Les polynucléaires neutrophiles (PNN)**

Considérés comme les cellules pivots de l'inflammation aigue car elles favorisent la phagocytose des éléments étrangers et la dégranulation. Les PPN sont également capables de synthétiser un grand nombre de médiateurs inflammatoires lipidiques (leucotriènes (LT) et prostaglandines (PG)), et cytokiniques (les -17-interleukines IL-1 β et IL-6 ou le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)).

❖ Les polynucléaires éosinophiles

Résident essentiellement au niveau tissulaire. Ils libèrent différents médiateurs inflammatoires comme le Platelet Activating Factor (PAF) et les leucotriènes B₄ (LTB₄), une grande variété de cytokines pro-inflammatoires [IL-1, IL-6, Interféron- γ (IFN- γ), TNF- α] ainsi que des chimiokines comme l'IL-8. Au niveau pathologique, les éosinophiles ont été impliqués dans les lésions tissulaires liées à l'asthme allergique.

❖ Les polynucléaires basophiles

Partagent les aspects et certaines caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des éosinophiles. Ils sont impliqués dans l'initiation du phénomène inflammatoire et le recrutement des cellules immunes. Plus tardivement, ils constituent également une source de cytokines (IL-4 et IL-13).

b- Les monocytes et les macrophages

Les monocytes et les macrophages sont considérés comme les cellules pivots de l'inflammation chronique. Ils jouent un rôle prépondérant dans la destruction tissulaire et l'entretien du processus inflammatoire.

Les monocytes représentent 2 à 10 % des leucocytes. Ce sont des cellules jeunes qui possèdent toutes les activités migratoires, chimiotactiques, phagocytaires et sécrétoires nécessaires à leur fonction. A terme, ils migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages tissulaires multifonctionnels.

Les monocytes et les macrophages sont des cellules phagocytaires. Ils libèrent des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes hydrolytiques ou des protéases qui contribuent à la destruction d'éléments étrangers. Ils interviennent particulièrement dans l'amplification de l'inflammation par une libération massive de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12), de facteurs chimiotactiques (IL-8), de prostaglandines ou de leucotriènes (essentiellement PGE₂ et LTB₄) qui contribuent au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires. Par une libération plus tardive de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ils contribuent à rétablir l'homéostasie au niveau du foyer inflammatoire.

c- Les lymphocytes

Il existe deux populations de lymphocytes (B et T) dont les rôles sont fondamentalement différents :

Les lymphocytes B sont essentiellement impliqués dans la synthèse d'anticorps et dans l'immunité spécifique.

Les précurseurs des lymphocytes T donnent naissance à des lymphocytes CD₄ qui jouent un rôle régulateur majeur dans la réponse immunitaire et inflammatoire par la libération de cytokines spécifiques et des lymphocytes CD₈ (cytotoxiques ou suppresseurs). Ces dernières exercent des fonctions cytotoxiques permettant d'éliminer les cellules infectées par les pathogènes intracellulaires. Leur implication dans les maladies inflammatoires est mal connue, et semble être mineure.

Différentes sous populations de lymphocytes T ont été identifiées. Les cellules T helper précurseurs (Thp) qui se différencient, selon l'environnement cytokinique en cellules de type Th₁ avec un profil de sécrétion pro-inflammatoire (IL-2, IFN- γ , TNF- α), Th₂ avec un profil anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) ou Th₃ (encore appelées Tr1 ou lymphocytes T régulateur), libérant du Transforming Growth Factor β (TGF- β) et de l'IL-10 (**Izcue et al., 2009**).

d- Les cellules endothéliales vasculaires

L'intégralité de l'appareil cardiovasculaire est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales (l'endothélium), régulant l'ensemble des étapes impliquées dans le transport trans-endothélial des leucocytes au niveau du foyer inflammatoire (**Pober et Sessa, 2007**).

I-3-2- Les médiateurs solubles de l'inflammation

a- Les médiateurs lipidiques de l'inflammation

Sous ce terme sont regroupés tous les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique, principalement les prostaglandines, les leucotriènes et le PAF. Cette voie métabolique est essentiellement catalysée par la phospholipase A2 (PLA2) de type IV, une enzyme permettant la libération de l'acide arachidonique à partir des lipides membranaires. Deux voies enzymatiques principales divergent ensuite pour conduire, à partir de l'acide arachidonique, à la formation de médiateurs lipidiques de l'inflammation biologiquement actifs : la voie des cyclooxygénases (COX) et celles des lipoxygénases (**Serhan^b et al., 2015**) (**Figure 6**).

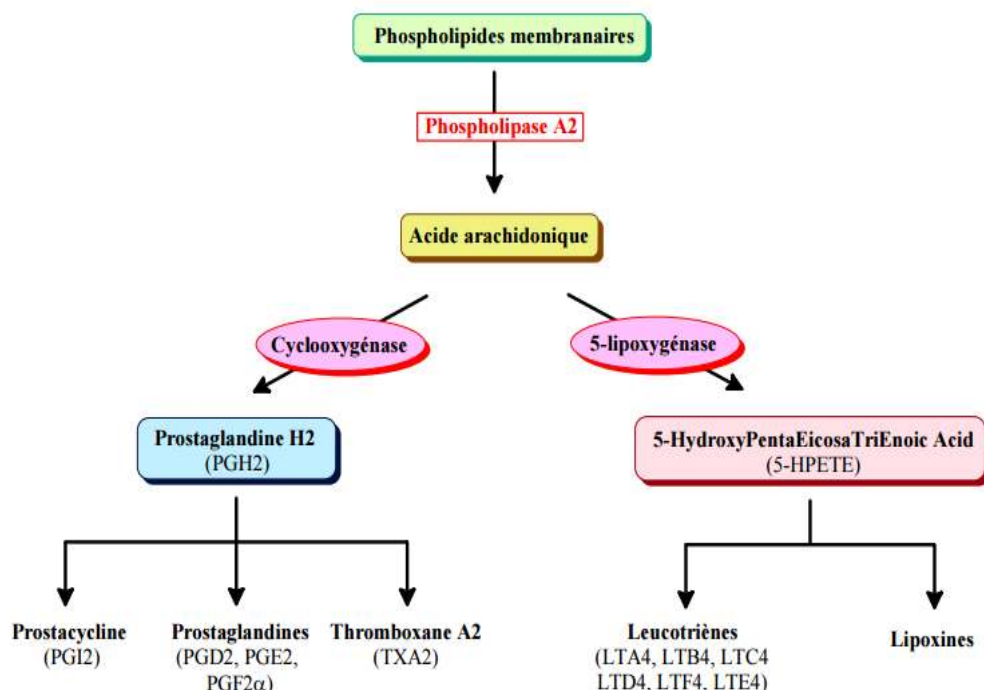


Figure 6 : Médiateurs lipidiques de l'inflammation (Bewaji *et al.*, 2013).

b- Les cytokines

Les cytokines constituent une famille de médiateurs pro-inflammatoires et immuno-régulateurs, sécrétées principalement par les cellules effectrices du système immunitaire. Il existe un très grand nombre de cytokines intervenant dans la régulation des processus inflammatoires. Le tableau 5 en présente quelques-unes parmi les plus importantes (Buckley *et al.*, 2014).

Tableau 5 : Sources et effets biologiques majeurs de quelques cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

Cytokine	Sources cellulaires majeures	Effets biologiques majeurs dans l'inflammation
TNF-α	Monocytes et macrophages, PNN, les lymphocytes T, mastocytes et les fibroblastes	<p>Induit la prolifération des lymphocytes, augmente le recrutement et l'activité phagocytaire des PNN ainsi que le métabolisme oxydatif par la libération d'espèces réactives de l'oxygène.</p> <p>In vivo, il est capable de stimuler la synthèse de diverses protéines comme certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-8, IFN-γ, TNF-α), la NO synthase inducible (iNOS) ou les métalloprotéases.</p> <p>En induisant l'expression de la COX, il stimule également la synthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation.</p>

INF-γ	Lymphocytes Th1 et B	Activation des macrophages, prolifération des lymphocytes B, inhibition de la prolifération des lymphocytes Th2
IL-1	Les mononucléaires phagocytaires stimulés, les PNN, les cellules endothéliales, les lymphocytes B et T, les fibroblastes ou encore les ostéoclastes	Stimulation des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T
IL-2	Lymphocytes Th1	Prolifération des lymphocytes T, libération de TNF- α , IL-1 β et IFN- γ par les leucocytes.
IL-4	Lymphocytes Th2	Inhibition de la libération des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages. Stimulation de la prolifération des lymphocytes T.
IL-6	Les lymphocytes T, les fibroblastes, les neutrophiles, les mastocytes et les éosinophiles, les phagocytes mononucléaires	La prolifération des lymphocytes T. Propriétés anti-inflammatoires : induction de la synthèse des glucocorticoïdes (GC) endogènes et inhibition de la production du TNF- α , sous la forme d'un rétrocontrôle négatif afin de limiter la réponse inflammatoire aiguë et pro-inflammatoire
IL-8	Les monocytes, les lymphocytes T, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les chondrocytes	Impliqués dans le recrutement des cellules immunes sur le site inflammatoire par chimiotactisme. Son activité induit une augmentation du chimiotactisme, l'expression de molécules d'adhésion, la dégranulation et l'augmentation du métabolisme oxydatif des PNN.
IL-10	Lymphocytes Th ₂ , Monocytes, macrophages	Inhibition de la libération des cytokines par les lymphocytes Th1, activité anti-inflammatoire générale.
IL-12	Monocytes, macrophages, Lymphocytes B	Libération d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th1.
IL-13	Lymphocytes T CD ₈	Régulation de l'activité des monocytes et macrophages, inhibition de la libération des cytokines inflammatoires
IL-15	Monocytes, macrophages	Prolifération des lymphocytes T
IL-17	Lymphocytes Th ₁	Production de métalloprotéases par les macrophages, Libération d'IL-6, IL-8 et PGE ₂ par les fibroblastes
IL-18	Monocytes, macrophages	Croissance, différenciation et activation des lymphocytes Th1, libération d'IL-8 par les fibroblastes synoviaux

I-4- Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique

I-4-1- inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, c'est une réponse physiologique complexe qui implique la participation des deux branches du système immunitaire : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Cette réponse de courte durée (quelques jours). Elle vise l'élimination de l'agent causal du dommage tissulaire et la réparation du tissu affecté (Serhan^a *et al.*, 2015).

L'inflammation aiguë est caractérisée par sa durée limitée dans le temps et par un rétablissement spontané, par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses et par une forte présence des polymorphonucléaires au niveau du foyer inflammatoire (**Serhan *et al.*, 2010**). Elle est dite non-spécifique lorsque l'évènement déclencheur de la réaction inflammatoire est rencontré pour la première fois par l'organisme, et qu'elle ne fait pas intervenir la « mémoire lymphocytaire ».

L'inflammation aiguë se déroule en trois phases (**Ryan et Majno, 1977 ; Buckley *et al.*, 2014**) (**Figure 7**):

✓ **La phase vasculaire**

Des modifications vasculaires visant l'augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire apparaissent au niveau du tissu enflammé. Ces modifications vasculaires permettent la migration des leucocytes hors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel et le déclenche de la phase cellulaire. Cette phase est associée aux signes suivants : douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction (**Stevens 2010**).

✓ **La phase cellulaire**

Les polynucléaires sont les premières cellules qui migrent vers le site enflammé (6 à 24 heures), un peu plus tard et après 24 à 48 heures les monocytes et les lymphocytes sont recrutés. Elles se déplacent alors directement vers l'agent causal de l'inflammation, guidées par un gradient de concentrations de substances dites chimio-attractantes.

La destruction de l'agent pathogène est donc assurée par les polynucléaires qui vont déclencher la phagocytose et la libération de différentes enzymes hydrolytiques (protéase, élastase et de collagénase...etc). Cependant, les macrophages vont nettoyer le foyer inflammatoire et éliminer les débris cellulaires et tissulaires (**Aggarwal *et al.*, 2014**).

✓ **La phase de résolution**

Les cellules endothéliales vont réparer l'endothélium grâce à diverses molécules (collagénase I ou III). Ainsi, les macrophages et les fibroblastes vont participer en produisant la fibronectine, la laminine et du collagène qui est l'élément clef de reconstruction (**Hartupee et Mann, 2016**).

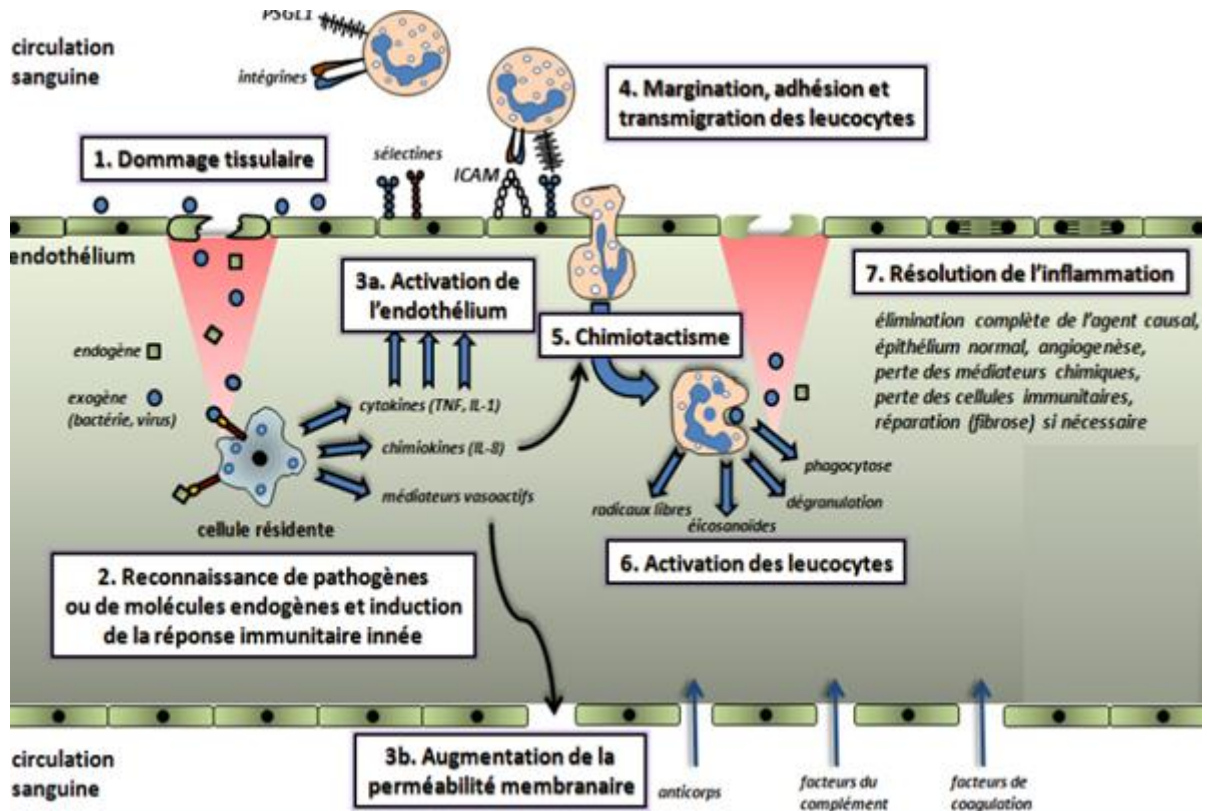


Figure 7 : Principales étapes de l'inflammation aiguë (Funaro *et al.*, 2009).

I-4-2- inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Une infiltration excessive des leucocytes au niveau du site inflammatoire et une mauvaise élimination de l'agent causal de l'inflammation sont à l'origine du développement de l'inflammation chronique (Dorward *et al.*, 2012).

On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques (Franceschi et Campisi, 2014 ; Fay *et al.*, 2016) :

- ❖ Les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus, ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- ❖ Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes et d'affections pour lesquelles les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (ex : hépatite auto-immune).

II-Les anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes).

II-1- Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase. Cependant, leur utilisation thérapeutique à long terme est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (**Takeuchi 2012 ; Cannon *et al.*, 2012**).

Ces effets indésirables sont généralement liés à l'inhibition des isoenzymes cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2). La COX-1 est constitutive et joue un rôle physiologique en maintenant l'intégrité des tissus, tandis que la COX-2 est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF α et l'interleukine1. L'apparition des AINS sélectifs du COX-2 appelé coxibs vient réduire les effets secondaires gastro-intestinaux, mais ils induisent un risque cardiovasculaire (**Day et Graham, 2016**).

II-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens

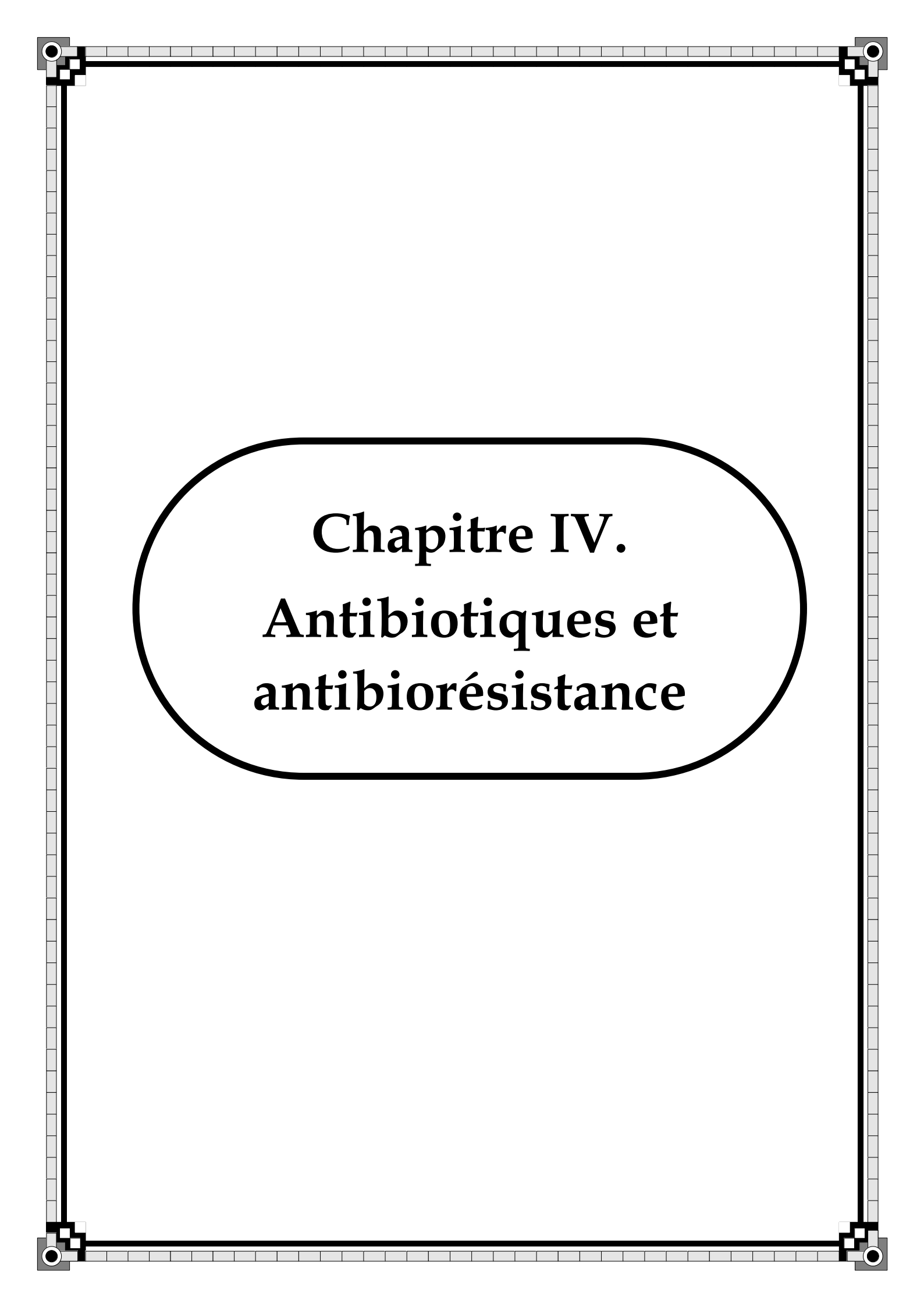
Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tels que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes. Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie (**Kessel *et al.*, 2014**).

Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aiguës tels que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tels que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (**Ramamoorthy et Cidlowski, 2016**).

II-3-Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes anti-inflammatoires regroupent des espèces de diverses familles dont les principes actifs présumés responsables de l'activité anti-inflammatoire sont de nature chimique variée (polyphénols, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes ...). La plupart de ces métabolites agissent en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes.

Plusieurs études expérimentales ont rapporté les effets immunomodulateurs sur l'immunité humorale et cellulaire des composés phénoliques (**Martin et Bolling, 2017 ; Thomas *et al.*, 2017**), flavonoïdes (**Kim *et al.*, 2004 ; Moore *et al.*, 2017**), saponines (**Thao *et al.*, 2017 ; Zhou *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2017**), alcaloïdes (**Li *et al.*, 2017 ; Liu *et al.*, 2017**).



Chapitre IV.
Antibiotiques et
antibiorésistance

I- Antibiotiques

I-1-Définition

Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, des dérivés semi-synthétiques ou des produits entièrement synthétiques capables d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Sanchez 2015).

I-2-Mode d'action des antibiotiques

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. (Figure 8) (Asselineau *et al.*, 1973). Les antibiotiques peuvent agir sur :

❖ La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Trois modes d'action sont utilisés par les antibiotiques pour inhiber la biosynthèse du peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire induisant des nouvelles bactéries ne pouvant plus se protéger, ce qui entraîne ainsi une lyse bactérienne.

- ✓ Inhibiteurs de la transpeptidase.
- ✓ Inhibiteurs de la polymérisation du peptidoglycane.
- ✓ Inhibiteurs de la formation d'acide N-Acétyle Muramique.

❖ La membrane cellulaire

Les antibiotiques peuvent réagir avec la membrane cellulaire en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

❖ L'ADN

Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et

la cellule meurt par carence en bases nucléiques, les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase.

❖ Le ribosome bactérien

L'antibiotique dans ce cas entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales. Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamycine et amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes.

Les phénicolés (chloramphénicol et thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline et doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique en se fixant sur la petite sous-unité.

Les macrolides et les kétolides (erythromycine et azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (Nilius et Ma, 2002). La puromycine copie l'extrémité d'un ARN_t, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique.

❖ Autres

En agissant en tant qu'antimétabolites bactériens au niveau des étapes de métabolisme intermédiaire des bactéries.

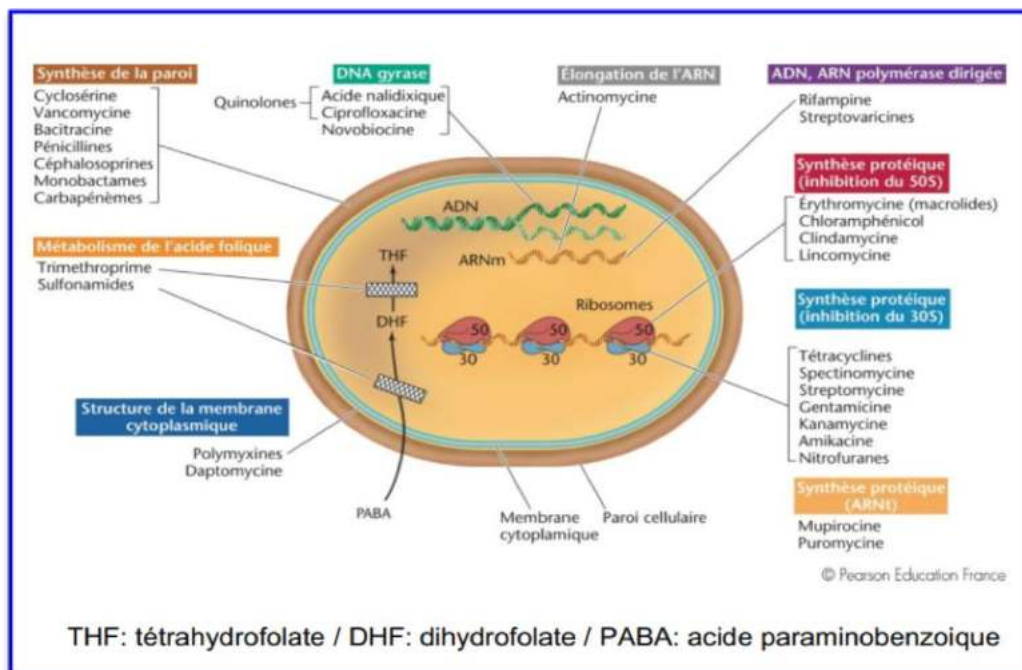


Figure 8 : Mode d'action des antibiotiques (Bbosa *et al.*, 2014)

I-3-Toxicité des antibiotiques

Un antibiotique, comme tout médicament, expose au risque d'interaction médicamenteuse en réduisant ou augmentant l'effet d'autres traitements ainsi qu'au risque d'effets indésirables. Ceux-ci dépendent de la famille chimique (pénicillines, céphalosporines, fluoroquinolones et macrolides) ou de la molécule elle-même (moxifloxacin, érythromycine, amoxicilline et vancomycine) et peuvent être ou non réversibles sur l'appareil digestif et rénale (**Bruniera et al., 2015 ; Lu et al., 2014**).

D'autres effets secondaires non désirés sont liés à l'activité antimicrobienne elle-même : l'antibiotique est par son impact sur la flore bactérienne favorise la prolifération de certaines espèces qui seront à l'origine d'infections secondaires (**Gardiner et al., 2015**). Les colites pseudomembraneuses à *Clostridium* sont liées à l'utilisation de certains antibiotiques (lincosamides, amoxicilline associée à l'acide clavulanique, fluoroquinolones, notamment la moxifloxacin pour la souche virulente de ribotype 027, des céphalosporines de troisième génération et l'imipénème) (**Aldeyab et al., 2009**).

II-Résistances aux antibiotiques

La résistance bactérienne est définie comme la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides censés les contrôler ou les tuer (**Mégraud 2017**).

II-1-Types de résistance bactérienne

II-1-1- La résistance naturelle

La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce c'est ainsi que, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux β -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (**Wellington et al., 2013**).

II-1-2- La résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (**Hershberg 2017**).

II-2- Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques

Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance développés par les bactéries en réponse à la pression de sélection ATB. Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries (Blair *et al.*, 2015) (Figure 9).

II-2-1-Mécanismes d'inactivations enzymatiques de l'antibiotique

Ce mécanisme est le plus fréquent et concerne toutes les classes majeures d'antibiotiques. Des enzymes, produites par les bactéries, inactivent l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant (Vega et Gore, 2014).

II-2-2-Modification de la pénétration des antibiotiques

Cette résistance concerne surtout les bactéries à Gram négatif, et entraîne une diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible (Singh *et al.*, 2016).

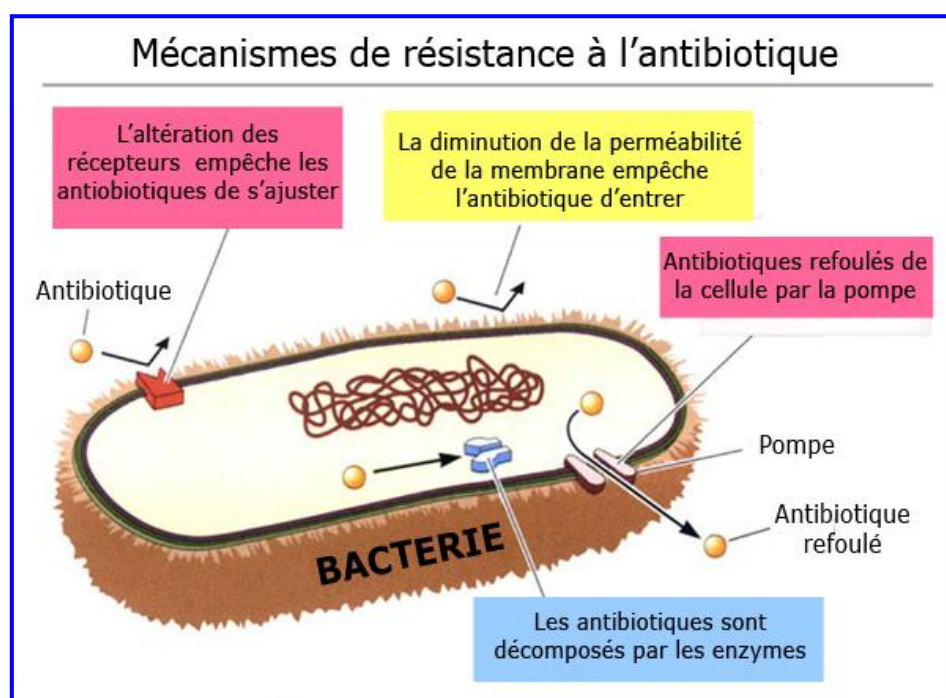


Figure 9 : Mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques (Singh *et al.*, 2014).

II-2-3- Résistance par mécanisme d'efflux actif

Il s'agit d'un système actif reposant sur la présence de protéines particulières jouant le rôle de pompe permettant l'expulsion des molécules nocives pour la bactérie, dont les

antibiotiques, dès qu'ils pénètrent dans la cellule bactérienne. Cela entraîne une diminution de la quantité d'antibiotiques atteignant la cible (**Cattoir 2004**).

II-2- 4- Résistance par modification ou substitution de la cible

Après l'entrée dans la bactérie, l'antibiotique doit en général se fixer sur sa cible pour agir. Si cette cible est modifiée, cela entraîne une diminution de reconnaissance par l'antibiotique et une diminution de l'efficacité. La bactérie acquiert une résistance qui souvent s'étendra à toute une famille d'antibiotiques. Ce mécanisme est observé avec de nombreux antibiotiques et de nombreuses bactéries (**Hughes et Andersson, 2017**).



Chapitre V.
Les saponines

I- Généralités

Les saponines constituent une vaste classe de métabolites secondaires naturels ayant une nature hétérosidique complexe, appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Ils sont principalement produits par les végétaux (*Scabiosa stellata*, *Polygala japonica*, *Acanthopanax koreanum*, *Terminalia avicennioides* et *Ficus polita*) (Lehbili^b *et al.*, 2018; Quang *et al.*, 2018 ; Thao *et al.*, 2017 ; Usman *et al.*, 2018), mais aussi par plusieurs organismes marins (*Cucumaria frondosa*, *Psolus eximius*, *Thyone aurea*, et *Stichopus mollis*) (Riguera 1997; Girard *et al.*, 1990; Bonnard et Rinehart, 2004) et certaines bactéries (Yoshiki *et al.*, 1998).

II- Structure

Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives (formation des solutions aqueuse moussantes). Dû principalement à leurs caractères amphiphiles résultant de la présence d'une partie hydrophile (osidique) et d'une génine hydrophobe (sapogénine) (Oleszek et Marston, 2013).

L'aglycone hydrophobe peut avoir une structure stéroïdienne ou triterpénique selon laquelle les saponines sont classées (Vincken *et al.*, 2007).

Les saponosides triterpéniques possèdent un squelette à 30 atomes de carbone. Ce sont des dérivés des noyaux pentacycliques (oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane), ou tétracycliques (dammarane, cucurbitane, lanostane et cycloartane). Les saponosides à génines stéroïdiques possèdent un squelette de 27 atomes de carbone hexacyclique. Dérivés du noyau furostane et spirostane (Figures 10 et 11).

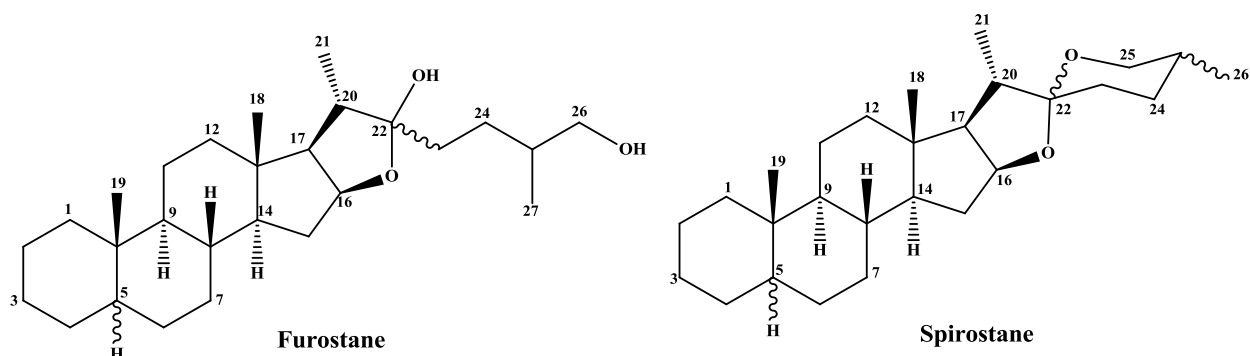


Figure 10 : Principaux squelettes stéroïdiques

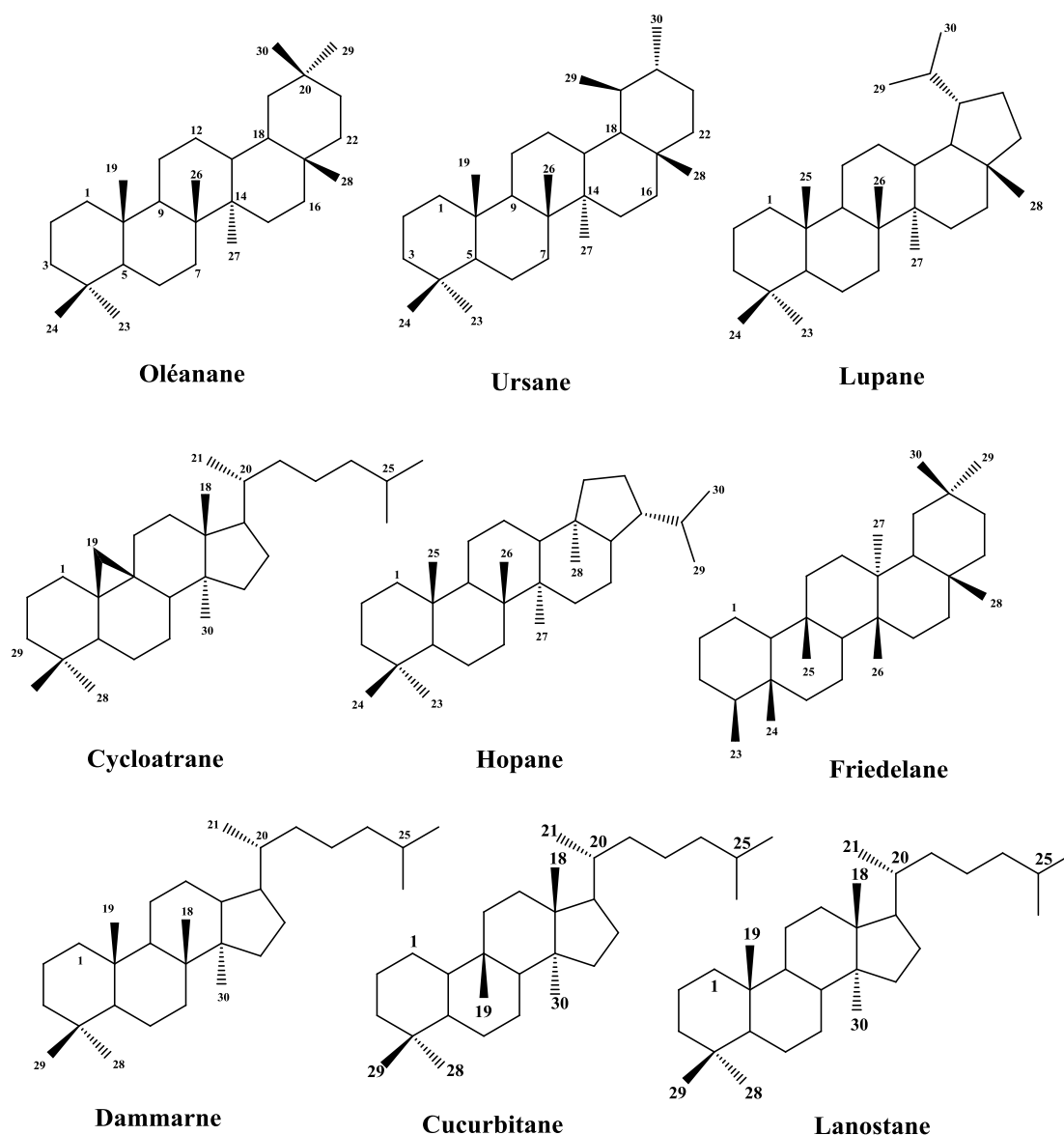


Figure 11 : Principaux squelettes triterpéniques

L'aglycone est lié à la partie osidique souvent composée des oses ou de leurs dérivés : D-glucose, L-rhamnose, D-galactose, acide D-glucuronique, L-arabinose, D-xylose ou le D-fucose, qui se lient entre eux pour former des chaînes osidiques droites ou ramifiées.

Ainsi, la grande complexité de la structure des saponosides provient de la variabilité de la structure aglycone (**Figure 11**), de la nature des chaînes polysaccharidiques et la position de l'attachement des oses sur l'aglycone (**Francis *et al.*, 2002**).

III- Biosynthèse

Les saponosides peuvent avoir des origines biosynthétiques variées. La biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée à partir de l'oxydosqualène (30 carbones),

suivi par l'assemblage des différentes parties osidiques par des réaction enzymatiques catalysées par les glycosyltransférases et les glycosidases (**Haralampidis et al., 2002**).

Des modifications successives incluant l'oxydation, la méthylation l'estérification et certains réarrangements, peuvent ainsi induire les variations structurales et la grande complexité observée à l'intérieur de cette classe de métabolites secondaires (**Augustin et al., 2011**).

IV- Propriétés biologiques des saponosides

IV-1- Anti-inflammatoires

Les saponines triterpénoïdes sont reconnues par leurs effets anti-inflammatoires en agissant de différentes manières, certaines diminuent d'une façon dose-dépendante la production des médiateurs inflammatoires, et inhibent la libération des cytokines inflammatoires (TNF- α et IL₆) (**Yao et al., 2014**). D'autres inhibent la production d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine E₂ (PGE₂) en supprimant l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (**Wu et al., 2017**).

Certaines saponines provoquent un effet anti-inflammatoire dans les microglies en modulant l'AMP_K et ses voies de signalisation en aval (**Lee et al., 2015**) et inhibent fortement la production de l'IL₁₂ par des cellules dendritiques stimulées préalablement par un lipopolysaccharide (**Thao et al., 2017**).

Les saponines constituent ainsi des agents immunomodulateurs bioactifs avec des propriétés anti-inflammatoires (**Yu et al., 2017**).

IV-2- antioxydantes et neuroprotectrices

Selon Nguyen et ses collaborateurs (**2017**), l'optimisation des conditions d'extraction des saponines augmente la capacité antioxydante des extraits végétaux. Les saponines de *Dioscorea nipponica* augmentent l'activité de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase d'une manière significative (**Zhou et al., 2017**).

Les saponines isolées de l'espèce *Panax notoginseng* possèdent des activités antioxydantes et neuroprotectrices (**Zhou et al., 2014**).

Les saponines des fruits de *Solanum anguivi* ont des activités antidiabétiques, antihypercholestérolémiques, antihypertriglycéridémiques et antiperoxydantes médiées par leurs propriétés antioxydantes (**Elekofehinti et al., 2015**).

IV-3- Propriétés hémolytiques

Les saponines sont des composés reconnus par leurs activités hémolytiques, non seulement la complexité des parties polysaccharidiques, mais aussi les types et les configurations stéréochimiques des groupes fonctionnels à différentes positions, ainsi que les types de squelettes, sont des caractéristiques structurales importantes affectant le potentiel hémolytique.

La relation structure-activité a été établie en comparant les caractéristiques structurales des fractions aglycone et des sucres entre différents types de saponines. La majorité des sapogénines de type oléane ont des effets hémolytiques plus forts que ceux des types ursane et dammarane. Ainsi, la présence de certaines fonctions dans les saponines, telles qu'un carboxyle (COOH) en position 28, un α -hydroxyl (α -OH) en position 16, et / ou un β -hydroxyl (β -OH) en position 2, augmente le pouvoir hémolytique. Aussi, la présence d'un α -OH en position 2 ou d'un groupement hydroxyméthine (CH₂OH) aux positions 23 ou 24 était étroitement associée à une activité réduite (Vo *et al.*, 2017).

IV-4- cytotoxiques et antitumorales

L'activité cytotoxique a été rapportée pour de nombreuses saponines contre diverses lignées cellulaires. En effet, ce pouvoir cytotoxique est associé aux caractéristiques tensioactives dues à leur structure chimique et la nature amphiphile. Mais les saponines peuvent exercer leurs propriétés anticancérigènes par différents mécanismes : la cytotoxicité directe, les effets immunomodulateurs, la normalisation de la prolifération cellulaire induite par les cancérogènes et l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose ainsi que l'inhibition de l'angiogénèse (Rao *et al.*, 1995 ; Koneri *et al.*, 2017).



**Partie
expérimentale**



Chapitre I.

Matériel et méthodes



Partie biologique

I- Matériel biologique

I-1- Matériel végétal

Le présent travail s'intéresse à la caractérisation phytochimique et l'évaluation biologique des extraits végétaux de la plante *Scabiosa stellata* L. provenant de la région de Bellezma (hautes montagnes des Aurès, Algérie). Cette plante a été collectée à la fin du mois de Mai en 2014 et identifiée par le Professeur Oudjhih Bachir (Laboratoire d'agronomie, Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université Batna 1).

I-2- Matériel animal

Des rats adultes, âgés de 2 à 3 mois de la variété Wistar, des deux sexes (mâles et femelles), ayant un poids corporel compris entre 150 et 200 g ont été utilisés.

Ces rats sont fournis par l'institut Pasteur d'Alger et élevés au niveau de l'animalerie du "Département de Biologie, Université de Batna, Algérie" dans des cages en plastique tapissées d'une litière renouvelable trois fois par semaine. Chaque cage porte cinq rats du même sexe, où la température moyenne varie entre 20-25°C, avec un cycle photopériodique de 12 heures de lumière/obscurité.

Ils sont nourris d'un aliment complet sous forme des granules composé de céréales, tourteaux de soja, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline et sel et un complexe oligo-vitamine.

I-3- Matériel bactérien

L'activité antibactérienne de la plante *Scabiosa stellata* est recherchée contre dix souches à différents genres et Gram. Parmi ces bactéries, trois sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection: (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442). Les autres sont des souches pathologiques isolées à partir des prélèvements des patients il s'agit de : *Streptococcus D*, *Enterococcus* sp, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*.

Toutes ces souches sont aimablement fournies par le Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire -Batna- (CHU), et le Laboratoire de Bactériologie établissement public hospitalier sanatorium -Batna-, conservées sur une gélose nutritive.

I-4- *Artemia salina* (L.)



Figure 12 : *Artemia salina* (L.)

Artemia salina (L.) est un arthropode aquatique primitif appartenant à la famille des Artémidés (**Figure 12**). Il a été signalé pour la première fois au lac Urmia en 1982 par un géographe iranien (**Asem 2008**).

Les adultes ont trois yeux et 11 paires de pattes. Leur couleur varie en fonction de la concentration de sel dans l'eau du vert au rouge. Leur corps est composé de trois segments : la tête, le thorax et l'abdomen.

Cette espèce présente un dimorphisme sexuel, les principales différences morphologiques entre les mâles et les femelles ont été observées à distance maximale entre les yeux composés, la longueur de la première antenne, la longueur totale (mâle adulte (8-10 mm), la femelle (10-12 mm)), diamètre de l'œil composé et longueur de l'abdomen.

Artemia salina, C'est une espèce endémique à la Méditerranée, mais on la retrouve sur tous les continents.

En outre, cette espèce ne vit que dans les lacs et les étangs à forte salinité, elle peut survivre même en cas d'une carence élevée en oxygène et en cas de forte salinité (jusqu'à 300g/l de sel par litre d'eau), cela est due à leur capacité de réduire la pression osmotique de l'hémolymphe par l'excrétion de NaCl contre le gradient de concentration.

Le cycle biologique d'*Artemia salina* est tout à fait particulier : après la fécondation, les premières étapes du développement conduisent normalement à la formation d'une blastula puis d'une gastrula. La gastrula poursuit son développement, en conditions normales, pour

conduire à la formation d'un adulte après passage par le stade prénauplius et nauplius (Nelis *et al.*, 1988) (Figure 13).

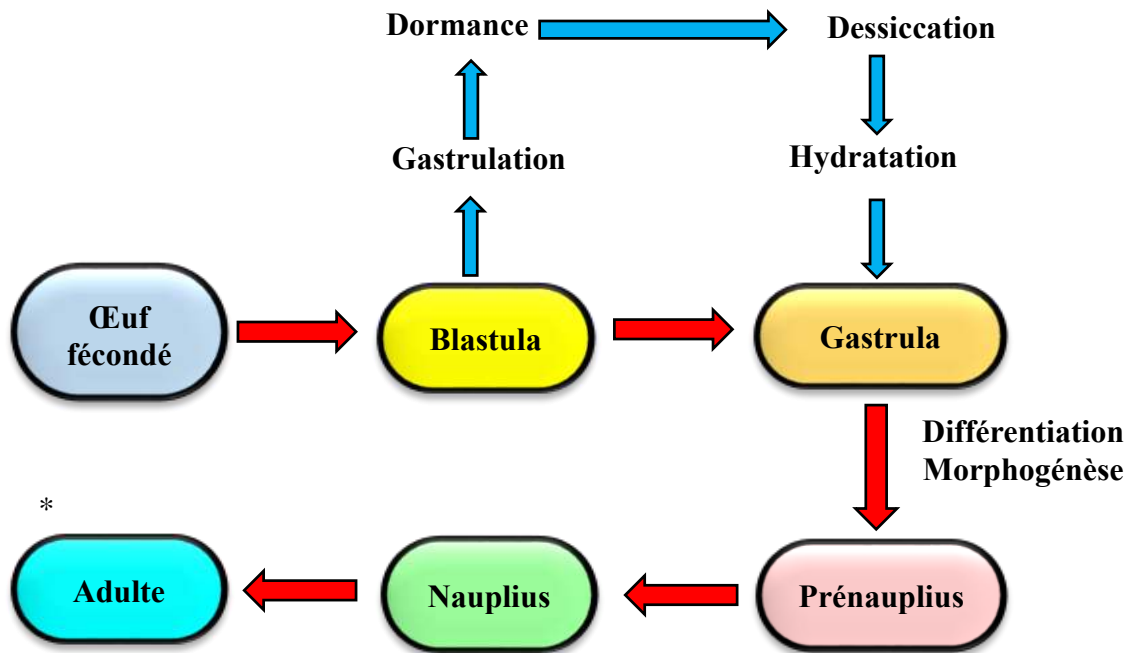


Figure 13 : Cycle de développement d'*Artemia salina*

II - Obtention des extraits végétaux

500 g de la plante entière *Scabiosa stellata* séchés à l'abri de la lumière et broyés finement à l'aide d'un broyeur électrique ont été macérés deux fois (5L x 2) dans un mélange de solvants (éthanol : H₂O) (70 : 30) pendant 48 heures à température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré sous vide à 40 °C pour obtenir 200 ml de la phase aqueuse. Cette dernière a été soumise à une extraction liquide-liquide à l'aide des solvants à polarité croissante : éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol (100 ml x 3). Les phases organiques ainsi obtenues ont été séchées par sulfate de sodium anhydre, filtrées puis évaporées pour donner les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) (Figure 14).

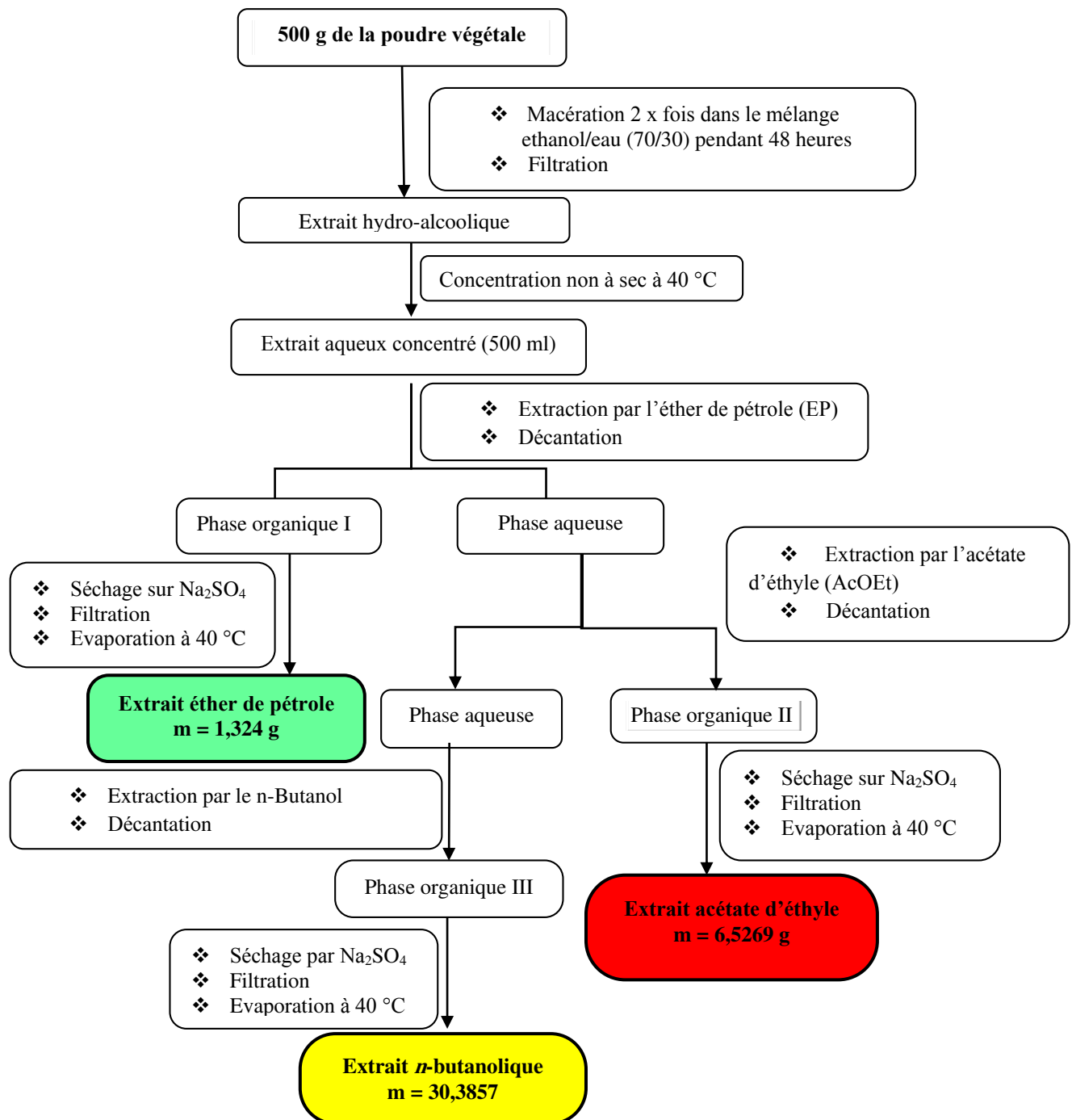


Figure 14 : Schéma d'extraction de la plante *Scabiosa stellata* L.

Le rendement d'extraction (%), est calculé selon la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{M_o}{M} \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %, **M :** Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

Mo : Masse en gramme du matériel végétal.

III- Analyse qualitative

III-1-Screening phytochimique

Le screening phytochimique permet de détecter la présence des principaux métabolites secondaires dans le matériel végétal. Dans cette étude, ce screening est réalisé selon les techniques décrites par **Farnsworth (1966)**, reposant sur la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un échantillon.

❖ Tannoïdes

2 ml de l'extrait butanolique ou acétate d'éthyle ont été ajoutés à 1 ml de chlorure ferrique (FeCl_3 , 1%). L'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre indique la présence des tannoïdes dans l'extrait (**Mohan et Pandey, 2016**).

❖ Flavonoïdes et anthocyanes

La mise en évidence des flavonoïdes dans les extraits (*n*-BuOH et AcOEt) est réalisée par l'ajout de quelques gouttes d'acide acétique, 0,5 ml d'eau distillée, 0,5 ml d'HCl concentré, quelques gouttes d'acide iso-amilique et des copeaux de magnésium (Mg) à 0,5 ml de l'extrait testé. Le mélange ainsi obtenu est agité pendant une minute et la présence d'une coloration rose orange ou rouge violet dans la couche surnageante indique la présence des flavonoïdes.

De même, cette réaction est effectuée en absence des copeaux de magnésium et chauffage pendant deux minutes au bain-marie, permet la détermination de leuco-anthocyanes suite à l'apparition d'une coloration rouge (**De et al., 2010**).

❖ Alcaloïdes

Trois à quatre gouttes de réactif du DRAGENDORF sont ajoutés à 3 ml d'extrait butanolique. L'apparition d'un précipité de couleur orange-rouge témoigne de la présence des alcaloïdes dans la solution (**Firdouse et Alam, 2011**).

❖ Stéroïdes et triterpènes

A un volume de 2 ml d'extrait éther de pétrole, 2 ml de chloroforme, 0,5 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique ont été ajoutés. Après agitation, l'observation d'une couleur rouge indique la présence des terpénoïdes alors que, l'apparition d'une couleur bleu-vert indique la présence des stéroïdes (**Anu et Usha, 2017**).

❖ Hétérosides cyanogènes

Dans un erlenmeyer, 2 g de la poudre végétale sont placés avec 10 ml d'eau distillée l'erlenmeyer est porté au chauffage pendant quelques minutes. Après ébullition une bandelette de papier picrosidé est fixé dans l'erlenmeyer. Le changement de la couleur du papier picrosidé du jaune vers l'orange ou le rouge indique la présence des métabolites capables de dégager de l'acide cyanhydrique (**Harborne.,1998**).

❖ Quinones

0,5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1%) sont ajoutés à 1 ml d'extrait. Après agitation l'apparition d'une couleur rouge indique la présence des quinones (**Pochapski et al., 2011**).

❖ Lipoides

La mise en évidence des lipoides dans les extraits EP et AcOEt, est réalisée par l'ajout de trois gouttes d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 3 ml de chacun des deux extraits. Après agitation l'observation d'une coloration violette ou verte indique la présence des lipoides (**Fayaz et al., 2017**).

❖ Saponosides

L'indice de mousse est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la plante qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante (**Fayaz et al., 2017**). Une décoction à 1%, a été préparée à partir d'un échantillon finement broyé de la plante. Après une ébullition de 30 min, la solution a été filtrée sous vide puis ajustée à 100 ml. Différentes dilutions de la solution aqueuse ainsi préparée ont été réalisées dans des tubes à vis bien propres. Chaque tube a été agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes, à raison de deux agitations par seconde, la mesure de la hauteur de la mousse est réalisée après 15 min de repos.

- ❖ Si la hauteur de la mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est inférieur à 100.
- ❖ Si la hauteur de la mousse est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution de la drogue végétale dans ce tube est l'indice de mousse cherché. $I = 1000N$ (N : le numéro du tube).
- ❖ Si la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est supérieur à 1000. Il faut donc diluer le décocté et recommencer la détermination de l'indice de mousse.

VI- Analyse quantitative

VI-1- Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits de la plante est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Le et al (2007)**.

VI-1-1-Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

VI-1-2-Protocole

Un volume de 200 μ l des solutions des extraits à différentes concentrations est ajouté à 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 %). Après 4 min, 800 μ l de carbonates de sodium (75 g/l) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir 2 heures à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 765 nm sur un Spectrophotomètre de type VIS-7220G.

L'acide gallique (5-200 μ g/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

VI-2- Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification de la teneur totale en flavonoïdes a été réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium décrite par **Turkoglu et al (2007)**.

VI-2-1-Principe

En présence de trichlorure d'aluminium, les flavonoïdes sont capables de former un complexe acide stable de couleur jaunâtre qui absorbe dans le visible à 510 nm. Ce complexe est dosé spectrophotométriquement à 430 nm.

VI-2-2-Protocole

Un millilitre d'une solution méthanolique d' AlCl_3 (2%) est ajouté à 1 ml des extraits a testés (EP, AcOEt et *n*-BuOH), le mélange ainsi obtenu a été vigoureusement agité. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 430 nm. La quercétine (1,25 - 25 μ g / ml) a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage afin d'estimer la

concentration de flavonoïdes. Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$).

VI-3- Dosage des tanins condensés

L'analyse des tanins condensés également connus sous le nom de proanthocyanidines a été réalisée selon la méthode décrite par **Heimler *et al* (2006)**.

VI-3-1- Principe

La méthode consiste à dépolymériser les tannins en milieu acide après réaction avec la vaniline, afin de les transformer en anthocyanidols de couleur rouge facilement dosés à 500 nm.

VI-3-2- Protocole

1500 μl de solution de vanilline (4%) ont été ajoutés à 25 μl d'extraits testés et 750 μl d'acide chlorhydrique concentré. Après 15 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 500 nm.

La catéchine (10 - 300 $\mu\text{g/ml}$) a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage afin de calculer la concentration de tanins condensés dans les extraits.

Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents de catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/mg extract}$).

V- activité antioxydante

V-1-piégeage des radicaux libres DPPH

V-1-1- principe

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre stable violet en solution ayant une absorbance caractéristique dans l'intervalle de 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque qu'il est réduit par un composé à propriété anti-radicalaire en diphényle picryl hydrazine ayant une couleur jaune. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. Cette réduction est mesurable par spectrométrie UV- Visible, en suivant la diminution de l'absorbance à 517 nm (**Hara *et al.*, 2018**) (**Figure 15**).

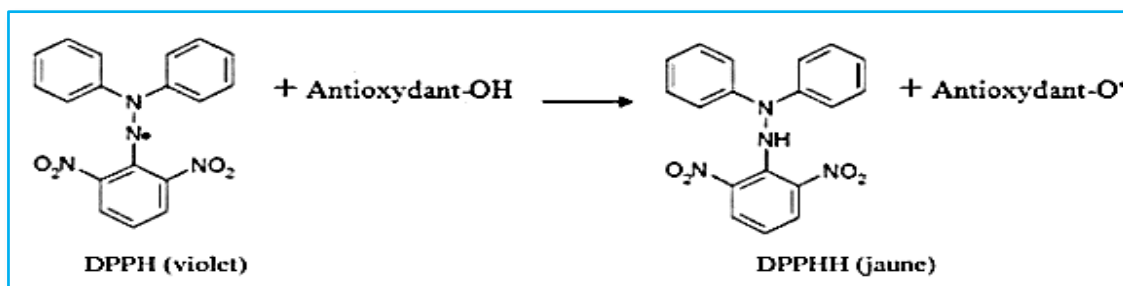


Figure 15 : Réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle en diphényle picryl hydrazine

V-1-2- Protocole

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par **Blois *et al* (1958)**. 25 μL de différentes dilutions des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou des standards (BHT, BHA et acide ascorbique) ont été ajoutés à 975 μl d'une solution méthanolique de DPPH (0,025 mg/ml). Ensuite, le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 517 nm et le pourcentage d'activité piégeant les radicaux DPPH de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: L'absorbance du blanc, $A_{\text{échantillon}}$: L'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon.

V-2-piégeage des radicaux libres ABTS

V-2-1- principe

Le piégeage du radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical-cation résultant de l'oxydation du chromophore synthétique l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•) (**Figure 16**). Cette réaction est suivie spectrophotométriquement par la variation de spectre d'absorption (**Re *et al.*, 1999**).

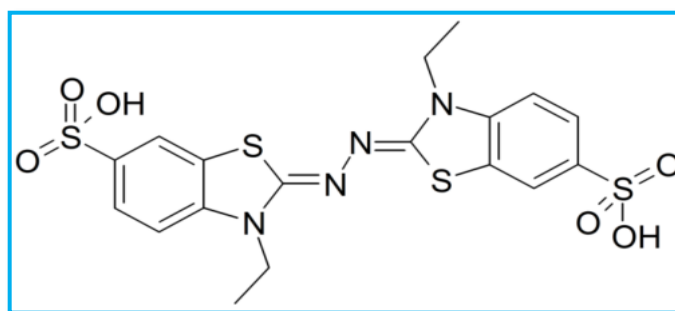


Figure 16 : L'acide 2,2'- azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•)

V-2-2- Protocole

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage du radical ABTS a été réalisée par la méthode de **Re et al (1999)**. Le radical d'ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS et 2,45 mM de K₂S₂O₈, le mélange est stocké à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 h avant son utilisation. 2 ml de la solution résultante ont été ajoutés à 1 ml d'extrait (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou de standards (BHT et BHA) à différentes concentrations (0,0156 - 1 mg / ml). Après 30 min d'incubation, les absorbances ont été mesurées à 734 nm et le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque concentration. La capacité de piégeage du radical ABTS a été estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon.

V-3- Pouvoir réducteur

V-3-1- Principe

Cette méthode est utilisée pour évaluer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanide $-\text{Fe}^{3+}$ en fer ferreux $-\text{Fe}^{2+}$ (**Ou et al., 2001**). Le Fe^{2+} qui résulte peut-être évaluer en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm. En effet, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox.

V-3-2- Protocole

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode de **Oyaizu et al (1986)**, 100 μl de solution d'échantillon : extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou standards (BHA, BHT, acide ascorbique, acide tannique et α -tocophérol) à différentes concentrations ont été ajoutés à 0,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 0,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 0,5 ml d'acide trichloroacétique (10 %) a été ajouté au mélange qui a été centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tour/min. puis un volume de 0,5 ml du surnageant a été ajouté à 0,5 ml d'eau distillée et 125 μl de FeCl_3 (1%) fraîchement préparé. Les absorbances ont été mesurées à 700 nm et les résultats ont été calculés comme $A_{0,5}$ (concentration en $\mu\text{g/ml}$ correspondante à l'absorbance à 0,50 nm).

V-4- Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

V-4-1- Principe

La capacité antioxydante par réduction de cuivre est une variante de la méthode du pouvoir réducteur qui a été récemment développée en utilisant le cuivre à la place du fer.

V-4-2- Protocole

La capacité antioxydante réductrice de cuivre a été déterminée selon la méthode **d'Apak et al (2004)**. 50 μl d'une solution de CuCl_2 (10 mM) ont été ajoutés à 50 μl de la solution de néocuprine (7,5 mM) et 60 μl de solution tampon de NH_4Ac (1 M, $\text{pH} = 7,0$). Différentes concentrations d'extraits et d'étalons ont été ajoutées au mélange initial pour obtenir un volume final de 200 μl . Les solutions ainsi obtenues ont été incubées à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance a été mesurée à 450 nm et les résultats ont été exprimés comme $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$), la capacité réductrice des extraits a été comparée à celle de l' α -tocophérol, BHA et BHT comme standards.

V-5-Test de blanchiment du β -carotène

V-5-1- Principe

L'oxydation de l'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes, et hydroperoxydes conjugués, ces derniers vont oxyder la molécule du β -carotène hautement insaturé (**Figure 17**). Entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. Cette décoloration est suivie spectrophotométriquement à 470 nm.

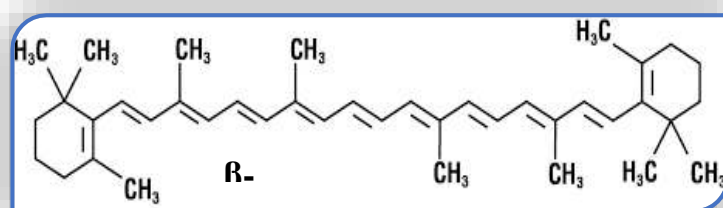


Figure 17 : Structure de la molécule du β -carotène.

Cependant la présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène et prévient l'oxydation et le blanchissement de β -carotène en neutralisant les espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système (**Mueller et Boehm, 2011**).

V-5-2- Protocole

L'inhibition de blanchiment du β -carotène des extraits organiques issus de la plante *Scabiosa stellata* a été évaluée par la méthode décrite par **Marco (1968)**.

0,5 mg de β -carotène est dissoute dans 1 ml de chloroforme, 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 afin d'obtenir un mélange émulsionnant. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés sous agitation vigoureuse.

Un volume de 800 μ l de l'émulsion préparée est ajouté à 200 μ l d'extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou de standards (BHA et BHT) à différentes concentrations. Les mélanges ainsi obtenus ont été incubés à 50 °C pendant 2 h et leurs l'absorbances ont été mesurées à 470 nm. Le pourcentage de l'activité antioxydante est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{\text{Absorbance après 2 h}}{\text{Absorbance initiale}} \times 100$$

V-6- Capacité antioxydante totale (CAT)

V-6-1- Principe

Ce test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) (MoO_4^{2-}) en molybdène Mo (V) (MoO^{2+}) en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction s'accompagne par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V) en milieu acide mesurable spectrophotométriquement. (**Prieto et al., 1999**).

V-6-2- Protocole

La capacité antioxydante totale des extraits a été évaluée par la méthode décrite par **Prieto et al (1999)**. 100 μ L de l'échantillon (extraits ou standards) ont été ajoutés à 900 μ L de solution de réactif constitué de l'acide sulfurique (0,6 M), phosphate de sodium (28 mM) et molybdate d'ammonium (4 mM).

Les tubes contenant les mélanges réactionnels ont été incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été lue à 695 nm contre un blanc. La capacité antioxydante des extraits a été exprimée en microgrammes équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (μ g EAA / mg extrait).

V-7- Chélation du fer ferreux

V-7-1- Principe

La chélation du fer ferreux vis-à-vis les différents extraits est évaluée par la méthode à la ferrozine. Cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres (Fe^{2+} -ferrozine), qui se manifeste par une diminution de l'absorbance traduisant ainsi le pouvoir chélateur des antioxydants présents dans le mélange réactionnel (**Le et al., 2007**).

V-7-2- Protocole

La chélation du fer ferreux a été estimée par la méthode de **Le et al (2007)**. 500 μ l des échantillons (extraits et EDTA) ont été mélangés initialement avec 100 μ l de $FeCl_2$ (0,6 mM) et 900 μ l de méthanol. Après 5 min, 100 μ l de ferrozine (5 mM) ont été ajoutés. Les solutions obtenues ont été agitées et incubées pendant 10 minutes à température ambiante ensuite l'absorbance a été mesurée à 560 nm.

Les résultats de la chélation du fer ferreux ont été transmis en pourcentage de chélation (%) selon l'équation :

$$\text{Pourcentage de chélation (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de blanc à 560 nm et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon à 560 nm.

V-8- Chélation des ions métalliques

V-8-1- Principe

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe^{+2} / ferène ayant une couleur bleue, une diminution de l'absorbance à 562 nm indique la présence d'un pouvoir antioxydant.

V-8-2- Protocole

La chélation des ions métalliques a été évaluée selon la méthode de **Decker et Welch (1990)**. 40 μ l d'échantillons (extraits ou EDTA) à différentes concentrations ont été ajoutés à 40 μ l de $FeCl_2$ (0,2 mM) et 40 μ l d'éthanol. La réaction a été initiée par l'addition de 80 μ l de solution de ferène (0,5 mM). Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 562 nm et les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Chélation (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de blanc à 560 nm et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon à 560 nm.

VI- Activité antibactérienne

VI-1- Vérification des bactéries

Les bactéries utilisées sont isolées sur le milieu nutritif (gélose Mueller), par striation des quatre quadrants dans des conditions stériles et dans les températures optimales selon la souche considérée.

VI-2- Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées sur la gélose Mueller et incubées à 37 °C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. On décharge l'anse dans 5 ml de bouillon nutritif, après homogénéisation de la suspension bactérienne, cette dernière est mise à incuber pendant 10-24 h à 37 °C.

Une lecture de la densité optique de 1 ml d'inoculum est faite à 625 nm. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,10.

VI-3- Préparation des dilutions

Chacun des trois extraits de la plante (éther de pétrole, acétate d'éthyle et n-butanolique), a été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à raison de 1g/l. Ces solutions sont utilisées pour la préparation de différentes dilutions successives au demi (1 à 0,0625 g/l) pour déduire les paramètres d'activités antibactériennes pour chaque extrait.

VI-4- Réalisation des tests antibactériens

L'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode de diffusion en milieu solide (Medini *et al.*, 2014). Le milieu de culture Muller-Hinton a été préparé et stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min, puis coulé dans les boîtes de pétri (Figure 18).

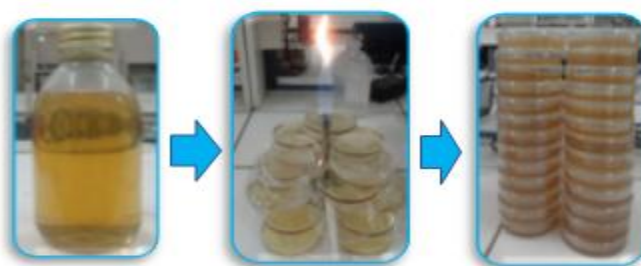


Figure 18 : Préparation du milieu de culture

L'ensemencement de chaque bactérie utilisée dans ce test est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne à sa phase exponentielle, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche (**Figure 19**).



Figure 19 : Ensemencement des bactéries

Les disques imprégnés par 10 μ l des solutions à tester sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 1-7 jours. Les tests sont effectués en triple (trois boîtes pour chaque concentration d'extrait et pour chaque souche) (**Figure 20**).

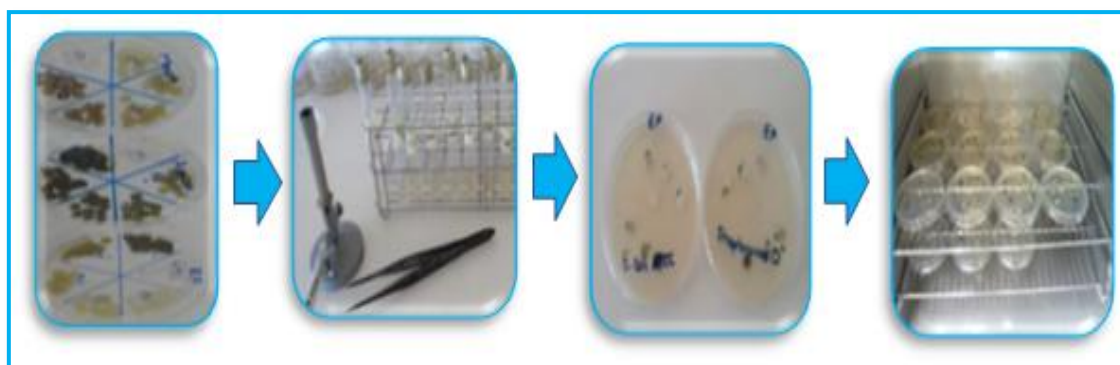


Figure 20 : Dépôt des disques imprégnés par les extraits et incubation des boîtes

VI-5- Détermination des CMI

Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il suffit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu.

VII- Evaluation de la cytotoxicité *in-vitro* sur les larves d'*Artemia salina*

La cytotoxicité *in-vitro* des différents extraits obtenus à partir de la plante *Scabiosa stellata* a été évaluée sur des larves d'*Artemia* selon la méthode décrite par Meyer *et al* (1982).

VII-1- Conditions expérimentales

2 g de cystes, ont été mis à éclore dans une cuve qui contient 1 litre d'eau de mer (70 %) sous fort bullage dans les conditions expérimentales suivantes :

- ❖ La température est maintenue entre 25 et 30 °C (si ce paramètre n'est pas respecté le métabolisme du cyste est stoppé de façon irréversible).
- ❖ La concentration des sels est de l'ordre de 20 et 25 g/l.
- ❖ Une aération continue pour favoriser l'homogénéisation du milieu et l'éclosion.
- ❖ Un éclairage continu par une lumière artificielle pour favoriser un meilleur rendement.

Au bout de 30 heures, le bullage est stoppé pour récolter les larves. Une source lumineuse est dirigée vers le bas de la cuve. Par phototropisme, les larves se séparent des cystes non éclos et des débris d'œufs. Il suffit alors de les recueillir pour procéder à la réalisation des tests.

VII-2- Réalisation du test

100 µl de solution d'extraits à différentes concentrations (125, 250, 500, 1000 µg/ml) sont ajoutées aux tubes contenant dix larves, le volume final de chaque tube est ajusté à 5 ml avec l'eau de mer (70 %).

Une série de tubes de témoins négatifs contenant le solvant utilisé pour la réalisation des dilutions (DMSO) ont été préparés. Les tests sont effectués en triple (trois répétitions pour chaque concentration d'extrait)

Après 24 heures, le nombre de larves survivantes est compté dans chaque tube et la mortalité est calculée à chaque concentration en utilisant l'équation suivante (Pisutthanan *et al.*, 2004) :

$$\text{Mortalité \%} = \frac{\% \text{ Mort Observée} - \% \text{ Mort Témoin}}{100 - \% \text{ Mort Témoin}} \times 100$$

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité chez les témoins est inférieur à 5 % ou compris entre 5 et 20 %. A partir des résultats, la concentration létale 50 % (CL₅₀) reflétant la toxicité des produits, est estimée en utilisant le tableau ci-dessous (Tableau 6) (Clarkson *et al.*, 2004).

Tableau 6 - Estimation de la toxicité des extraits sur les larves d'*Artemia salina*

CL ₅₀	Toxicité
CL ₅₀ ≥ 1000 µg/ml	-
1000 µg/ml > CL ₅₀ ≥ 500 µg/ml	+
500 µg/ml > CL ₅₀ ≥ 250 µg/ml	++
250 µg/ml > CL ₅₀ ≥ 100 µg/ml	+++

Dont : (-) non cytotoxique; (+) faiblement cytotoxique; (++) cytotoxicité modérée; (+++) fortement cytotoxique.

VIII- Activité hémolytique

VIII- 1- Préparation de la suspension d'érythrocytes

Cinq millilitres de sang recueillis à partir d'un individu volontaire (O⁺) dans un tube à héparine ont été centrifugés à 1500 (tour/min) pendant 3 minutes. Après centrifugation le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate stérile (pH 7,2 ± 0,2) par centrifugation à 1500 tour/min pendant 5 min pour chaque lavage. Les cellules ainsi obtenues ont été remises en suspension de (0,5%) en utilisant une solution saline normale (**Figure 21**).



Figure 21 : Prélèvement et préparation de la suspension érythrocytaire

VIII- 2- Réalisation des tests

L'activité hémolytique *in vitro* a été réalisée par la méthode de **Kumar et al (2011)**. Un volume de 0,5 ml de la suspension cellulaire précédemment préparée a été mélangé avec 0,5 ml des dilutions des extraits de la plante préparées à différentes concentrations dans le tampon phosphate (125, 250, 500 et 1000 µg/ml). Les mélanges ont été incubés pendant 30 min à 37 °C dans un bain marie. Après incubation les tubes ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 10 min. l'absorbance de l'hémoglobine libre dans le surnageant a été mesurée spectrophotométriquement à 540 nm. Une solution saline tamponnée et de l'eau distillée ont été utilisées comme contrôles négatif et positif. Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs}_t - \text{Abs}_n}{\text{Abs}_c - \text{Abs}_n} \times 100$$

Dont : Abs_t est l'absorbance de l'échantillon à 540 nm , Abs_n est l'absorbance du contrôle positif (la solution saline) et Abs_c est l'absorbance du contrôle négatif (eau distillée).

IX- Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de la plante *Scabiosa stellata* (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été réalisée en utilisant la méthode de dénaturation du sérum d'albumine bovine (Karthik *et al*, 2013). 0,5 ml de solutions d'échantillons ou standard (ibuprofène) préparé dans l'éthanol à différentes concentrations (125, 250, 500 et 1000 µg/ml) ont été ajoutés à 0,5 ml de solution du BSA (0,2%) préparée dans un tampon Tris phosphate (pH= 6,6). Un tube témoin a été également préparé en mélangeant 0,5 ml de BSA avec 0,5 ml d'éthanol. Les tubes à essai ont été incubés à 37 °C pendant 10 minutes puis chauffés à 72 °C pendant 5 minutes, après refroidissement (10 minutes), Les absorbances des solutions ont été lues à 660 nm. Chaque expérience a été réalisée en triple et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation a été déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Inhibition de la dénaturation (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon à 660 nm.

X- Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'activité inhibitrice de l'AChE par les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) et la molécule de référence (galantamine) a été évaluée en utilisant la méthode décrite par (Ellman *et al.*, 1961). 750 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0) ont été ajoutés à 50 µl d'extraits bruts à différentes concentrations et 100 µl de solution AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U). Le mélange ainsi obtenu est incubé à 25 °C pendant 15 minutes. Après incubation 50 µl de DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) (0,5 mM) sont ajoutés avec 50 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM). L'absorbance du mélange a été lue à 412 nm, après 5, 10, 15 et 20 min et le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{E - S}{E} \times 100$$

Où E est l'activité de l'enzyme sans extrait et S est l'activité de l'enzyme après ajout de l'extrait.

XI- Evaluation de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë des extraits (acétate d'éthyle et *n*-butanolique) de l'espèce *Scabiosa stellata* a été évaluée sur des rats albinos Wistar, selon la directive 423 de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), avec peu de modifications impliquant l'observation de tous les animaux pendant 14 jours (Kifayatullah *et al.*, 2015).

XI- 1-Administration

Des rats adultes mâles en bonne santé ont été divisés au hasard en 7 groupes ($n = 5$) et placés dans des conditions standards. Après 18 heures de jeûne avec un accès libre à l'eau, le poids corporel de chaque animal a été déterminé et la dose administrée a été calculée en fonction du poids corporel.

Le premier groupe (groupe témoin) a reçu une solution saline par voie intragastrique (10 ml/ kg). Les groupes 2, 3 et 4 ont été traités par l'extrait d'AcOEt à des doses de 500, 1000 et 2000 mg / kg, respectivement (dose unique). Les groupes 5, 6 et 7 ont été traités par l'extrait *n*-butanolique à des doses de 500, 1000 et 2000 mg / kg, respectivement (dose unique) (Figure 22).

XI-2- Observation

Après l'administration des extraits, les animaux ont été surveillés et observés en permanence pour noter toute mortalité et afin de détecter tout signe de toxicité (changements comportementaux, poids corporel, couleur des urines, prise alimentaire, prise d'eau, respiration, convulsions, constipations et changements de couleur des yeux et de la peau) continuellement et quotidiennement pendant 14 jours (Figure 22).

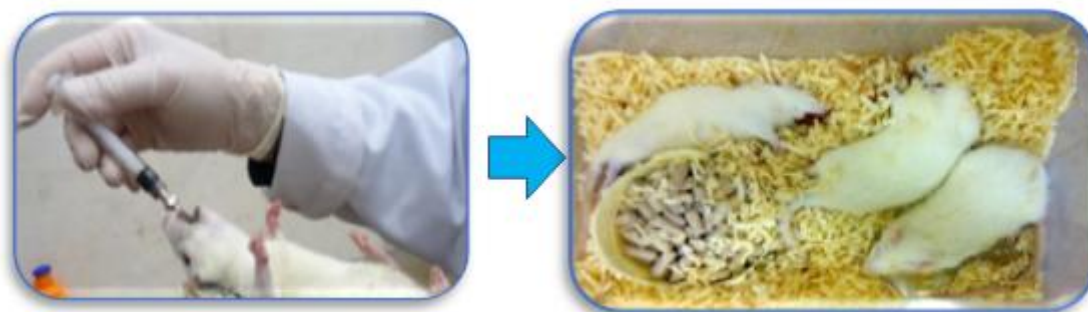


Figure 22 : Administration et observation des rats traités (test de toxicité aiguë)

Au 14^{ème} jour et après un jeûne de 18 heures. Des échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes à essai, contenant l'EDTA pour l'estimation des paramètres

hématologiques et sans anticoagulant pour l'estimation des paramètres biochimiques. Après les prélèvements tous les animaux ont été sacrifiés et les organes vitaux (foie, reins et poumons) ont été séparés, excisés et examinés macroscopiquement. puis conservés dans une solution de formol tamponnée (10%) pour la réalisation des examens histopathologiques.

XI-3- Analyses hématologiques

Les échantillons de sang prélevés dans les tubes contenant un anticoagulant (EDTA, héparine) ont été immédiatement utilisés pour déterminer les taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes et l'hématocrite selon des méthodes standards (**Jain 1986**).

XI-4- Paramètres biochimiques

Les échantillons de sang recueilli dans les tubes sans anticoagulant ont été centrifugés à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. Les sérums séparés, conservés à -20 °C, ont été utilisés pour doser :

- ✚ L'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) par la méthode colorimétrique de **Reitman et Frankel (1957)**.
- ✚ La bilirubine totale et conjuguée a été déterminée par la méthode colorimétrique de **Simkins (1976)**, le cholestérol total par le test enzymatique d'**Allain et al. (1974)**.
- ✚ Les triglycérides par la méthode enzymatique de **Bucolo et David (1973)**.
- ✚ La créatinine par la méthode de la réaction au picrate en milieu alcalin (**Cheesbrough 1991**).

XI-5- Examens d'anatomie-pathologiques

L'étude histopathologique a été effectuée selon la méthode décrite par **Jayesh et ses collaborateurs (2017)**.

XI-5-1-Fixation

Cette étape consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires. La fixation se fait par une solution du Formol tamponné (10 %) qui favorise la polymérisation des protéines et, dans certains cas les lipides présents dans l'organe.

XI-5-2- Mensuration et description des pièces et mise en cassettes

Les fragments des tissus sont mesurés et mises en cassettes en totalité.

XI-5-3- Déshydratation

Cette étape prépare les tissus à l'inclusion en paraffine. Elle est réalisée dans un automate qui permet le rinçage de l'échantillon avec différents alcools fixateurs qui conservent les tissus du fragment.

Le déshydratant le plus courant est l'alcool éthylique. Mais comme la paraffine n'est pas non plus miscible à l'alcool, celui-ci sera remplacé avant inclusion par un liquide intermédiaire miscible à l'alcool et à la paraffine. Qui est le xylène. Ce liquide est "éclaircissant" ce qui permet d'apprécier le degré de pénétration par la transparence acquise par la pièce.

XI-5-4- Inclusion en paraffine

Les tissus sont inclus dans du paraplast qui est un mélange de paraffine purifiée et de polymères plastiques qui s'incorpore avec l'échantillon et conserve ces tissus permettant ainsi de faire des coupes histologiques fines.

XI-5-5- Coupe au microtome

Le bloc de paraffine contenant le tissu est coupé en fins rubans de 4 à 5 μm à l'aide d'un microtome.

XI-5-6- Etalement sur lames

Plusieurs motifs de coupe tissulaire sont étalés sur les lames. Les lames sont alors séchées afin d'assurer une bonne adhésion à la lame des tissus avant coloration

XI-5-7- Coloration standard HE (Hématoxyline –Eosine)

Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'hématoxyline éosine (HE), comportant un bain de 5 min d'hématoxyline, qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux), un bain de HCl (1%) pour différencier les coupes et obtenir une coloration rose, un bain de 3 min en milieu carbonate de lithium pour colorer en bleu les coupes et un bain de 5 min dans l'éosine pour colorer les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet. Les lames doivent être recouvertes d'une résine permettant de maintenir en place une lamelle couvre-objet assurant leur protection.

XI-5-8- Lecture des lames

Les coupes sont observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (**Figure 23**).



Figure 23 : Examens d'anatomie-pathologiques.

XII- Activité anti-inflammatoire *in vivo*

Le pouvoir anti-inflammatoire des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) a été évalué selon la méthode de **Winter *et al* (1962)** en utilisant des rats adultes de souche Wistar. Les rats ont été répartis au hasard en 6 lots homogènes de 6 rats et mis à jeun pendant 18 heures avant le traitement. Ensuite, les rats ont reçu les produits testés par voie intragastrique (**Tableau 7**).

Une heure après les différents traitements, 0,1 ml d'une solution à de λ -carragénine (1%) a été injecté à chaque rat sous le coussinet plantaire de la patte postérieure gauche (**Figure 24**). Cependant, la patte postérieure droite n'a subi aucun traitement (un témoin)

Tableau 7 : Répartition des lots traités

Lots	Les produits testés	Dose
Lot 01	Extrait <i>n</i> -BuOH	75 mg/kg
Lot 02	Extrait <i>n</i> -BuOH	50 mg/kg
Lot 03	Extrait AcOEt	75 mg/kg
Lot 04	Extrait AcOEt	50 mg/kg
Lot 05	Le diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien de référence)	50 mg/kg
Lot 06	NaCl (0,9 %)	10 ml/kg

L'évaluation de l'œdème a été suivie par l'enregistrement du diamètre de la patte inflammée après 1, 2, 3, 4, 5 et 24 heures de l'injection par λ -carragénine.



Figure 24 : Administration et Injection de la λ -carragénine sous le coussinet plantaire de La patte postérieure gauche.

Pour chaque groupe traité, les diamètres moyens obtenus (D_t) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (D_0), permettant ainsi de calculer les pourcentages d'œdème (pourcentage d'inflammation) à partir de la formule :

$$\text{Pourcentage d'inflammation (\%)} = \frac{D_t - D_0}{D_0} \times 100$$

Tandis que, le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé à partir de la formule

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot témoin} - (\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot traité}}{(\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot témoin}} \times 100$$

PPG: diamètre de la patte gauche; PPD: diamètre de la patte droite.

XIII-Activité antipyrétique *in vivo*

L'activité antipyrétique des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) obtenus à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* a été testée selon la méthode de la pyrexie induite par la levure de bière (Vogel 2002).

Dans la première fois, la température rectale basale initiale des rats a été enregistrée en insérant un thermomètre clinique numérique à une profondeur de 2 cm dans le rectum. La pyrexie a été induite par l'injection sous-cutanée dans la région dorsolatérale d'une suspension aqueuse de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (20 %) en raison de 1 ml pour 100 g de poids corporel.

Ensuite, les animaux ont été mis à jeun. Dix-huit (18) heures après l'injection de la levure, la température rectale a été prise de nouveau chez chaque rat, et des lots de cinq rats ont été constitués avec des rats présentant une augmentation de température supérieure ou égale à 0,5 °C. Les lots ont été rendus homogènes quant au niveau de l'hyperthermie. Les différents lots ont reçu par voie per os soit l'eau physiologique, soit l'extrait de plante

(AcOEt et *n*-BuOH à des doses de 50 et 75 mg/kg), la substance de référence (paracétamol à 50 mg/kg). Une heure après l'administration des extraits, la prise de température rectale est suivie pendant cinq heures.

XIII- Analyses statistiques

Pour l'étude *in vitro*, les résultats ont été exprimées en moyennes \pm S.D ($p < 0,05$) pour trois répliques pour chaque échantillon. Les valeurs $A_{0.5}$ (puissance réductrice et dosage CUPRAC) et IC_{50} (DPPH, ABTS, activité d'inhibition du blanchiment du β -carotène) et EC_{50} (chélation du fer ferreux, chélation des ions métalliques) ont été calculées par analyse de la droite de régression.

Pour l'étude *in vivo*, les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM et les données ont été analysées à l'aide de l'ANOVA (one way of variance), suivi du test Tukey et test t de student pour déterminer leur signification. Les valeurs de probabilité ($p < 0,05$) ont été utilisées pour indiquer la signification statistique.



**Partie
phytochimique**

I- Chimie extractive

I-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode d'analyse repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Les chromatogrammes en couche mince (CCM) sont utilisés pour vérifier la présence et la pureté des produits suivis pendant les étapes de séparation et de purification. Ces analyses sont effectuées en phase normale sur des plaques d'aluminium, du Kieselgel 60 F254 Merck, 250 μm (20 x 20 cm) et en phase inverse sur des plaques d'aluminium RP-18 (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Après développement, les plaques sont d'abord visualisées sous la lampe UV à 254 et 366 nm puis révélées par le mélange de H_2SO_4 /acide acétique/ H_2O et chauffage à 100 °C.

I-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La phase inverse est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

I-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Le diamètre et la taille de la colonne ainsi que le débit de la phase mobile et le volume des fractions sont choisis en fonction de la quantité d'échantillons à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de la silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'élution est effectuée à pression atmosphérique. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

II- Chimie structurale

II-1- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN (1D et 2D) sont enregistrés dans le méthanol deutéré sur un appareil Varian/Agilent Inova spectrometer à 500 MHz pour RMN ^1H et 125 MHz pour les spectres RMN ^{13}C . Les solvants de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Le TMS est utilisé comme substance de référence.

II-2- Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse en haute résolution HR-ESI-MS des composés isolés ont été enregistrés sur un spectromètre de masse de type Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer. Le spectre ESI-MS est réalisé sur l'appareil MSQ Thermofinnigan.

III- Contrôle chromatographique des extraits

Une analyse chromatographique sur couche mince CCM a été réalisée sur les trois extraits obtenus précédemment, en utilisant différents systèmes d'éluion à savoir : EP/AcOEt (10%) pour l'extrait éther de pétrole, CHCl₃/MeOH (15%) et CHCl₃/MeOH/H₂O (70/30/5) pour les extraits AcOEt et *n*-BuOH respectivement. Les profils CCM de ces extraits montrent que les deux extraits *n*-BuOH et AcOEt sont riches en métabolites secondaires relativement séparables (**Figure 25**). Mais ce travail va se limiter uniquement à l'étude de l'extrait *n*-BuOH.

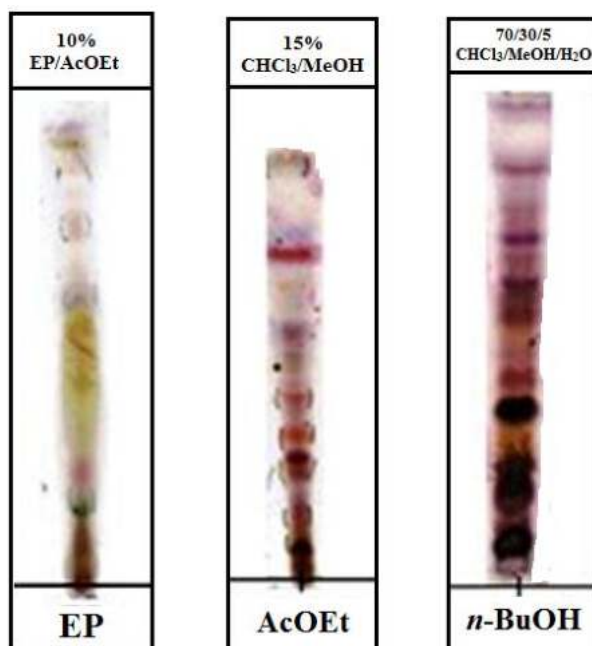


Figure 25 : CCM des extraits bruts de la plante *S. stellata*

IV-Etude de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Scabiosa stellata*

5 g de l'extrait *n*-BuOH sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice en phase inverse (50 g) comme phase stationnaire. L'éluion est effectuée avec le mélange eau-méthanol allant de 80-20 jusqu'à 0-100. A l'issue de ce fractionnement primaire, 12 fractions sont recueillies (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *S. stellata*

Fractions	Eluant (H ₂ O/MeOH)	Observation sur CCM
1	80 : 20	3 taches + trainée
2	80 : 20	3 taches + trainée
3	60 : 40	2 taches + trainée
4	60 : 40	2 taches + trainée
5	40 : 60	trainée
6	40 : 60	4 taches
7	20 : 80	4 taches
8	20 : 80	Plusieurs taches
9	20 : 80	Plusieurs taches
10	0 : 100	Plusieurs taches
11	0 : 100	3 taches + trainée
12	0 : 100	1 tache + trainée

Ces fractions subissent une chromatographie sur couche mince (CCM) avec le système d'élution suivant : CHCl₃/MeOH/H₂O (70/30/5). Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis pulvérisées par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (**Figure 26**). Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 10 fractions (**Tableau 9**).

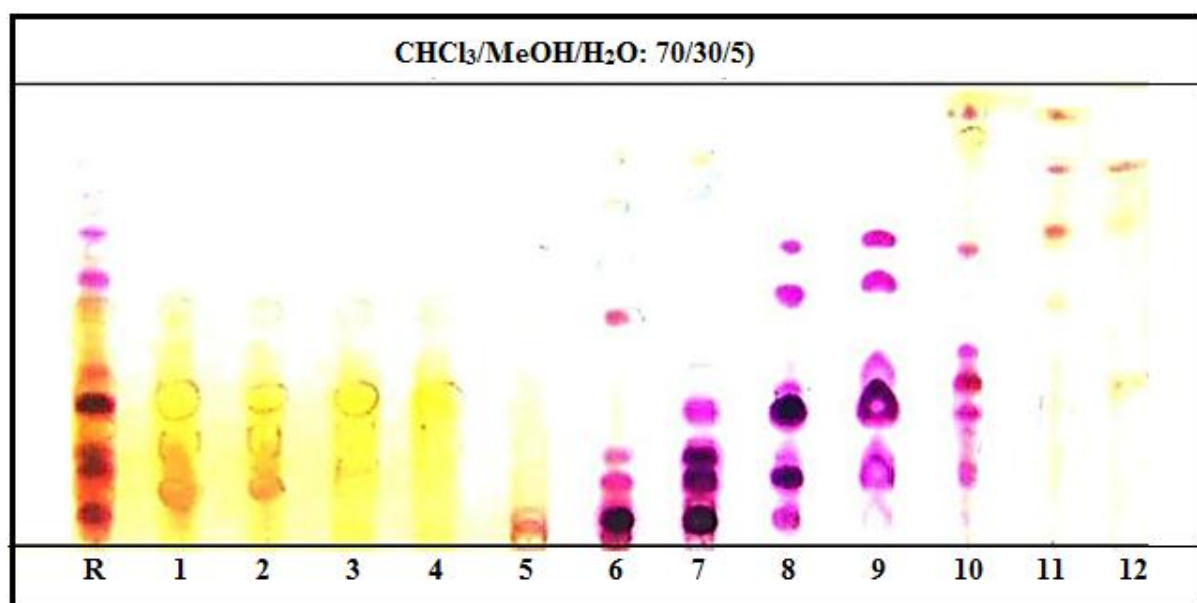
**Figure 26 :** CCM récapitulative des différentes fractions de l'extrait *n*-butanolique de la plante *S. stellata*

Tableau 9 : Rassemblement des fractions de l'extrait *n*-BuOH

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
F-1'	1-2	706,9	3 taches + trainée
F-2'	3-4	928,0	2 taches + trainée
F-3'	5	1023	trainée
F-4'	6	417,4	4 taches
F-5'	7	674,2	4 taches
F-6'	8	514,7	Plusieurs taches
F-7'	9	189,2	Plusieurs taches
F-8'	10	106,4	Plusieurs taches
F-9'	11	59,2	3 taches + trainée
F-10'	12	20,5	1 tache + trainée

V-Purification

V-1- Etude de la fraction F-6'

La fraction F-6' (514,7 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale (SiO₂ 60H, m = 5,14 g). L'éluion est effectuée par le mélange de solvants chloroforme/ méthanol. Des fractions de 25 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale, pour donner 16 fractions (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F-6

Sous fractions	Fractions	Eluant de la colonne CHCl ₃ /MeOH	Poids en mg	Observation sur CCM
F-6'-1	1-11	100 et 1%	18	1 tache + traînée
F-6'-2	12-20	3%	3,8	traînée
F-6'-3	21-37	7 et 10%	4,2	traînée
F-6'-4	37-43	15%	11,4	1 tache + traînée
F-6'-5	44-51	15%	21,7	2 taches
F-6'-6	52-63	15%	37,2	2 taches
F-6'-7	64-66	15%	8,4	2 taches
F-6'-8	67-73	20%	25,7	1 tache majoritaire + traînée
F-6'-9	74-83	20%	30,8	1 tache

F-6'-10	84-94	20%	14,3	1 tache
F-6'-11	95-100	20%	26,3	1 tache + traînée
		CHCl₃/MeOH/H₂O		
F-6'-12	101-131	(80/20/1)	119,3	2 taches
F-6'-13	132-168	(80/20/1)	33,9	2 taches
F-6'-14	169-177	(80/20/2)	20,8	1 tache
F-6'-15	178-204	(70/30/2)	21,6	1 tache
		CHCl₃/MeOH		
F-6'-16	205-238	60/40 50/50 30/70 20/80 10/90 0/100	59,3	traînée

La sous fraction F-6'-9 (30,8 mg) contient un composé majoritaire qui se précipite dans le mélange (acétone /dichlorométhane) après récupération de ce dernier on a obtenu le composé **SS₂** (22,7 mg) à l'état pur son rapport frontal est 0.43. Sa CCM présente une tache invisible sous lampe UV à 254 nm et se colore en rose après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (**Figure 27**).

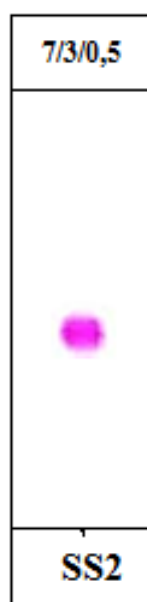


Figure 27 : CCM du composé 2

V-2- Etude de la fraction F-7'

La fraction F-7' (m = 189,4 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale SiO₂ et éluée avec le mélange de solvants chloroforme/méthanol. Des fractions de 3,5 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans un mélange de solvants (CHCl₃/MeOH), pour donner 8 fractions (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Rassemblement des sous fractions de la fraction F-7'

Sous fractions	Fractions	Eluant de la colonne CHCl ₃ /MeOH	Poids en mg	Observation sur CCM
F-7'-1	1-22	100 et 1%	10,1	Néant
F-7'-2	23-31	15%	23,8	2 taches
F-7'-3	32-46	20%	13,9	Néant
F-7'-4	47-68	20%	14,9	Plusieurs taches
		CHCl₃/MeOH/H₂O		
F-7'-5	69-80	80/20/1	31,3	Plusieurs taches
F-7'-6	81-102	80/20/1	17,2	Plusieurs taches
F-7'-7	103-156	80/20/2	22,4	Plusieurs taches
F-7'-8	156-179	70/30/2	2,7	Trainée

La sous-fraction F-7'-2 (23,8 mg) est purifiée sur une plaque préparative en phase normale dans le mélange (CHCl₃/MeOH/H₂O : 80/20/2). Cette purification a conduit à l'isolement du composé **1** (5,9 mg et R_f = 0.58). Ce dernier montre la présence d'une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en mauve après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (**Figure 28**).



Figure 28 : CCM du composé **1**

Chapitre II.

Résultats et discussion

Partie biologique

I- Extraction

L'extraction par des solvants à polarité croissante a permis d'obtenir trois extraits bruts : extrait éther de pétrole (EP), acétate d'éthyle (AcOEt) et *n*-butanolique (*n*-BuOH) ayant un aspect pâteux de couleur allant de brun au vert foncé (**Tableau 12**).

Tableau12 - Couleur et rendement de différents extraits obtenus à partir de *Scabiosastellata*

Extraits	Couleur	Rendement en (%)
<i>n</i> -BuOH	Brune	6,076
AcOEt	Verte	1,304
EP	Verte foncée	0,206

Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec sous forme de poudre et les résultats ont été exprimés en pourcentage. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait *n*-butanolique (6,07%) suivi par l'extrait acétate d'éthyle (1,30%) et enfin l'extrait éther de pétrole (0,20%) possédant le plus faible rendement. Cette différence observée peut être expliquée du fait que la méthode utilisée, le choix des solvants ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid), la méthode d'extraction (macération, décoction, infusion) et les propriétés chimiques des molécules à extraire affectent le rendement des extraits ainsi que leur composition chimique et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Michel *et al.*, 2012**).

Il est important de souligner qu'il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes et des solvants de polarités variables dans les processus d'extraction du même matériel végétal réduisent les possibilités de comparaison entre les études réalisées sur la même espèce (*Scabiosa stellata*) (**Lehbili^a *et al.*, 2018 ; Lehbili^b *et al.*, 2018 ; Rahmouni^a *et al.*, 2018 ; Rahmouni^b *et al.*, 2018**).

II- Analyse qualitative

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires dans le matériel végétal étudié. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité et des changements spécifiques de couleur. Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits, sont représentés dans le Tableau ci-dessous (**Tableau13**).

Tableau 13 : Résultats du criblage phytochimique des extraits de *S. stellata*.

Métabolites recherchés	Extraits		
	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Tanins	-	+	+
Stéroïdes	+	-	-
Flavonoïdes	-	+	+
Coumarines	-	-	-
Saponines	-	-	+
Caroténoïdes	+	-	+
Quinones	-	+	-
Glycosides cyanogènes	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	+

(+) présence des métabolites, (-) absence des métabolites.

**Figure 29** : Résultats du screening phytochimique de l'espèce *Scabiosa stellata* L.

Le criblage phytochimique des extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) issus de l'espèce *S. stellata* a montré la présence de divers métabolites (de flavonoïdes, de saponines, de caroténoïdes, de quinones, de stéroïdes, d'alcaloïdes et de tanins) qui possèdent de multiples propriétés biologiques et pharmacologiques. Les familles chimiques détectées dans cette étude viennent de confirmer les travaux de plusieurs recherches phytochimiques réalisées sur la plante *Scabiosa stellata*, en effet les polyphénols, les flavonoïdes, les irridoid glucosides, les saponosides et les lipoides ont été isolés précédemment de cette espèce. (**Rahmouni^a et al., 2018 ; Rahmouni^b et al., 2018 ; Lehbili^a et al., 2018 ; Lehbili^b et al., 2018**) et le reste des métabolites détectés ont été isolés des espèces du même genre (**Kuril'chenko et al., 1971; Christopoulou et al., 2008 ; JI et al., 2014**).

De cet effet, les extraits testés pourraient être une source importante de composés bioactifs ayant des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et cytotoxiques potentiels.

III- Analyse quantitative

Afin de caractériser quantitativement les extraits préparés à partir de la plante étudiée, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a été effectué.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés biologiques et pharmacologiques des plantes leur sont attribuées.

Plusieurs études ont noté que les composés phénoliques possèdent des propriétés biologiques intéressantes telles que les activités antioxydantes (**De Beer et al., 2017**), antiprolifératives (**Chen et al., 2018**), anticancéreuses (**Roleira et al., 2015**), antimicrobiennes, antivirales (**Zorofchian et al., 2014**) et anti-inflammatoires (**Zhang et al., 2016**).

III-1-Teneur totale en phénols, flavonoïdes et tanins condensés

Les résultats des teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés des extraits obtenus de l'espèce *S. stellata* sont représentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14: Teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits obtenus de l'espèce *S. stellata*.

Extraits	Teneur totale en polyphénols (μg EAG/mg d'extrait végétal)	Teneur totale en flavonoïdes (μg EQ/mg d'extrait végétal)	Teneur totale en tannins condensés (μg EC/ mg d'extrait végétal)
EP	30.33 \pm 0.15	13.83 \pm 0.45	0.07 \pm 0.02
AcOEt	117.66 \pm 0.52	72.90 \pm 0.76	32.05 \pm 0.15
n-BuOH	77.12 \pm 0.29	57.83 \pm 0.25	0.95 \pm 0.015

Les valeurs ont été calculées à partir des gammes d'étalonnages établis par l'acide gallique, la quercétine et la catéchine (**Annexe 02**) et elles sont exprimées en microgrammes d'équivalent de standards par milligramme d'extrait respectivement.

Les extraits ont montré des différences dans leurs teneurs totales en fonction des polarités des solvants utilisés pour les procédures d'extraction. Les teneurs les plus élevées en polyphénols, flavonoïdes et tanins ont été observées dans l'extrait acétate d'éthyle ($117,66 \pm 0,52 \mu\text{g EAG/ mg}$, $72,90 \pm 0,76 \mu\text{g EQ/mg}$ et $32,05 \pm 0,15 \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait végétal), suivis par l'extrait *n*-butanolique ($77,12 \pm 0,29 \mu\text{g EAG / mg}$, $57,83 \pm 0,25 \mu\text{g EQ/mg}$ et $0,95 \pm 0,015 \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait végétal) respectivement tandis que l'extrait éther de pétrole a donné des teneurs les plus faibles ($30,33 \pm 0,15 \mu\text{g EAG/mg}$, $13,83 \pm 0,45 \mu\text{g EQ/mg}$ et $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g EC/ mg}$ d'extrait végétal).

L'étude menée par **Rahmouni et ses collaborateurs (2018)** sur les extraits organiques (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) de la même espèce étudiée (*Scabiosa stellata*) a montré des niveaux plus faibles en polyphénols par rapport aux nos résultats.

Ainsi, de nombreuses études réalisées sur des espèces du genre *Scabiosa* (**Wang et al., 2013** ; **Hila^b et al., 2015**) ont montré des niveaux plus faibles en polyphénols et en flavonoïdes par rapport aux résultats obtenus dans la présente étude.

L'évaluation du taux des polyphénols et des flavonoïdes de l'espèce *Scabiosa tschiliensis* au cours de différents stades de maturation a montré une variation significative entre les teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes des plantes collectées après et au cours de la floraison et pendant les périodes de formation des fruits. Ces fluctuations sont liées principalement à la saison, le site de collecte et le climat des régions (**Wang et al., 2017**).

Cependant l'analyse quantitative des extraits de l'espèce *S. arenaria* a montré la richesse de cette dernière en tannins condensés surtout les extraits préparés à partir des tiges et des feuilles possédant des teneurs de l'ordre de 489.75 et $470.25 \text{mg } \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait végétal respectivement (**Hila et al., 2013**).

La variation des teneurs totales en phénols, flavonoïdes et tanins entre les espèces du même genre pourrait être due aux divers facteurs intrinsèques (potentiel génétique des espèces individuelles pour la biosynthèse des polyphénols) et extrinsèques (environnement, stade de maturation et période de stockage) (**Nicoletti et al., 2015**).

En effet, les conditions expérimentales des dosages peuvent affecter les teneurs ainsi que la composition du milieu réactionnel, c'est l'exemple du réactif du Folin qui peut réagir

avec des protéines, des sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui peut influencer les résultats obtenus (**Singleton et Rossi, 1965 ; Musci et Yao, 2017**).

Les résultats du dosage montrent aussi que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes, ceci suggère que les polyphénols présents ne sont pas tous des flavonoïdes, il peut y avoir aussi la présence d'autres polyphénols tels que les tanins catéchiques ainsi que les coumarines qui ont été mises en évidence.

Selon **Zhang et al., (2011)**, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono *O*-glycosides tandis que le *n*-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-*O*-glycosides et tri-*O*-glycosides et *C*-glycosides. À partir de ces données, on peut conclure que les différents extraits contiennent des flavonoïdes, mono, di, tri et *C*-glycosides.

Les faibles teneurs en tanins condensés observés dans tous les extraits peuvent être expliquées par le fait que les plantes peuvent produire des substances polyphénoliques (tannoïdes) seulement en réponse à un stress environnemental, suscité par différents facteurs tels que la déficience en éléments nutritifs, la sécheresse, le sur chauffage (températures élevées) et l'intensité lumineuse (**Leinmüller et al., 1991 ; Josuttis et al., 2013**). Alors que la région de la récolte de notre plante d'intérêt n'obéit pas à ces conditions environnementales (**Boudy 1950**).

IV- Activités biologiques (*in vitro*)

IV- 1- Activité antioxydante

Les antioxydants exogènes peuvent réagir de plusieurs façons afin d'inhiber les phénomènes d'oxydation en utilisant trois principaux mécanismes d'action : soit par piégeage ou réduction des radicaux libres, ou par la chélation des métaux de transition. En se basant sur ces mécanismes, plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été utilisées pour l'estimation du pouvoir antioxydant mais aucune méthode universelle n'est adoptée afin de mesurer ou de quantifier l'activité antioxydante d'une manière précise. Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires serait plus informative et même nécessaire afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (**Ksouri et al., 2009**).

Dans cette étude, les extraits bruts (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) préparés à partir de la plante *Scabiosa stellata* ont été étudiés pour leurs activités antioxydantes potentielles en utilisant huit méthodes différentes: le piégeage des radicaux

libres, DPPH, ABTS, le pouvoir réducteur, le test de CUPRAC, l'inhibition du blanchiment du β -carotène, la capacité antioxydante totale (CAT), chélation du fer ferreux et la chélation des ions métalliques

IV-1-1- Piégeage des radicaux libres DPPH

Ce test est le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa rapidité, sa sensibilité, sa commodité et de sa reproductibilité (**Bozin et al., 2008 ; Nur Alam et al., 2013**)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 514–518 nm (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

Les propriétés de piégeage des radicaux libres DPPH des extraits (EP, AcOEt et n-BuOH) sont présentées dans le **Tableau15** et le profil de l'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans la **Figure 30**.

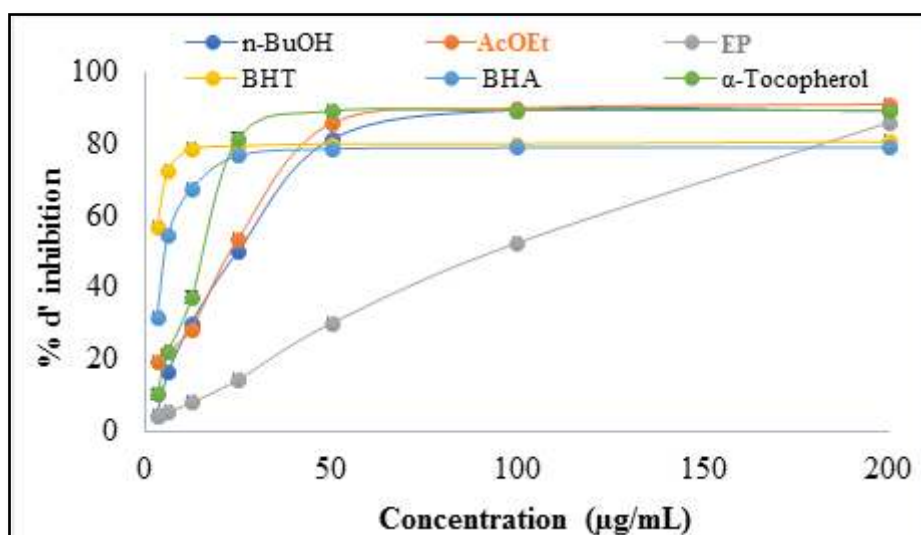


Figure 30 : Profil de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres DPPH des divers extraits de *S. stellata* L.

Tous les extraits possèdent une activité antioxydante qui varie d'une manière dose dépendante. L'extrait *n*-butanolique ($21,22 \pm 0,30$ µg/ml) présente une activité antioxydante supérieure à celle du BHT ($22,32 \pm 0,02$ µg/ml), très proche de l'extrait AcOEt ($25,15 \pm 0,68$

µg/ml) mais cette activité est relativement inférieure par rapport à la BHA ($6,82 \pm 0,49$ µg/ml), l'acide ascorbique ($3,1 \pm 0,002$ µg/ml), l'acide tannique ($7,74 \pm 0,19$ µg/ml) et l' α -tocophérol ($13,02 \pm 0,17$ µg/ml) utilisés comme standards.

Tableau 15 -Résultats des activités antioxydantes de l'espèce *S. stellata* par (DPPH, ABTS, CUPRAC et Pouvoir réducteur)

	% d'inhibition test de DPPH	% d'inhibition test d'ABTS	Absorbances test de CUPRAC	Absorbances Pouvoir réducteur
Extraits/standards	IC ₅₀ ^a (µg/mL)	IC ₅₀ ^a (µg/mL)	A _{0,50} ^a (µg/mL)	A _{0,50} ^a (µg/mL)
AcOEt	25,15 ± 0,68	14,00 ± 0,8	28.50 ± 1.24	6.54 ± 0.48
<i>n</i> -BuOH	21,22 ± 0,30	24,99 ± 0,36	42.16 ± 3.06	12.13 ± 0.52
EP	171,61 ± 0,12	64,10 ± 0.38	100.95 ± 8.06	> 50
BHA ^b	6,82 ± 0,49	1.81 ± 0.10	3.64 ± 0.19	8.41 ± 0.67
BHT ^b	22,32 ± 0,02	1.29 ± 0.30	9.62 ± 0.87	> 50
Acidetannique	7,74 ± 0,19	1.01±0.16	3.76±0,73	4.57 ± 0.30
Acideascorbique	3,1 ± 0,002	1.74±0.10	12,43±0,09	9.01 ± 0.46
α -Tocophérol	13,02 ± 0,17	7.59±0.53	19,92±1,46	34.93 ± 0.38

^aLes valeurs exprimées sont les moyennes ± écart-type de trois mesures ($p < 0,05$).^bComposés de référence. NT : non testé. ND : non détecté.

Cette activité antioxydante pourrait être attribuée à la présence de métabolites secondaires, en particulier les flavonoïdes et les polyphénols connus pour leurs activités biologiques intéressantes.

En effet, plusieurs composés phénoliques (l'acide caféique et ses dérivés, les acides quiniques...) et différentes classes de flavonoïdes (apigénine, diosmétine et lutéoline, kaempférol, quercétine et tamarixétine...) ont été précédemment isolés à partir de cette espèce. Ainsi le pouvoir antioxydants des différents extraits issus de *S. stellata* a été fortement lié à la présence de ces métabolites (**Rahmouni^a et al., 2018**). Et plusieurs flavonoïdes isolés précédemment de cette plante (isoorientine, hyperin) présentent des activités du piégeage de radical DPPH (**Lehbil^a et al., 2018**).

L'analyse des coefficients de corrélation entre les teneurs totales en composés phénoliques et flavonoïdes et les valeurs d'IC₅₀ du test de l'activité de piégeage des radicaux DPPH dans notre étude étaient hautement significatives ($R^2 = 0,984$ et $R^2 = 0,986$ respectivement). Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'activité antioxydante obtenus à partir des espèces appartenant au même genre (**Elhawary et al., 2011 ; Wang et al., 2013 ; Hlila^b et al., 2015 ; Al-Qudah et al., 2017**).

Les études menées par **Hlila et ses collaborateurs en 2013 et 2015** sur les extraits de *Scabiosa arenaria* ont montré que l'extrait acétate d'éthyle des fleurs possède la meilleure activité antioxydante par rapport aux extraits préparés à partir des fruits, tiges et racines. Les résultats des activités observés corrèlent raisonnablement avec les taux des polyphénols et des flavonoïdes mais une faible corrélation avec les taux des tannins a été remarqué. Ainsi le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des fleurs de l'espèce *Scabiosa arenaria* et l'étude de leurs activités antiradicalaires séparément montre la présence des effets de synergie liée à la forte teneur en polyphénols et en flavonoïdes (**Hlila^c et al., 2016**).

Certaines espèces du même genre ont montré des activités antioxydantes associées aux faibles valeurs de corrélation avec les taux de polyphénols et flavonoïdes. L'extrait hydroalcoolique de l'espèce *Scabiosa comosa* a montré une valeur d'IC₅₀ plus élevée par rapport à celle obtenue dans le présent travail malgré la forte teneur en polyphénols détectée dans cette espèce (**Ma et al., 2016**).

Les extraits de *Scabiosa. tschiliensis* possèdent une forte activité du piégeage de radical libre DPPH (IC₅₀ = 25,68 ± 1,21 µg/ml) associée à des valeurs de corrélations très faibles pour les taux des polyphénols et des flavonoïdes, ce qui suggère que le pouvoir antioxydant est attribué à la présence d'autres composés (**Wang et al., 2017**).

Ainsi l'activité de la plante *Scabiosa stellata* pourrait être attribuée à la présence d'autres classes de métabolites secondaires. Les irridoides (eustomorusside et eustomoside) isolés à partir de l'extrait méthanolique de l'espèce *S. stellata* ayant un pouvoir oxydant très remarquable avec des valeurs d'IC₅₀ de (7,1 ± 0,4 µg/ml et 7,2 ± 0,4 µg/ml) respectivement (**Lehbili^a et al., 2018**).

Cependant, les résultats de l'activité antioxydante par DPPH de l'extrait méthanolique (**Lehbili^a et al., 2018**) et les extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) (**Rahmouni^a et al., 2018**) de la même espèce (*S. stellata*) montrent des valeurs d'IC₅₀ élevés par rapport aux résultats obtenus dans notre étude.

La variation des résultats obtenus lors de l'étude du pouvoir antioxydant pourrait s'expliquer par la différence de réactivité des extraits due à leur complexité chimique, la variation des polarités des extraits étroitement liées aux différentes procédures adoptées pour l'extraction du matériel végétal, les conditions expérimentales et le protocole expérimental utilisé ainsi que les facteurs liés à la croissance de l'espèce végétale elle-même (région de récolte, climat et stade de maturité).

IV-1-2- Piégeage des radicaux libres ABTS

La capacité des différents extraits de *S.stellata* à inhiber le radical cation ABTS⁺ est évaluée et les résultats ont été exprimés en valeur d'IC₅₀ (µg /mL) (**Tableau15**), le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical ABTS[•] est présenté dans la figure ci-dessous (**Figure 31**).

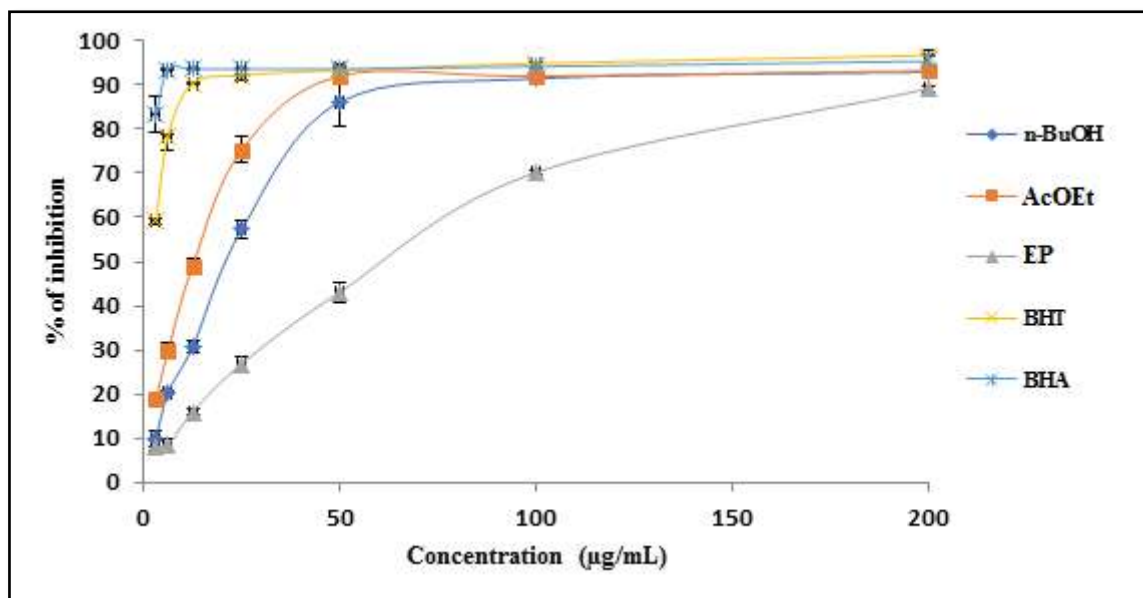


Figure 31 : Profil de l'activité antioxydante des divers extraits de *S. stellata* par piégeage des radicaux libres ABTS.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante varie considérablement entre les différents extraits, l'extrait AcOEt possède le pouvoir inhibiteur le plus important avec une valeur d'IC₅₀ de (14,00 ± 0,8 µg/ml), suivi par l'extrait *n*-BuOH (24,99 ± 0,36 µg/ml) et enfin de l'extrait de EP (64,10 ± 0,38 µg / ml).

La forte activité observée dans les extraits (AcOEt et *n*-BuOH) peut être expliquée par la nature polaire des molécules au sein de l'extrait qui est parfois un facteur déterminant de l'activité antioxydante. En effet, plusieurs études ont montré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire plus élevée.

L'étude réalisée sur les extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) de la même espèce (*S. stellata*) a montré des valeurs d'IC₅₀ supérieures à celles obtenues dans le présent travail (**Rahmouni^a et al., 2018**). La variation des résultats obtenus peut être expliquée par plusieurs facteurs incluant la différence des régions de récolte et leurs conditions environnementales qui influent ainsi sur la composition chimique de la plante.

Selon **Rahmouni et ses collaborateurs (2018)**, l'activité antioxydante des extraits bruts de l'espèce *S. stellata* est due à leur richesse en polyphénols et des flavonoïdes. Cependant, l'analyse des coefficients de corrélation entre les teneurs totales en composés phénoliques et flavonoïdes et les valeurs d'IC₅₀ du test d'activité de piégeage des radicaux ABTS n'étaient pas significatifs. Ceci mène à suggérer que l'effet antioxydant de différents extraits de l'espèce peut être dû à un synergisme entre les composés phénoliques et d'autres composés qui agissent individuellement ou en synergie pour piéger ce radical.

Les coefficients de corrélation du test d'activité de piégeage des radicaux DPPH et le test d'activité de piégeage des radicaux ABTS étaient significatifs ($R^2 = 0.946$) malgré que le pouvoir piégeur de l'ABTS est plus élevé que celui du radical DPPH dans tous les extraits. Des facteurs tels que la stéréosélectivité des radicaux ou la solubilité de l'extrait dans différents systèmes de test ont déjà été rapportés pour affecter la capacité des extraits à réagir contre différents radicaux (**Yu et al., 2002 ; Gülçin et al., 2010**).

Le radical cation ABTS a l'avantage d'être plus polyvalent que le DPPH parce qu'il est soluble dans l'eau et les solvants organiques, ce qui lui permet d'évaluer l'activité anti-radicalaire pour les échantillons hydrophiles et lipophiles (**Gülçin et al., 2012**). **Wang et ses collaborateurs (1998)** ont trouvé que certains composés ayant une activité de piégeage ABTS mais ne présentaient aucune activité de piégeage de DPPH.

Plusieurs études réalisées sur les plantes du genre *Scabiosa* ont montré l'efficacité de ces espèces comme agents antioxydants piégeurs des radicaux ABTS. Les extraits à différentes polarités préparés à partir des racines, fruits, fleurs, tiges et feuilles de *Scabiosa arenaria* possèdent des activités très remarquables envers ce radical (**Hlila et al., 2013 ; Hlila^b et al., 2015**). Les extraits organiques de *Scabiosa tschiliensis* (EP, AcOEt et *n*-BuOH) neutralisent le radical ABTS mais d'une manière moins efficace par rapport aux résultats obtenus dans la présente étude (**Wang et al., 2017**). Cependant l'extrait éthanolique de l'espèce *Scabiosa comosaa* un faible pouvoir anti radicalaire avec une valeur d'IC₅₀ de 223,5 mg/ml (**Ma et al., 2016**).

IV-1-3- Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant (le fer ferrique Fe³⁺) en lui cédant un électron pour former le fer ferreux Fe²⁺, c'est une technique rapide, simple, facile et reproductible (**Karagözler et al., 2008**), universelle et

peut être appliquée aux plantes et aux extraits organiques et aqueux (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

Le pouvoir réducteur est considéré comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle des composés ou des échantillons. De nombreuses études ont montré précédemment que le pouvoir réducteur des extraits naturels des plantes pourrait être fortement corrélé avec leurs activités antioxydantes.

Les résultats de la capacité de tous les échantillons testés (extraits et standards) à réduire le fer sont mentionnés dans le Tableau 15. En se référant aux résultats illustrés sur la Figure 32, les pouvoirs réducteurs des différents extraits et standards ont été affectés d'une manière dose-dépendante.

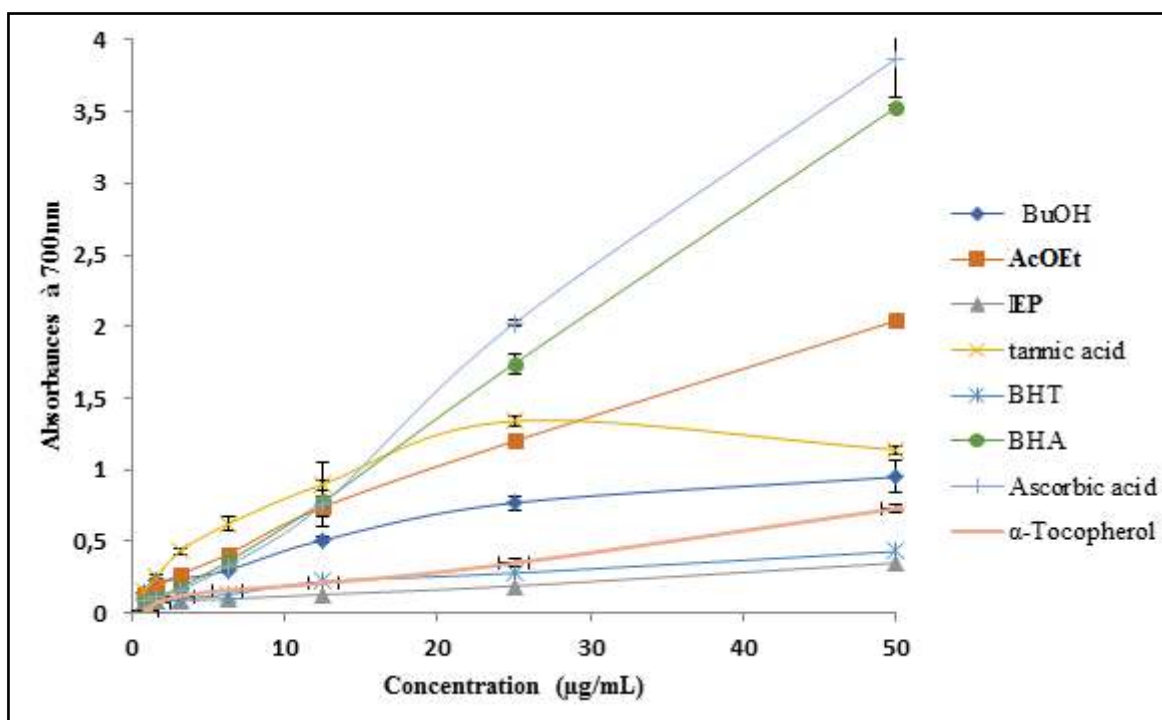


Figure 32 : Profil du pouvoir réducteur des extraits bruts de *Scabiosa stellata*.

La valeur du $A_{0.5}$ de l'extrait d'acétate d'éthyle ($6,54 \pm 0,48 \mu\text{g/ml}$) est supérieure aux valeurs de l'acide ascorbique ($9,01 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$), de l' α -tocophérol ($34,93 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$) et du BHA ($8,41 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$) en tant que standards connus pour leur potentiel antioxydant. L'extrait *n*-BuOH ($12,13 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$) a montré une activité proche des standards suivi de l'extrait éther de pétrole.

L'activité des différents extraits peut être attribuée à la présence des composés phénoliques précédemment isolés de cette espèce. Néanmoins, le contenu en polyphénols et en flavonoïdes ne sont pas les seuls facteurs liés à cette activité. La synergie possible entre les

polyphénols et d'autres composants présents dans les extraits peut être responsable de cette activité.

L'étude réalisée par **Rahmouni et ses collaborateurs (2018)** sur les extraits organiques de l'espèce *Scabiosa stellata* a trouvé des activités réductrices de fer faibles par rapport à celles obtenues avec la même la plante utilisée dans la présente étude. L'extrait dichlorométhane n'a présenté aucun effet réducteur de Fe^{3+} tandis que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique ont montré une activité modérée avec des valeurs d' EC_{50} de l'ordre de $202,41 \pm 0,1$ et $161,11 \pm 0,08$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Plusieurs études antérieures réalisées sur les plantes du genre *Scabiosa* ont montré l'efficacité de ces espèces autant que des sources d'agents donneurs d'électrons. L'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits issus de plusieurs parties de la plante *S. arenaria* a montré qu'une très forte capacité de réduction de fer est exercée par les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique des fleurs par rapport aux résultats obtenus avec l'espèce d'intérêt (*Scabiosa stellata*). Cependant, les extraits des fruits, tiges et feuilles possèdent une activité antioxydantes modérée (**Hlila et al., 2013**).

Selon l'étude de Ma et ses collaborateurs (**2017**), Les extraits préparés des deux espèces du genre *Scabiosa* (*Scabiosa comosa* et *Scabiosa tschilliensis*) réduisent le Fe^{3+} d'une manière dose-dépendente, l'extrait ethanolique de *Scabiosa tschilliensis* est plus actif (IC_{50} 16,88 $\mu\text{g/ml}$) que celui du *Scabiosa comosa* (IC_{50} 270 $\mu\text{g/ml}$) mais les deux espèces réagissent d'une manière moins efficace que l'extrait acétate d'éthyle de notre plante d'intérêt.

IV-1-4- Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

A concentration physiologique, le cuivre est un métal d'importance biologique impliqué dans de nombreux phénomènes de transport (dioxygène) et de transfert d'électron. Il constitue un cofacteur pour plusieurs enzymes (SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase) (**Sorenson 2012**).

En général, le cuivre est fortement complexé à des protéines de transport ou de stockage (transferrine, ferritine, hémosidérine) et à des enzymes (cytochromes, peroxydases, superoxyde dismutase, catalases, ...), il peut aussi exister sous une forme libre ou faiblement complexée mais à l'état de traces (**Letelier et al., 2010**).

Suite à l'entrée du cuivre dans la cellule à travers des canaux membranaires sous sa forme ionisée (Cu^{2+}), il subit une réduction Cu^{2+} par des réductases membranaires. Le Cu^{+} est

ensuite distribué par les différentes protéines chaperonnes à Cu envers différents compartiments cellulaires (Itoh *et al.*, 2009).

Cependant, en tant que métal de transition, lorsque sa concentration cellulaire est élevée le cuivre devient un agent pro-oxydant en jouant un rôle important dans le déclenchement de réactions de production des espèces réactives d'oxygène (réactions de Fenton) (Rizi *et al.*, 2017).

En effet, le Cu^+ réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour générer le radical hydroxyle (HO^\bullet), un radical très réactif et qui peut causer des dommages cellulaires. L'excès en cuivre peut induire aussi la modification des structures en doigts de zinc de certains facteurs de transcription qui ne peuvent plus se lier à l'ADN (Poprac *et al.*, 2017).

Donc la formation de complexes métalliques stables et inertes bloque les ions métalliques et les réduit, ces complexes métalliques constituent donc un mécanisme potentiel d'action antioxydante (Jomova *et al.*, 2017).

La capacité des différents extraits (EP, AcOEt, *n*-BuOH) issus de la plante *S. stellata* à réduire le cuivre a été testée et les résultats ont été comparés avec ceux du BHA et du BHT en tant que standards (Tableau 15). Les résultats obtenus montrent que l'activité augmente linéairement avec la quantité croissante d'extraits (Figure 33).

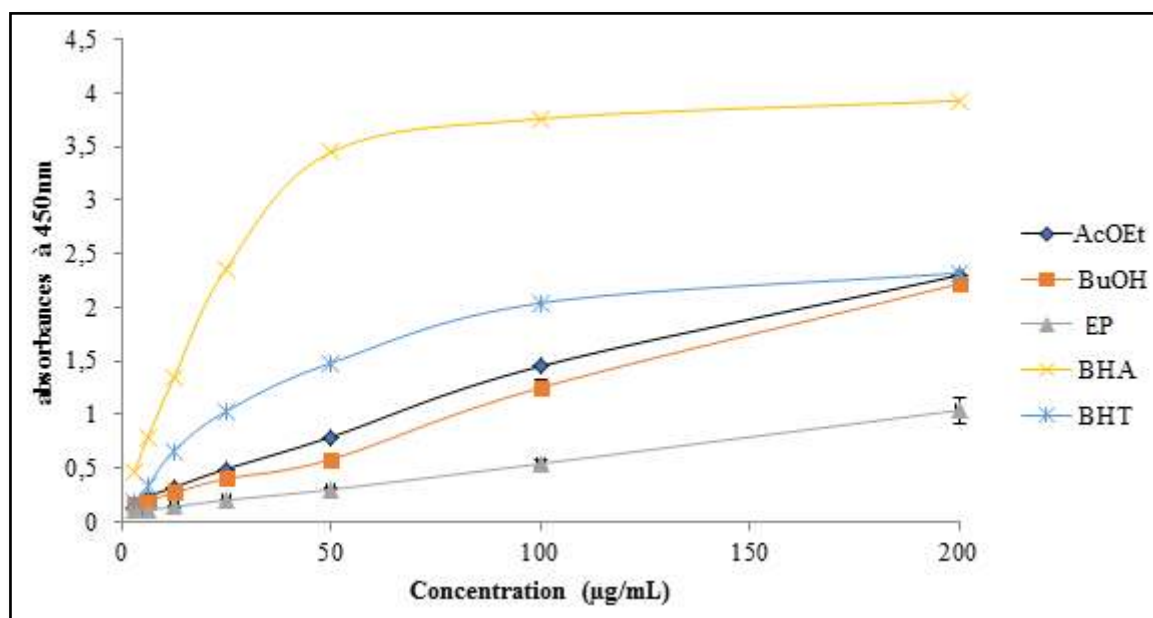


Figure 33 : Capacité antioxydante par réduction de cuivre des différents extraits de la plante *S. stellata*.

Parmi les extraits étudiés, l'extrait acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée avec une valeur de $A_{0,5}$ d'ordre de $28,50 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait *n*-butanolique ($42,16 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$) et éther de pétrole ($100,95 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$). Cependant, aucun des extraits n'exhibait une activité supérieure à celle des standards antioxydants (BHA et BHT).

En conséquence, tous les extraits organiques de l'espèce étudiée sont aptes à prévenir la surcharge excessive du cuivre dans l'organisme et de mettre en place une thérapie en favorisant la réduction de ces métaux de transition.

IV-1-5- Inhibition du blanchissement du β -carotène

L'aptitude des extraits bruts de *Scabiosa stellata* à inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration du β -carotène. En effet, toute substance chimique qui retarde la décoloration du β -carotène est considérée comme un antioxydant capable de ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides. L'activité antioxydante totale des extraits a été comparée aux BHT et BHA au tant que standards. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 16** et la **Figure 34**.

Tableau 16 -Résultats des activités antioxydantes des extraits organiques de l'espèce *Scabiosa stellata* par (β -carotène, CAT, Chélation du fer ferreux et des ions métalliques)

	Blanchiment du β -carotène	Activité antioxydante totale (TAC)	Chélation du fer ferreux	Chélation des ions métalliques
Extraits/ standards	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	$\mu\text{g EAA/ mg d'extract}$	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
AcOEt	10.34 ± 0.35	0.0660 ± 0.003	5.026 ± 0.073	> 200
<i>n</i> -BuOH	50.01 ± 0.89	0.03 ± 0.015	1.652 ± 0.014	145.35 ± 0.34
EP	11.18 ± 0.01	0.0885 ± 0.005	ND	ND
BHA	1.05 ± 0.01	NT	NT	NT
BHT	0.90 ± 0.02	NT	NT	NT
EDTA	NT	NT	0.0627 ± 0.0113	8.57 ± 0.14

^aLes valeurs exprimées sont les moyennes \pm écart-type de trois mesures ($p < 0,05$). ^bComposés de référence. NT : non testé. ND : non détecté.

D'après ces résultats, il apparaît qu'il y a une diminution des absorbances au cours du temps, ce qui prouve que l'oxydation du β -carotène est continue. Cependant, la présence des extraits ou des antioxydants standards (BHT et BHA) diminue différemment le degré de l'oxydation et par conséquent l'inhibition de la décoloration du β -carotène en comparaison avec le témoin négatif (méthanol).

L'extrait acétate d'éthyle montre la plus grande activité inhibitrice de l'oxydation du couple (acide linoléique/ β -carotène) avec une valeur d' IC_{50} de $10,34 \pm 0,35 \mu\text{g} / \text{ml}$, suivi par l'extrait éther de pétrole ($IC_{50}=11,18 \pm 1,01 \mu\text{g}/\text{ml}$) et *n*-butanolique ($50,01 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{ml}$) mais cette activité reste significativement inférieure à celle du BHT et BHA utilisés comme standards qui ont montré une forte activité antioxydante avec des valeurs d' IC_{50} de $1,05 \pm 0,01$ et $0,90 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement.

L'importante activité antioxydante totale de l'extrait éther de pétrole dans le système acide β -carotène-linoléique pourrait être attribuée aux molécules de faible polarité (acides gras et stérols) qui réagissent dans ces systèmes non polaires. En effet ce test est reconnu par sa haute spécificité pour les composés lipophiles, car le mélange réactionnel utilisé pour mesurer cette activité est une émulsion (Gachkar *et al.*, 2007).

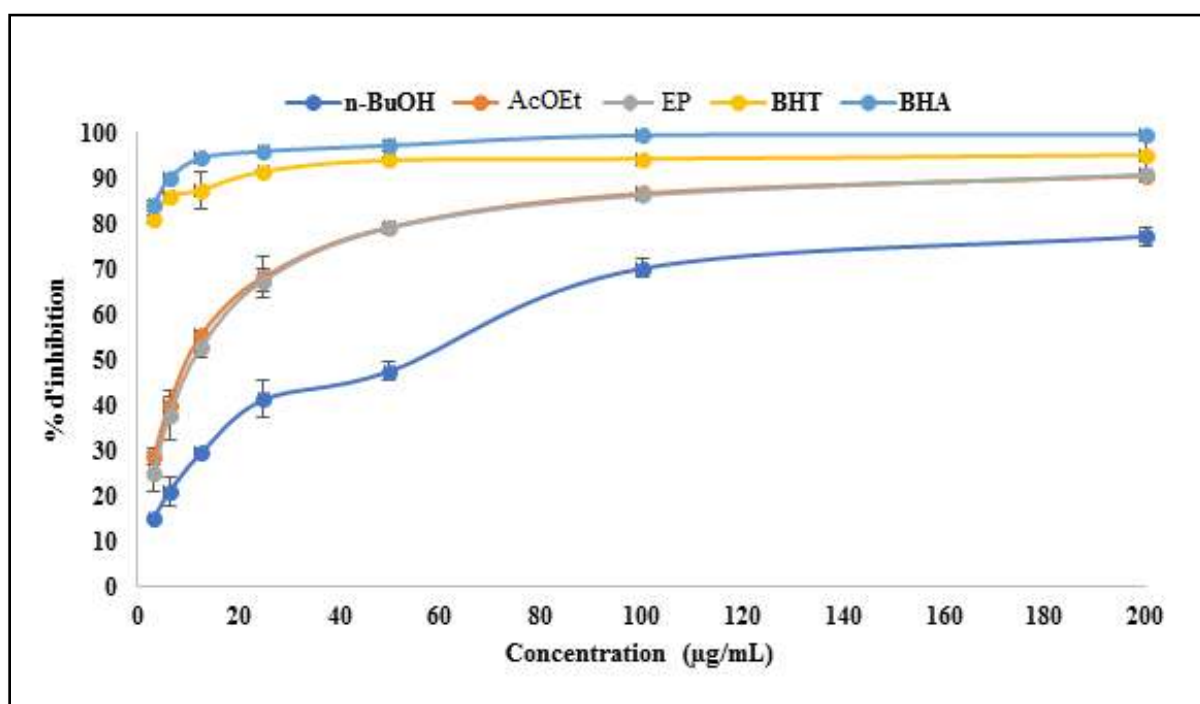


Figure 34 : Activité antioxydante par le test de blanchiment du β -carotène

La participation des différents métabolites secondaires précédemment dosés (polyphénols, flavonoïdes et tannins condensés) dans l'inhibition de blanchiment du β -carotène est évaluée par la mesure des coefficients de corrélation et les résultats obtenus montrent que les coefficients de corrélation sont très faibles, ce qui prouve que les molécules quantifiées dans cette étude n'ont pas une influence sur l'inhibition de blanchiment du β -carotène.

En effet, le test de blanchiment du β -carotène est un système qui utilise une émulsion de lipides dans l'eau. Les différences de solubilité des molécules et leur répartition entre les deux phases influencent fortement leur capacité antioxydante.

Suite à l'ajout des extraits, les antioxydants apolaires se concentrent à l'interface lipide-eau, ce qui inhibe la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, donc ils exposent des propriétés antioxydantes importantes alors que les antioxydants polaires sont moins efficaces dans l'inhibition de la peroxydation lipidique car ils restent dans la phase aqueuse.

Les espèces du genre *Scabiosa* présentent de fortes activités inhibitrices du blanchiment du β -carotène par rapport aux résultats obtenus dans la présente étude, les extraits moyennement polaires (AcOEt) des feuilles, fruits, tiges et fleurs de l'espèce *S. arenaria* possèdent un pouvoir antioxydant très puissant qui corrèle avec leurs fortes teneurs en polyphénols (Hlila *et al.*, 2013) mais les extraits des racines de cette espèce possèdent une activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène modérée proche à celle obtenue avec les extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *Scabiosa stellata* (Hlila^a *et al.*, 2015).

IV-1-6- Capacité antioxydante totale (CAT)

L'activité antioxydante totale des extraits bruts (EP, EtOAc et *n*-BuOH) a été évaluée par la transformation de MoVI en MoV pour obtenir un complexe phosphomolybdène qui peut être suivi spectrophotométriquement. C'est un essai direct employé principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatiques. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 16** et les valeurs sont exprimées en microgrammes équivalents d'acide ascorbique par milligramme de l'extrait séché ($\mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) (**Figures 35 et 36**).

D'après les résultats, l'extrait apolaire (EP) et moyennement apolaire (AcOET) sont plus actifs que l'extrait polaire (*n*-BuOH). Ces résultats sont tout à fait contraires à ceux obtenus par les autres tests. Cette contradiction est due certainement aux types des tests utilisés et le mécanisme des réactions mises en jeu. Plusieurs études ont montré que les extraits riches en lipides et en acides gras possèdent des pouvoirs antioxydants très importants dans les systèmes apolaires (Sahreem *et al.*, 2010 ; Khatoon *et al.*, 2013)

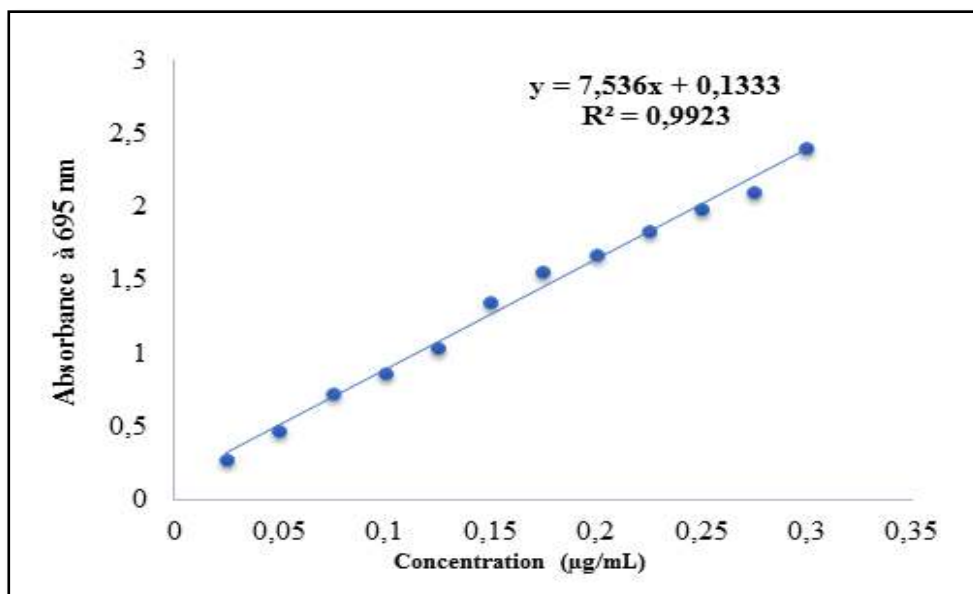


Figure 35 : Droite d'étalonnage d'acide ascorbique (capacité antioxydante totale)

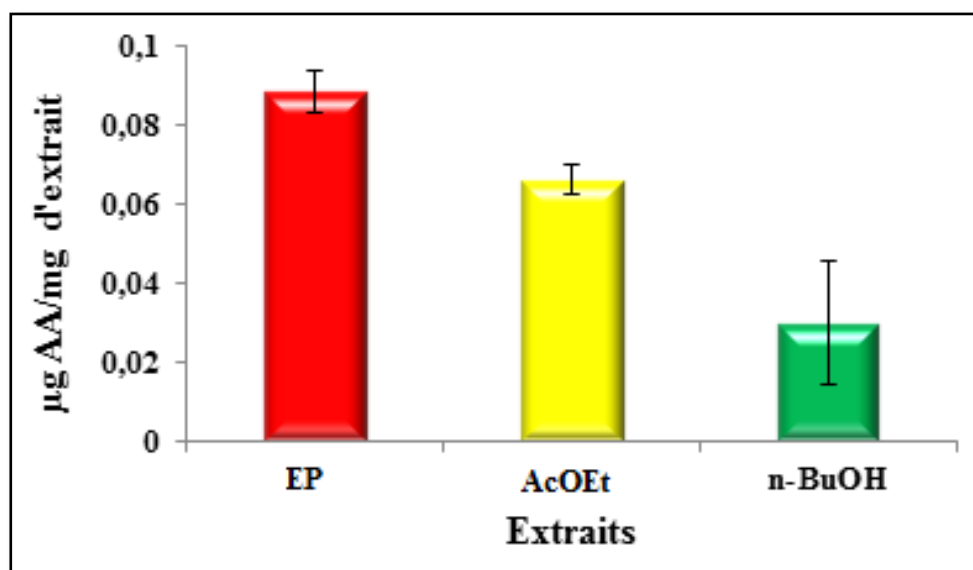


Figure 36 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits bruts obtenus à partir de *Scabiosa stellata*

L'établissement de la relation entre et la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins des différents extraits n'a montré aucune corrélation positive entre les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes avec la capacité antioxydante totale mais une faible corrélation est observée avec les teneurs en tanins ($R^2 = 0.108$).

L'absence de la corrélation avec les taux des polyphénols et des flavonoïdes nous mène à suggérer que la capacité antioxydante totale des extraits est due à la présence d'autres

composés non phénoliques qui peuvent réagir dans les milieux réactionnels tamponnés et résister les conditions d'incubation.

IV-1-7- Chélation du fer ferreux et chélation des ions métalliques

Le fer est connu comme le pro-oxydant le plus important des lipides en raison de sa grande réactivité. En effet, les métaux de transition comme le fer ferreux (Fe^{+2}) peuvent faciliter la production des espèces réactives de l'oxygène dans les systèmes biologiques en stimulant ainsi l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton et en accélérant également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux pyroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique. Donc, la capacité de chélation des métaux est importante car elle réduit notamment la concentration des métaux de transition et retarde l'oxydation catalysée par ces derniers (Halliwell et Gutteridge, 1984).

Pour cette raison la capacité chélatrice des différents extraits issus de la plante *S. stellata* ont été évaluées par deux méthodes différentes : Chélation du fer ferreux et chélation des ions métalliques. Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux et métalliques (Tableau 16) ont révélé que l'extrait *n*-BuOH (Figure 39) a une activité chélatrice modérée par rapport à l'EDTA en tant que contrôle positif. L'extrait AcOEt présente une faible activité alors que l'extrait éther de pétrole n'a aucune activité chélatrice (Figures 37 et 38).

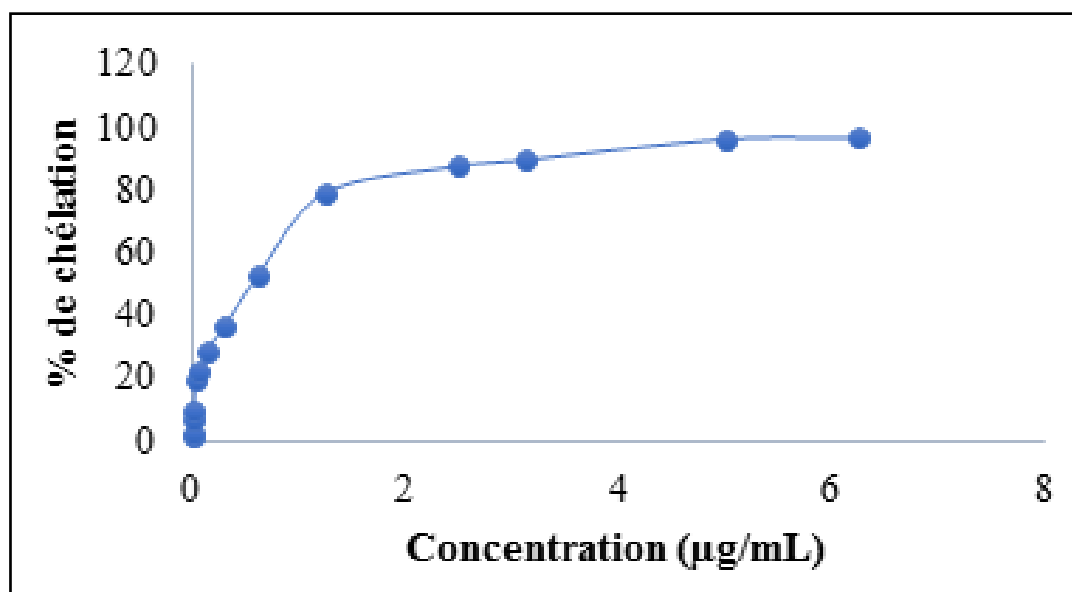


Figure 37 : Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (EDTA)

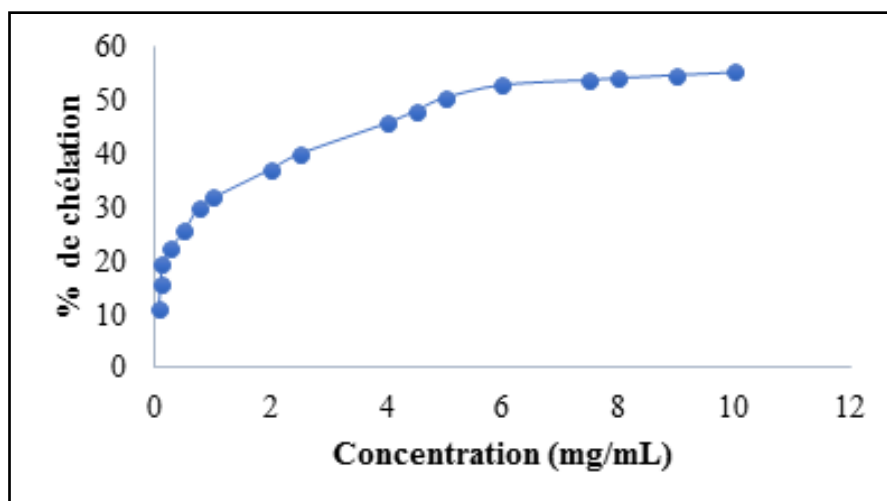


Figure 38 : Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (Extrait AcOEt)

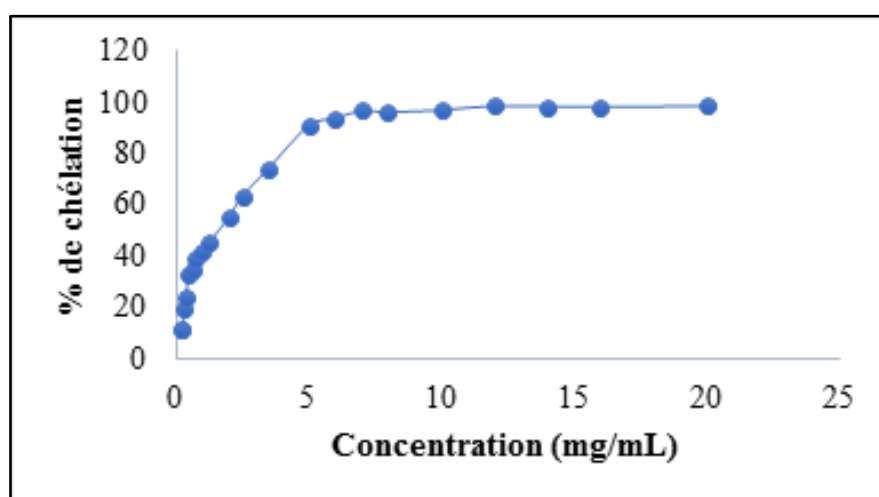


Figure 39 : Activité antioxydante par chélation du fer ferreux (Extrait *n*-BuOH)

IV-2- Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits bruts obtenus à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* a été estimée par le test de diffusion sur disque agar contre dix souches bactériennes. Les moyennes des zones d'inhibition ont été calculées et les résultats ont été présentés dans le Tableau 17.

Tous les extraits testés ont montré une inhibition de la croissance bactérienne contre au moins deux souches ; les résultats ont également montré que l'activité des extraits contre les bactéries sensibles augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les souches (*Staphylococcus albus*, *Pseudomonas areginosa* ATCC 15442 et *Salmonella typhimurium*) sont les souches les plus résistantes à tous les extraits de la plante

sans aucune zone d'inhibition produite autour des disques. L'absence de l'activité antibactérienne des extraits de la plante envers ces souches pourrait être expliquée par beaucoup de facteurs qui sont liés soit à la nature de la plante ou au mauvais choix de techniques, conditions et outils de manipulations.

La faible concentration ou l'absence des molécules possédant l'activité antibactérienne dans les extraits testés pourrait être due à la perte des composés thermolabiles au cours du broyage ou au cours de la conservation de la plante (**Azwanida 2015 ; Barba et al., 2016**).

Le mauvais choix de la méthode adopté pour la réalisation de l'activité antibactérienne peut ainsi expliquer la résistance bactérienne observée. En effet, **Jorgensen et Turnidge (2015)** ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits est plus adaptée et reproductible pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits organiques que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les solvants utilisés pour la procédure d'extraction et pour la solubilisation des dilutions peuvent influencer la composition chimique des extraits induisant ainsi la diminution de leurs activités antibactériennes (**Balouiri et al., 2016**). Selon **Ciobanu et ses collaborateurs (2012)**, l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité antibactérienne.

Mais l'absence de l'activité de ces extraits envers ces souches *in vitro* ne peut pas conditionner leurs activités antibactériennes *in vivo*. Certains métabolites de la plante peuvent être actifs sans être métabolisés et dans ce cas leur activité *in vitro* et *in vivo* sera détectable, cependant certains métabolites ne sont actifs qu'après leur métabolisation et dans ce cas ils seront inactifs *in vitro* alors qu'ils sont actifs *in vivo* (**Tan et Lim., 2015**).

Tableau. 17- Activité antibactérienne des extraits de l'espèce *Scabiosa stellata* exprimée en les diamètres des zones d'inhibition en mm ± SD.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais)

		Zone d'inhibition (mm)									
		Souches à Gram-positives				Souches à Gram-négatives					
Extraits	Concentration (g/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus albus</i>	<i>Enterococcus sp</i>	<i>Streptococcus D</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Pseudomonas areginosa</i> ATCC 15442	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterobacter sakazaki</i>
EP	1/1	18 ± 0.2	-	09 ± 0.1	-	12 ± 0.1	-	-	-	-	-
	1/2	15 ± 0.1	-	-	-	10 ± 0.2	-	-	-	-	-
	1/4	12 ± 0.3	-	-	-	09 ± 0.2	-	-	-	-	-
	1/8	09 ± 0.1	-	-	-	08 ± 0.1	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcOEt	1/1	13 ± 0.2	-	09 ± 0.3	09 ± 0.1	10 ± 0.1	-	14 ± 0.1	20 ± 0.1	-	-
	1/2	10 ± 0.1	-	-	-	09 ± 0.2	-	10 ± 0.3	18 ± 0.4	-	-
	1/4	09 ± 0.1	-	-	-	-	-	09 ± 0.1	17 ± 0.1	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	17 ± 0.3	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	16 ± 0.2	-	-
	1/32	-	-	-	-	-	-	-	14 ± 0.1	-	-
n-BuOH	1/1	-	-	-	-	-	-	10 ± 0.1	-	-	10 ± 0.1
	1/2	-	-	-	-	-	-	09 ± 0.1	-	-	09 ± 0.1
	1/4	-	-	-	-	-	-	08 ± 0.5	-	-	08 ± 0.1
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L'extrait d'éther de pétrole a une activité antibactérienne contre une souche à Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une autre à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 35218) avec des valeurs CMI de l'ordre de 0,125 g/ml.

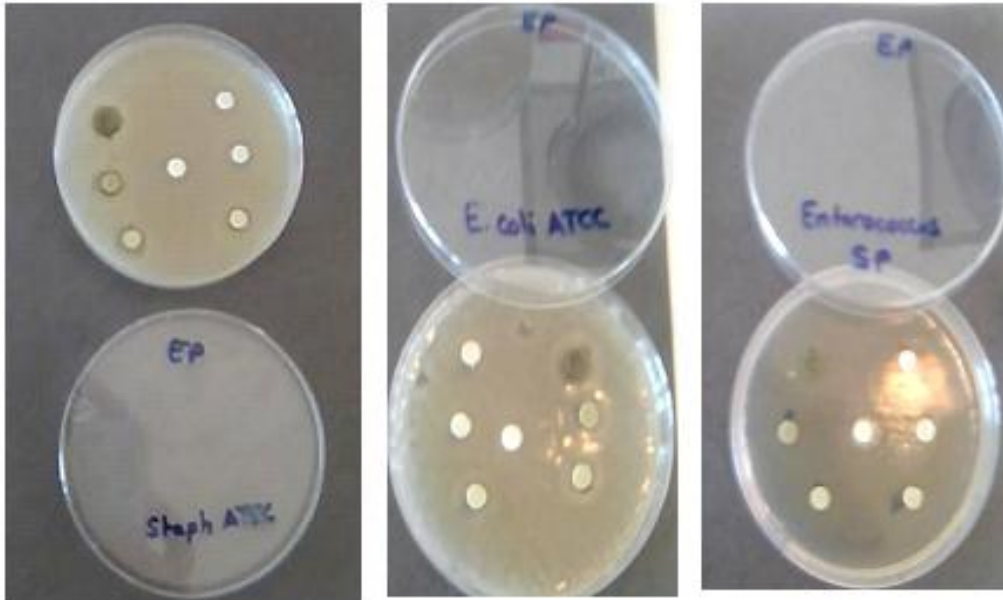


Figure 40 : Souches sensibles pour l'extrait d'éther de pétrole de l'espèce *S. stellata*.

La résistance des cinq souches à Gram négatif envers l'extrait d'éther de pétrole est due probablement à leur structure multicouche liée à une membrane cellulaire externe présentant une perméabilité sélective et une surface des lipopolysaccharides qui contient des charges négatives empêchant ainsi la diffusion des molécules hydrophobes et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire. Ces causes pourraient expliquer partiellement la résistance des souches à Gram négatives à l'extrait EP qui a montré une richesse en composés apolaires.

Au sein du même genre (*staphylococcus*), l'activité antibactérienne de l'extrait EP ne touche que l'espèce *S. aureus* et non *S. albus*, ce qui reflète la spécificité de l'activité antibactérienne des métabolites actifs par rapport à l'espèce bactérienne. Cette caractéristique de spécificité est recherchée dans les antibactériens utilisés pour traiter les pathologies causées par des bactéries spécifiées. La sensibilité de *S.aureus* pour l'extrait d'éther de pétrole est due probablement à une cause génétique en s'exprimant par un récepteur bactérien spécifique au métabolite antibactérien présent dans cet extrait.

L'extrait *n*-butanolique n'a aucun effet sur toutes les souches à Gram positif testées mais cet extrait présente une activité antibactérienne contre deux souches à Gram négatif (*Acinetobacter baumannii* et *Enterobacter sakazaki*) avec des valeurs de CMI à 0,25 g/ml.



Figure 41 : Souches sensibles à l'extrait *n*-butanolique de l'espèce *S. stellata*.

L'extrait acétate d'éthyle s'est avéré être l'extrait le plus efficace contre les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* D) et trois souches à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*). La plus grande zone d'inhibition (20 mm) a été observée contre la souche clinique (*Proteus mirabilis*) avec une valeur de CMI de 0,0156 g/ml, cette souche est considérée comme une cause fréquente d'infections nosocomiales et urinaires (**Burke et al., 1971**) et l'une des souches les plus résistantes aux antibiotiques (**Wang et al., 2009**) (**Figure 42**).

Cet extrait a montré également une activité antibactérienne contre deux des souches les plus impliquées dans l'empoisonnement alimentaire (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 35218) avec des CMI à 0,25 g/ml et 0,125g/ml respectivement. Donc, cet extrait peut être utilisé pour la prévention des maladies d'origine alimentaire ou comme un agent de conservation dans l'industrie alimentaire (**Mahboubi et al., 2015**).

L'activité antibactérienne observée dans tous les extraits organiques de l'espèce *Scabiosastellata* pourrait être due à la présence de différentes classes de métabolites secondaires connues par leurs propriétés antibactériennes à savoir : les flavonoïdes, saponines, tannins, quinones et stérols et triterpénoïdes. (**Daglia 2012 ; Najafi 2013 ; Kumar et Pandey, 2013 ; Singh et Sharma, 2016 ; Usman et al., 2018**).

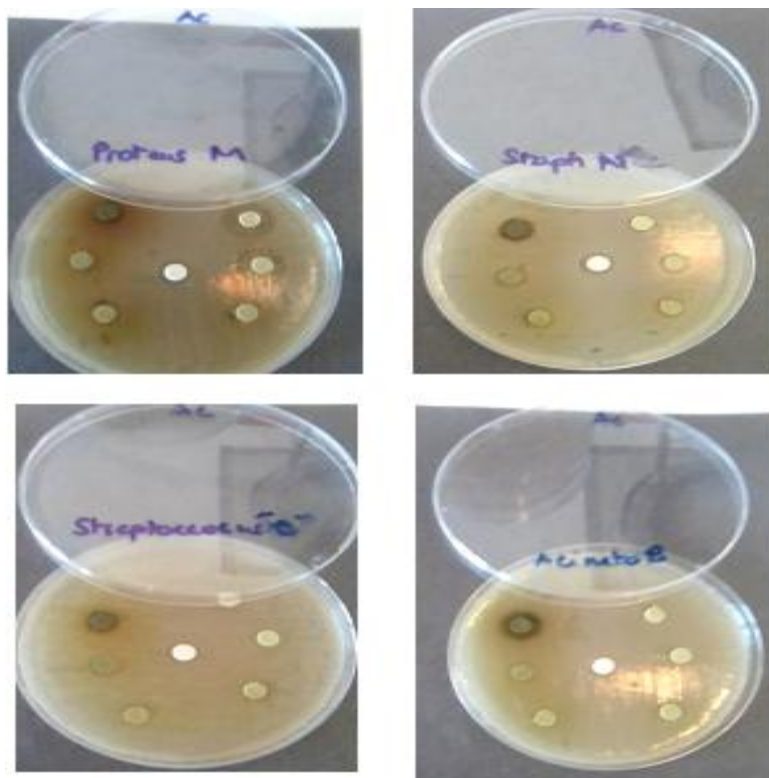


Figure 42 : Souches sensibles à l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *S.stellata*.

Les résultats obtenus dans des études antérieures portant sur l'activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique (EtOH-H₂O : 70 %) de *S. stellata* contre 18 microorganismes incluant 17 bactéries à Gram positif et une bactérie Gram négatif différentes de celles utilisées dans notre étude, ont montré une activité bactérienne modérée à faible (**Lehbili^a et al., 2018**).

Cependant, des études antérieures menées sur l'activité antibactérienne de certaines espèces du genre *Scabiosa* indiquent que les huiles essentielles pourraient être plus actives que les extraits bruts. Les huiles essentielles de *S. arenaria* ont été testées contre 16 souches bactériennes, et les résultats ont montré une activité modérée contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus* et *Acinetobacter baumannii* (**Hlila^c et al, 2016**) tandis que les extraits bruts obtenus à partir de *S. columbaria* n'ont pas d'activité antimicrobienne sur toutes les souches testées (**Benli et al, 2008**).

Les extraits méthanoliques et chloroformiques préparés à partir de l'espèce *Scabiosa hymettia* Boiss ont montré une activité antimicrobienne modérée contre toutes les souches bactériennes et fongiques testées (**Christopoulou et al., 2008**).

Les variations de la composition chimique peuvent probablement expliquer les différences observées dans l'activité antibactérienne des extraits d'une même espèce végétale ou de différentes plantes. L'efficacité optimale d'un extrait ne peut pas être due à un constituant actif principal mais à l'action combinée de différents composés à l'origine de cet extrait.

IV-3- Test de toxicité *in vitro* sur les larves d'*Artemia salina*

Le test de Brine shrimp représente un bio essai rapide, peu coûteux et simple largement utilisé pour vérifier l'effet cytotoxique des pesticides (Michael *et al.*, 1956), des métaux lourds (Saliba et Krzyz, 1976), des produits chimiques (Carballo *et al.*, 2002), des toxines (Harwing et Scott, 1971 ; Hisem *et al.*, 2011) et des nanostructures (Maurer-Jones *et al.*, 2013). C'est un test préliminaire de toxicité des extraits de plantes (Ghosh *et al.*, 2015, Kibiti et Afolayan, 2016).

Dans la plupart des cas, les résultats de ce test corréle raisonnablement avec les propriétés cytotoxiques et antitumorales de certaines molécules (Meyer *et al.*, 1982 ; Quazi Sahely *et al.*, 2017). Pour évaluer toute action cytotoxique possible, les extraits bruts de l'espèce *Scabiosa stellata* ont été soumis à cet essai et les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 43).

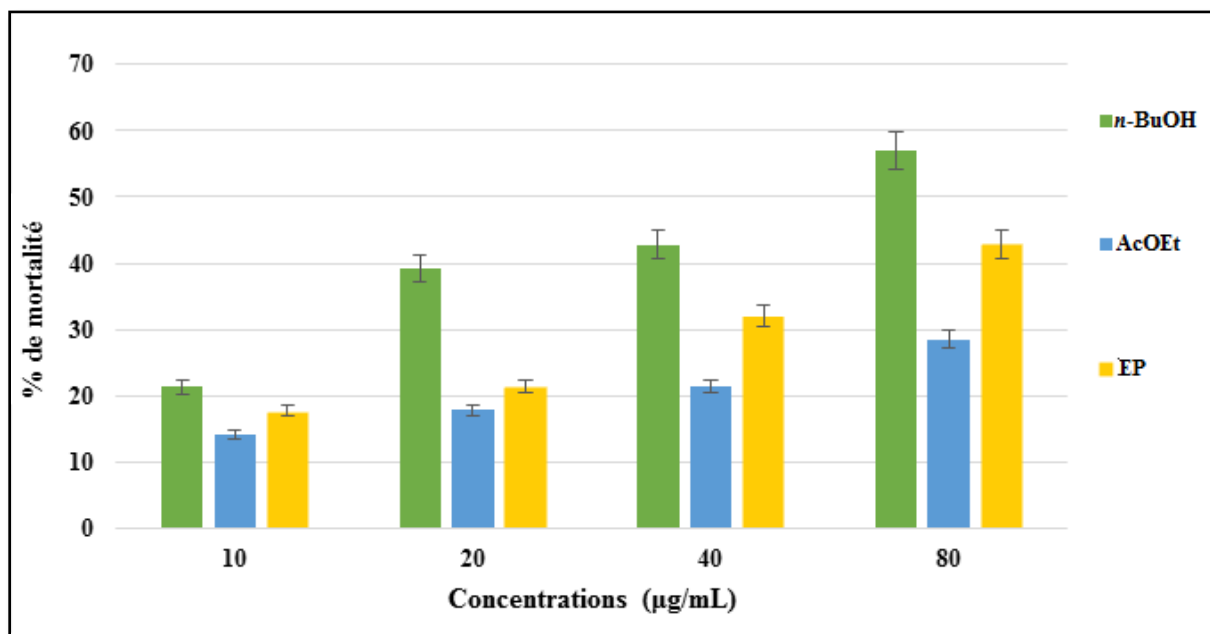


Figure 43 : Pourcentage de mortalité observé après le traitement des *napauli* avec les extraits bruts de *S. stellata* à différentes doses.

D'après les résultats, aucune mortalité n'a été observée dans le groupe contrôle négatif (DMSO). L'extrait *n*-butanolique est le plus toxique pour les *napauli*, avec une valeur de CL_{50} de $35,7 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une mortalité de 28,5% à 80 $\mu\text{g/ml}$ alors que l'extrait EP induit une mortalité de 42,8 % à la même concentration.

Selon le critère de toxicité de Clarkson (**Clarkson et al., 2004**), les extraits acétate d'éthyle et éther de pétrole sont modérément toxiques alors que l'extrait *n*-butanolique est hautement toxique. En effet, de nombreuses recherches démontrent que des extraits ou composés ayant un effet cytotoxique pourraient constituer un agent antitumoral efficace et utile dans le traitement des cancers (**Meyer et al., 1982**).

La cytotoxicité significative de l'extrait *n*-butanolique peut s'expliquer par la présence de métabolites secondaires à activité cytotoxique par rapport aux extraits AcOEt et EP. Le résultat du criblage phytochimique indique clairement que l'extrait de *n*-BuOH contient des saponines absentes dans les autres fractions. Ces composés sont bien connus en tant que métabolites secondaires ayant des effets cytotoxiques apoptiques et des activités antiprolifératives (**Cheng et al., 2014; Zong et al., 2015**).

Cependant l'évaluation de la cytotoxicité de huit saponines triterpénoïdes isolés à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* nommés: scabiostellatosides A, B, C, D, E, F, G et H contre la lignée cellulaire de fibrosarcome humain (HT1080) a montré que seul le Scabiostellatoside F possède une cytotoxicité modérée avec une valeur IC_{50} de 12,0 mM (**Lehbili^a et al., 2018**). L'effet cytotoxique de l'extrait *n*-butanolique pourrait être également lié à aux propriétés lytiques induisant une instabilité membranaire.

IV-4-Activité anti-inflammatoire *in vitro*

La dénaturation des protéines est un processus pathologique par lequel les protéines perdent leur configuration (structures secondaire et tertiaire) et deviennent inactives. Cela se produit généralement lorsque les protéines sont exposées à un stress externe comme la chaleur, un acide fort ou une base (**Kar et al., 2012**). La dénaturation des protéines peut avoir lieu même par un processus inflammatoire auto-immune dans lequel la production d'auto-antigènes est augmentée comme dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (**Singh et al., 2013**)

En effet, il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométhazine inhibent non seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires mais inhibent aussi la dénaturation des protéines. Ainsi, tout produit qui empêche la dénaturation des protéines peut être un anti-inflammatoire efficace.

Pour cette raison, l'effet anti-inflammatoire des extraits bruts a été évalué par la méthode de dénaturation de la BSA et les résultats ont été comparés à ceux de l'ibuprofène comme médicament standard (**Tableau 18**).

Tous les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) et le médicament standard empêche la dénaturation de l'albumine de sérum bovin d'une manière dose-dépendante. L'ibuprofène en tant que médicament anti-inflammatoire standard a montré l'inhibition maximale (100 %) à la concentration de 1000 µg/ml. Le pourcentage maximal d'effet inhibiteur (78,86 %) a été observé dans l'extrait d'acétate d'éthyle suivi de l'extrait d'éther de pétrole (16,02 %) puis dans l'extrait *n*-butanolique 3,21 % avec le plus faible pourcentage d'inhibition à la même concentration (1000 µg/ml).

Tableau18 - Résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de la plante *S. stellata*.

Extraits / standard	Concentration en (PPM)	Inhibition de dénaturation (%)
Ibuprofène	1000	100 ± 0,3
	500	100 ± 0,1
	250	92 ± 0,2
	125	61 ± 0,2
	62.5	37 ± 0,3
EP	1000	16,0 ± 0,1
	500	5,6 ± 0,1
	250	4,0 ± 0,1
	125	0,4 ± 0,2
	62,5	-1,6 ± 0,3
AcOEt	1000	78,8 ± 0,4
	500	69,5 ± 0,1
	250	58,9 ± 0,1
	125	47,6 ± 0,2
	62,5	20,3 ± 0,0
<i>n</i> -BuOH	1000	3,2 ± 0,3
	500	1,8 ± 0,1
	250	-1,7 ± 0,6
	125	-2,4 ± 0,4
	62,5	-5,8 ± 0,1

D'après les résultats, nous constatons que tous les extraits issus de la plante *Scabiosa stellata* sont capables d'empêcher l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines et peuvent contrôler la production d'auto-antigènes provenant de la dénaturation des protéines.

L'activité anti arthritique observées dans les extraits organiques de l'espèce *S. stellata* pourrait être due à sa composition chimique surtout en flavonoïdes, polyphénols, saponines et stérols. Ces métabolites sont reconnus par leurs pouvoirs anti-inflammatoires et antiarthritiques en réduisant l'indice de l'arthrite et en diminuant les taux de IL-1B et TNF- α dans les tissus enflammés des rats arthritiques (**Rahman et al., 2015 ; Petchi et al., 2013 ; Cheeke et al., 2006**).

IV- 5- Activité hémolytique

Le modèle érythrocytaire a été largement utilisé pour vérifier l'indication directe de la toxicité de la membrane. Pour déterminer si l'activité cytotoxique est liée à un dommage direct sur la membrane ou non.

L'utilité de ce test vient du fait que le matériel biologique nécessaire pour sa réalisation est disponible, le sang. Ainsi les globules rouges sont facilement isolés à partir du sang ; de plus, la membrane érythrocytaire présente des similitudes avec d'autres membranes cellulaires (**Noudeh et al., 2010**), pour ces raisons, l'hémolyse des globules rouges humains induite par les extraits organiques obtenus de *S. stellata* est évaluée et les résultats obtenus sont mentionnés dans le **Tableau 19**.

Les résultats ont montré que l'activité hémolytique des extraits bruts augmentait de manière dose-dépendante. L'extrait butanolique présentait un effet hémolytique en hauteur sur les érythrocytes humains avec une valeur de EC₅₀ de $37,25 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$, l'extrait AcOEt présentait une activité hémolytique modérée avec une CE50 de $106,57 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ alors que l'extrait de EP ne montre aucun pouvoir hémolytique à toutes les concentrations testées.

Tableau 19- Résultats de l'activité hémolytique des extraits bruts de *S. stellata*

Extraits	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
	62.5	125	250	500	EC ₅₀
EP	0.01 \pm 0.08	0.08 \pm 0.16	1.18 \pm 0.43	3.04 \pm 0.22	> 500
AcOEt	35.32 \pm 0.85	55.72 \pm 0.26	64.52 \pm 0.39	71.02 \pm 0.57	106.57 \pm 0.28
<i>n</i> -BuOH	58.02 \pm 0.85	63.47 \pm 0.32	74.62 \pm 0.14	80.97 \pm 0.20	37.25 \pm 0.52

L'effet dose dépendant des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) sur Le décroissement de la résistance de la membrane cellulaire des globules rouges peut être expliqué par la présence des molécules hémolytiques en faible quantité et que plus la concentration de l'extrait augmente plus le taux de ces molécules augmente et par conséquent le pouvoir hémolytique devient très important.

En plus, l'activité hémolytique des extraits bruts (*n*-BuOH et AcOEt) est probablement liée à leur composition chimique. Plusieurs études ont montré que la capacité à lyser les érythrocytes est l'une des caractéristiques les plus importantes des saponines (**Sharma *et al.*, 2012**) qui ont déjà été isolés à partir de l'extrait *n*-butanolique. L'origine du phénomène est généralement attribuée à leurs propriétés amphiphiles due à la présence de la fraction glucidique. En effet, le nombre des unités d'ose et/ou dérivés d'ose et la position de liaison de ces unités avec les saponines influencent fortement sur la capacité hémolytique de ces molécules mais il y a un manque de connaissance des besoins moléculaires intimes pour cette activité (**Voutquenne *et al.*, 2002**).

Les iridoïdes préalablement purifiés à partir de l'extrait éthanolique de *S. stellata* (**lehbili^a *et al.*, 2018**) pourraient constituer la principale cause de l'hémolyse observée dans les extraits *n*-BuOH et AcOEt. En effet, de nombreuses études ont montré que les glycosides iridoïdes induisent une anémie hémolytique et une diminution significative des taux des globules rouges et de l'hémoglobine (**Zhang *et al.*, 2017**).

Cependant, l'absence de l'effet hémolytique observé au niveau de l'extrait éther de pétrole est probablement liée à la nature des composés apolaires qui le constituent. l'intervention des molécules apolaires dans la protection des globules rouges a été déjà signalée (**Takebayashi *et al.*, 2010**).

Chisté et ses collaborateurs (2014) ont aussi montré que les caroténoïdes (β -carotène, zeaxanthine, lutéine et lycopène) qui sont des pigments liposolubles, sont cinq fois plus efficaces que la quercétine, le trolox et la vitamine C dans la protection des globules rouges.

IV- 6- Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui se développe progressivement. Le profil neuropathologie de cette maladie est associé à une perte de mémoire, de la cognition, du raisonnement et de la stabilité comportementale mène inexorablement à la démence globale et à la mort prématurée du patient (**Selkoe 2015**).

Ces symptômes sont dus à la dégénérescence ou l'atrophie des neurones cholinergiques du prosencéphale basal. La mort des neurones au cours de la progression de la maladie d'Alzheimer affecte généralement les niveaux de neurotransmetteurs du cerveau (l'ACh, le glutamate et la sérotonine) (**Reitz et Mayeux, 2014**).

Il n'y a malheureusement pas de remède pour la maladie d'Alzheimer, les stratégies actuelles de traitement sont principalement symptomatiques. Ils visent à cibler l'inhibition de l'acétylcholinestérase pour améliorer la neurotransmission cholinergique dans le cerveau (**Schelterns et Feldman, 2003 ; Kumar et Singh, 2015**).

Actuellement, le seul traitement pour cette maladie est l'usage des inhibiteurs de l'acétyl- et de la butyrylcholinestérase considérées comme des enzymes clés qui jouent un rôle important dans la transmission cholinergique en hydrolysant l'acétylcholine (**Zemek et al., 2014**).

Plusieurs inhibiteurs synthétiques sont utilisés cliniquement (le donépézil, la tacrine, la rivastigmine et la galantamine) mais ils présentent une efficacité limitée, des problèmes de biodisponibilité et certains effets secondaires (troubles gastro-intestinaux, nausées, vomissements et diarrhées) (**Colovicet al., 2013**). Pour toutes ces raisons, la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'AChE ou de la BChE à partir de sources naturelles représente un domaine d'investigation prometteur (**Mukherjee et al., 2007 ; Murataet al., 2015 ; Braidy et al., 2017**)

Les extraits bruts de *S. stellata* ont été testés pour leurs activités inhibitrices de l'AChE par la méthode spectrophotométrique d'Ellman et les résultats sont reportés dans la **Figure 44**.

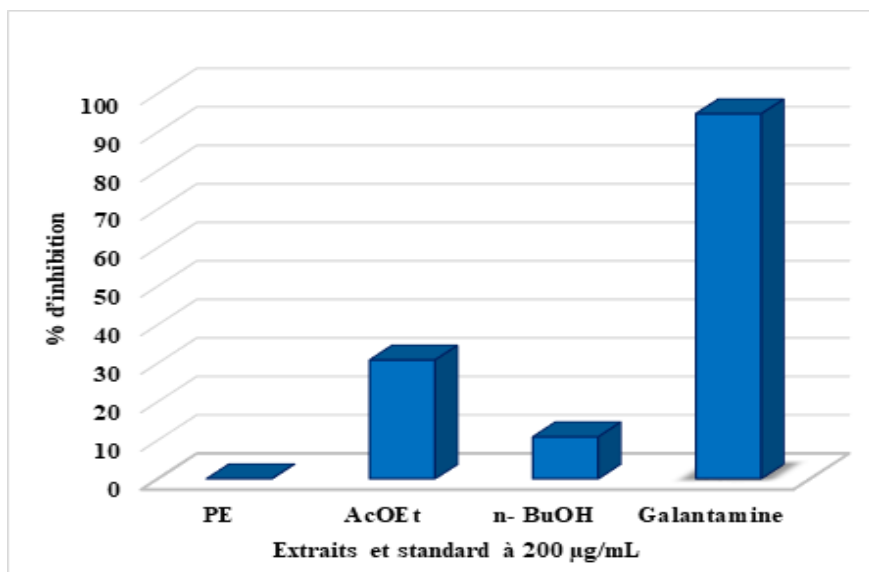


Figure 44 : Profil de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par différents extraits de l'espèce *Scabiosa stellata*.

Selon **Vinutha et ses collaborateurs (2007)**, les extraits sont classés comme inhibiteurs puissants de l'AChE s'ils ont la capacité d'inhiber plus de 50 % de l'enzyme, l'activité inhibitrice de l'AChE est modérée si l'extrait provoque l'inhibition de 30 à 50 % et faible si l'extrait inhibe moins de 30 %. D'après nos résultats obtenus, nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle a une activité modérée à la concentration de 200 µg/ml, l'extrait *n*-BuOH a une faible activité inhibitrice de l'AChE à la même concentration cependant, l'extrait de EP n'a montré aucune activité inhibitrice d'AChE à toutes les concentrations testées.

Des recherches antérieures menées sur les extraits organiques (AcOEt, *n*-BuOH et aqueux) des différentes parties de l'espèce *S. arenaria* (tiges, feuilles, fleurs et fruits) ont montré une forte inhibition de l'AChE par rapport aux résultats obtenus par **Hlila^b et ses collaborateurs en 2013**.

Cependant, les extraits préparés à partir des racines de *S. arenaria* avait une activité inhibitrice de l'acétylcholine estérase moins efficace et très proche à celle de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Scabiosa stellata* L. (**Hlila^b et al., 2015**).

Cette variation des activités AChE entre les espèces du même genre pourrait s'expliquer par la différence de la composition chimique notamment dans les polyphénols et les flavonoïdes connus pour leurs activités anticholinestérasiques (**Szwajgier 2015**).

Cependant, le pouvoir antioxydant des différents extraits issus de la plante *Scabiosa stellata* peut augmenter l'importance des résultats obtenus. En effet, plusieurs recherches ont

classé le stress oxydatif comme la cause majeure des maladies neurodégénératives y compris la maladie d'Alzheimer (Smith *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2014). Donc la lutte contre le stress oxydatif peut ainsi prévenir l'apparition de cette maladie et diminue la gravité des symptômes observés (Kovacic et Weston, 2017 ; Kryscio *et al.*, 2017).

V- Activités biologiques *in vivo*

V-1-Evaluation de la toxicité aigue

V-1-1- Toxicité aigüe de l'extrait acétate d'éthyle

Les résultats de la toxicité aiguë de l'extrait d'acétate d'éthyle ont montré qu'aucun symptôme toxique n'a été observé chez tous animaux traités avec cet extrait à diverses concentrations (500, 1000 et 2000 mg/kg). Les apparences morphologiques et le comportement des animaux traités étaient normaux.

Le traitement par l'extrait d'acétate d'éthyle ne favorise pas la suppression de l'appétit. En effet, l'apport alimentaire et la consommation d'eau n'ont pas été affectés par ce traitement. Ainsi, Le poids corporel de tous les rats a augmenté normalement après 14 jours de l'administration de cet extrait.

Les organes prélevés à la fin du traitement (reins, foie, cœur, poumons, rate) n'ont connu aucune variation significative de leur poids par rapport au groupe témoin.

De plus, le traitement par l'extrait AcOEt à différentes doses n'altérait pas significativement les paramètres biochimiques (Tableau 20) et hématologiques (Tableau 21). Par conséquent, la dose létale aiguë approximative (DL₅₀) de l'extrait acétate d'éthyle a été estimée supérieure à 2000 mg/kg.

Tableau 20- Effets de l'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Scabiosa stellata* sur les paramètres biochimiques des rats (moyenne ± SEM, n = 5).

Paramètres	Unité	Groupe contrôle	500mg/kg	1000 mg/kg	2000mg/kg
ALAT	(UI/l)	25.33 ± 0.05	25.22 ±0.2	21.11 ± 0.5	20.67 ±0.3
ASAT	(UI/l)	14.67 ± 0.1	14.11 ±0.05	13.78 ± 0.8	12.44 ±0.6
Urée	(g/l)	0.38 ±0.12	0.37 ±0.3	0.39 ± 0.26	0.38 ±0.9
Créatinine	(mg/l)	7.19 ± 0.5	7.69 ±2.1	7.06 ± 1.2	7.98 ±3.5
Glucose	(g/l)	0.98 ± 0.09	0.96 ±0.1	1.02 ± 0.3	0.99 ±0.2
Cholestérol	(g/l)	0.46 ± 0.3	0.43 ±0.3	0.49 ± 0.2	0.50 ±0.21
Triglycérides	(g/l)	0.29 ± 1.2	0.31 ±0.07	0.32 ±0.19	0.28 ±0.33
Bilirubine totale	(mg/l)	1.52 ± 0.3	1.39 ±0.2	1.22 ± 0.4	1.5 ±0.9

Plusieurs études ont montré que les intoxications induisent une augmentation de l'activité enzymatique hépatique, notamment la catalase et l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (AST), qui sont des biomarqueurs de la viabilité des cellules hépatiques (**Ramaiah 2011**).

L'empoisonnement est également associé à la dégénérescence et aux changements structurels des hépatocytes, ce qui perturbe la sécrétion de l'insuline induisant ainsi la perturbation de la glycémie mais le traitement avec l'extrait AcOEt n'a pas provoqué aucun changement significatif du taux de la glycémie entre les groupes traités et le groupe contrôle.

Le traitement avec l'extrait AcOEt par voie orale à différentes doses (500, 100, 2000 mg/kg) n'a aucun effet sur les paramètres lipidiques des rats traités (cholestérol et triglycérides), ce qui confirme l'absence d'hépatotoxicité. Aucune augmentation significative au niveau des concentrations plasmatiques d'AST et d'ALAT par rapport au groupe témoin n'a été observée.

Les résultats de l'examen histologique du foie (**Figure 45**) ne montrent aucune altération structurelle des hépatocytes, aucune nécrose focale ou une vacuolisation n'ont été observées au niveau des coupes examinées de tous les rats traités par l'extrait d'acétate d'éthyle à différentes doses.

En effet, les plantes du genre *Scabiosa* sont connues par leur activités antidiabétiques et hépatoprotectives, L'induction d'une hépatotoxicité par le CCl₄ puis le traitement des rats avec les extraits organiques (éthanolique et acétate d'éthyle) de l'espèce *Scabiosa atropurpurea* a montré que les extraits induisent une diminution des taux de l'ALAT et l'ASAT d'une manière significative par rapport au groupe témoin. Cet effet hépatoprotectif est principalement dû aux propriétés antioxydantes de l'espèce (**Elhawary et al., 2011**).

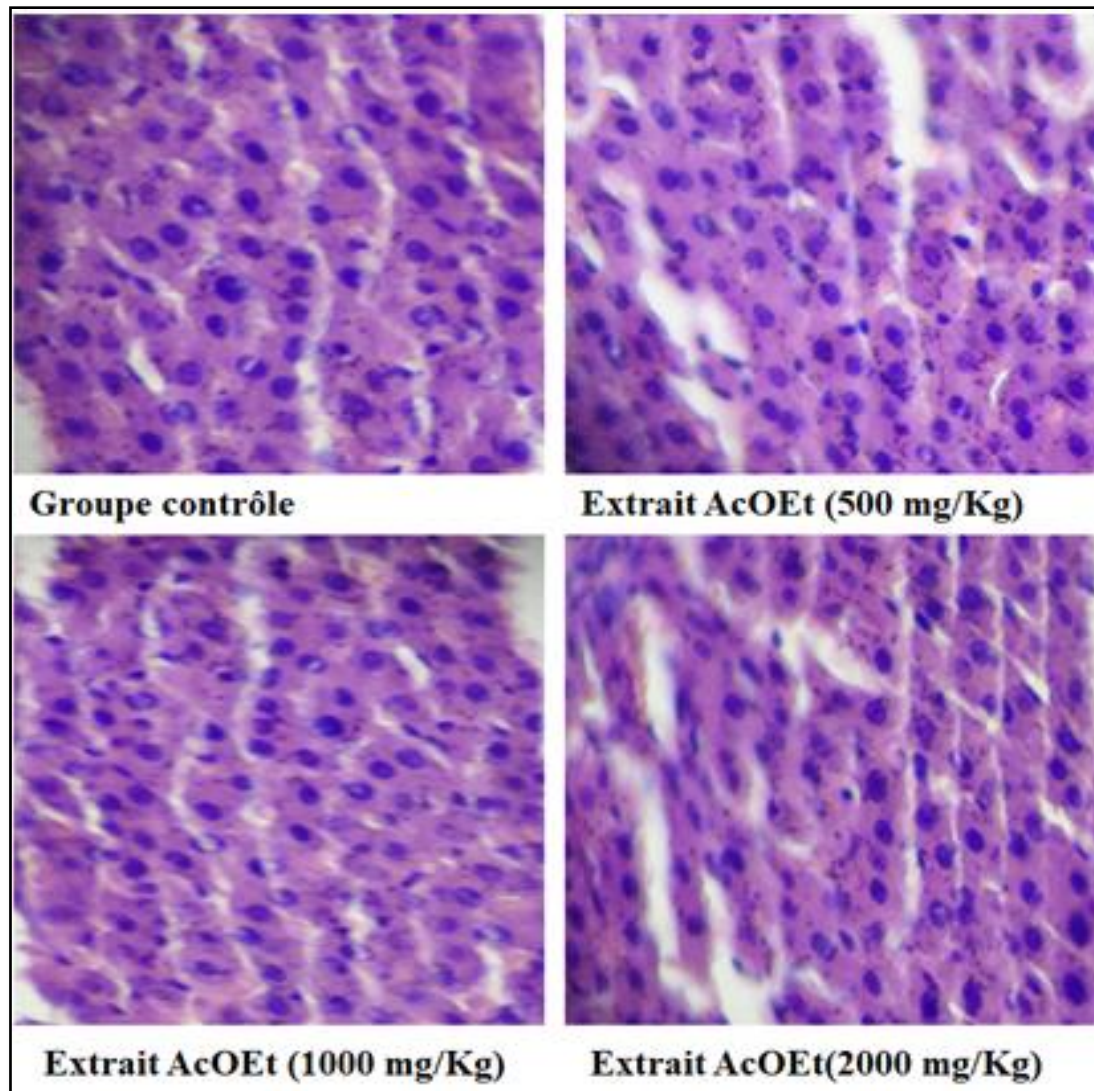


Figure 45 : Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).

L'administration orale de l'extrait AcOEt n'a pas provoqué une augmentation de la concentration de la créatinine sérique et ni de l'urée (**Tableau 20**), ces paramètres sont des marqueurs importants de dysfonctionnement rénal (**Levey *et al.*, 2006 ; Gowda *et al.*, 2010**). Par conséquent, cet extrait n'indique aucune augmentation du catabolisme protéique et n'entraîne aucun dommage au mécanisme de filtration rénale.

L'examen histologique du rein (**Figure 46**) a confirmé ces résultats. En effet, aucune modification structurale de la zone corticale ou des capsules de Bowman n'a été observée chez tous les rats traités avec cet extrait à différentes doses.

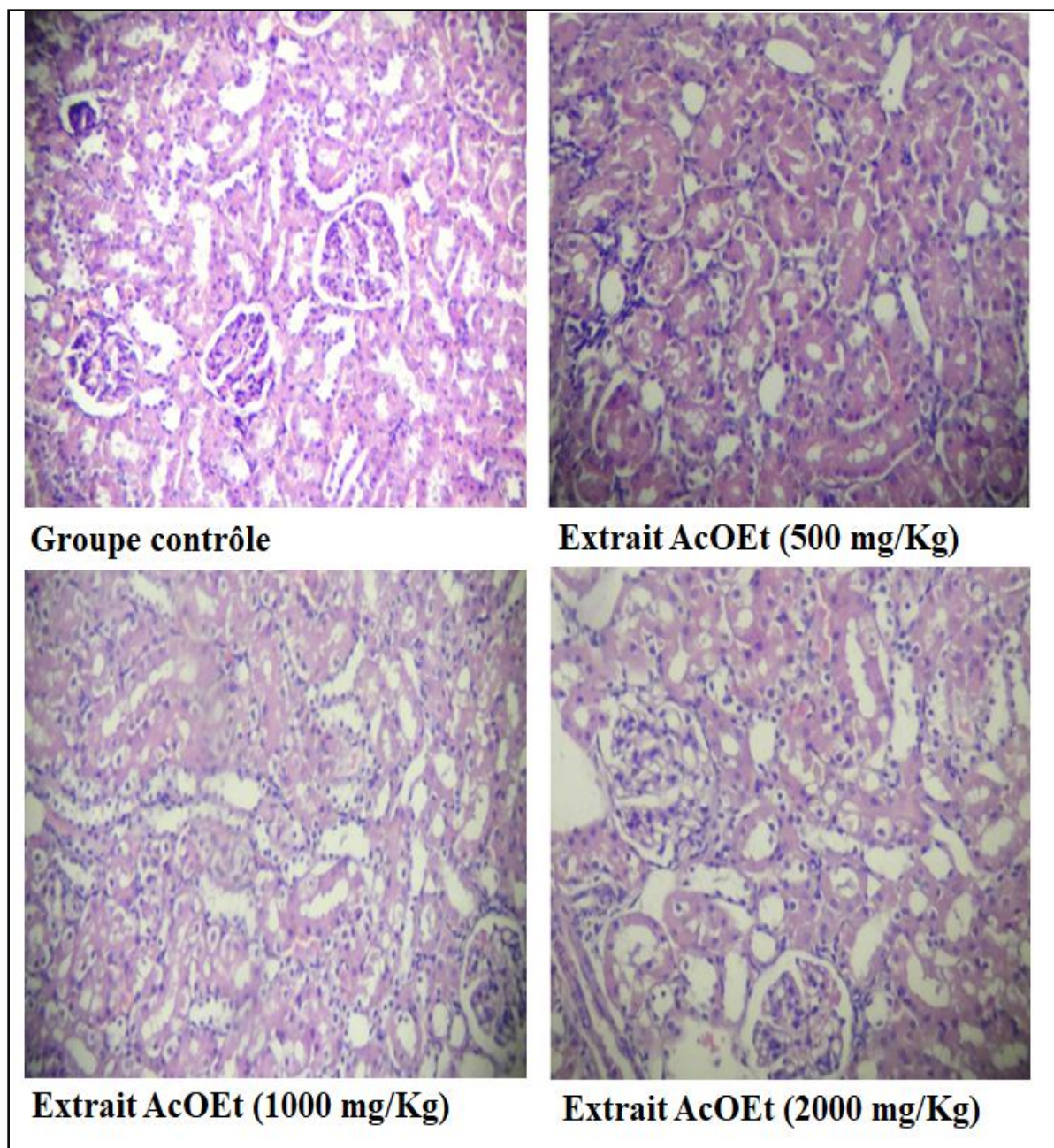


Figure 46 : Photos représentatives des coupes histologiques des reins des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).

Ce traitement ne change pas le taux de réanimation chez tous les rats traités (difficultés respiratoires, essoufflement et un changement de la fréquence respiratoire), l'examen histologique n'a montré aucune altération structurelle des poumons des rats traités avec l'extrait AcOEt (**Figure 47**).

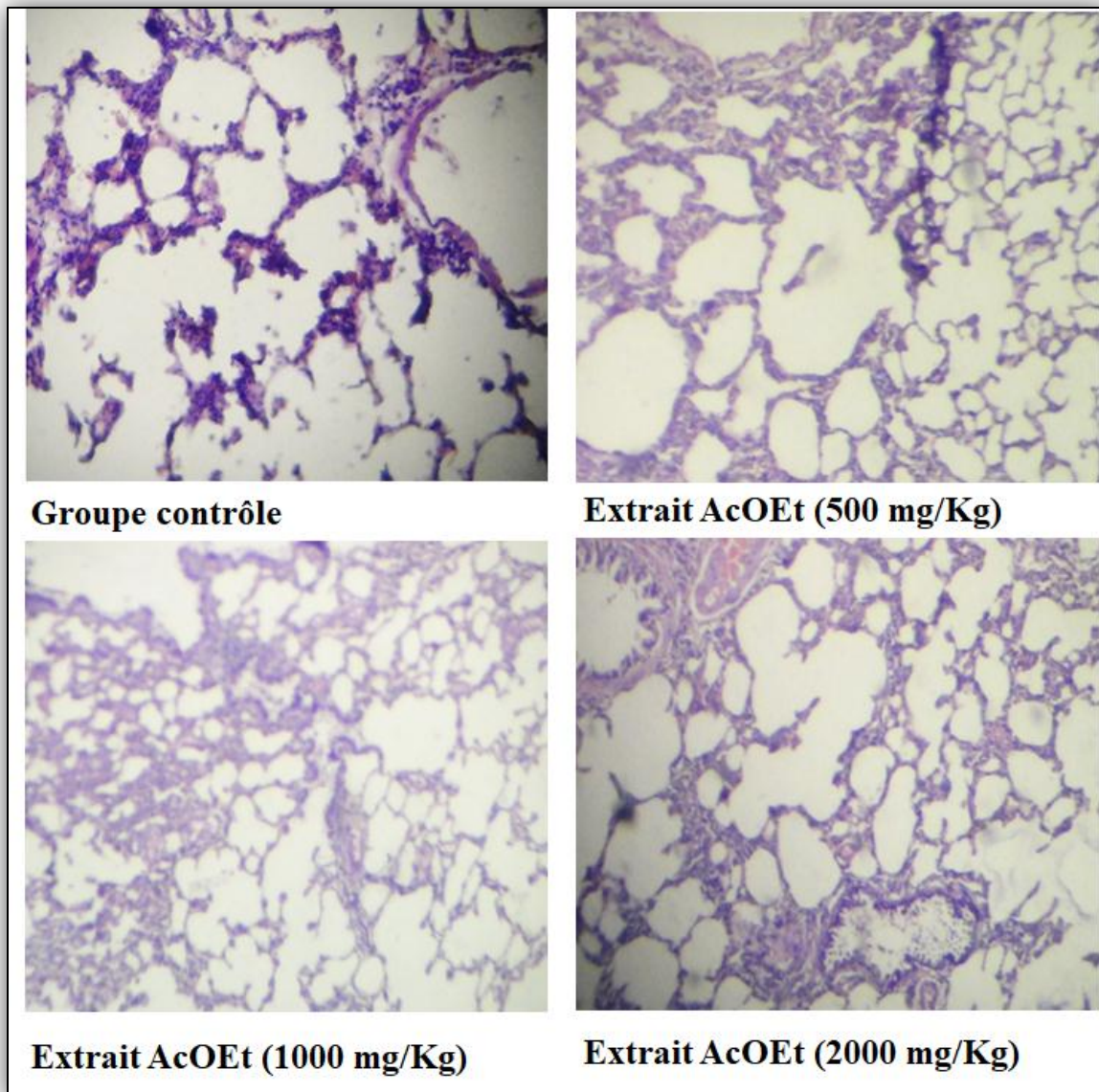


Figure 47 : Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait AcOEt ($\times 20$).

De plus, le traitement par l'extrait AcOEt à différentes doses n'altère pas significativement les paramètres hématologiques (**Tableau 21**) et l'analyse des paramètres hématologiques montre qu'il n'y a pas de diminution significative de l'hémoglobine, l'hématocrite et le nombre de globules rouges chez tous les rats traités à des doses différentes.

Egalement, aucune augmentation du taux des lymphocytes, des granulocytes et des plaquettes n'a été observée par rapport aux témoins. Ces résultats suggèrent que l'extrait d'acétate d'éthyle n'a aucun effet sur le mécanisme de l'érythropoïèse et n'a causé ni une anémie ni une réaction inflammatoire.

Tableau 21- Effet de l'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Scabiosa stellata* sur les paramètres hématologiques des rats traités (moyenne \pm SEM, n = 5).

Paramètres	Unités	Témoin	Doses		
			500 mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
WBC	(10^9 /l)	4.47 \pm 0.65	3.98 \pm 0.15	4.38 \pm 0.55	4.20 \pm 0.25
LYM	(10^9 /l)	2.85 \pm 0.74	2.30 \pm 0.14	2.73 \pm 0.38	2.20 \pm 0.15
LYM	%	67.73 \pm 1.2	62.15 \pm 2.4	61.85 \pm 2.4	66.43 \pm 2.6
MID	(10^9 /l)	0.90 \pm 0.1	0.70 \pm 0.21	0.48 \pm 0.15	0.60 \pm 0.14
MID	%	18.03 \pm 1.6	18.30 \pm 4.2	9.8 \pm 3.34	18.03 \pm 2.31
GRA	(10^9 /l)	0.60 \pm 0.05	0.85 \pm 0.18	1.18 \pm 0.25	0.50 \pm 0.07
GRA	%	14.23 \pm 4.2	19.55 \pm 4.05	28.35 \pm 4.05	18.05 \pm 0.43
HGB	(g/dL)	15.00 \pm 0.55	15.48 \pm 0.15	15.28 \pm 0.19	14.95 \pm 0.15
MCH	pg	18.73 \pm 0.35	18.48 \pm 0.5	18.78 \pm 0.63	18.68 \pm 0.3
MCHC	g/dl	34.80 \pm 0.5	32.90 \pm 0.8	34.23 \pm 0.75	33.38 \pm 1.15
RBC	(10^{12} /l)	8.02 \pm 0.15	8.40 \pm 0.3	7.95 \pm 0.15	8.00 \pm 0.15
MCV	(fL)	54.00 \pm 1.4	56.25 \pm 0.61	56.25 \pm 0.8	55.95 \pm 1.2
HCT	(%)	43.33 \pm 1.55	47.25 \pm 1.23	42.50 \pm 2.8	45.24 \pm 1.8
RDW	(%)	11.80 \pm 1.2	13.85 \pm 0.85	17.05 \pm 0.83	15.43 \pm 2.25
PLT	(10^9 /l)	644.67 \pm 7.2	696 \pm 2.56	626 \pm 2.56	672.89 \pm 2.59
MPV	(fL)	6.63 \pm 0.35	6.80 \pm 0.2	6.13 \pm 0.06	6.13 \pm 0.3
PDW	(fL)	11.27 \pm 1.8	12.93 \pm 1.6	9.18 \pm 0.07	10.68 \pm 1.8
PCT	%	0.49 \pm 0.05	0.47 \pm 0.05	0.38 \pm 0.02	0.50 \pm 0.02

Les valeurs exprimées en moyenne \pm SEM, Signification avec le test de Tukey après ANOVA à un facteur est évaluée à P <0,05. Volume cellulaire moyen (VMC), Concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire (MCHC), Largeur de distribution des globules rouges (RDW), hématocrite (Hct), Volume cellulaire emballé (PCV), Globules rouges (RBC), globules blancs (WBC), Hémoglobine (HGB), Lymphocytes (LYM), Plaquettes (PLT), Granulocytes (GRA), Volume moyen des plaquettes (MPV), Cellule de taille moyenne (MID), Largeur de distribution plaquettaire (PDW), Critère plaquettaire (PCT), Volume corpusculaire moyen (MCH).

V-1-2- Toxicité aiguë de l'extrait *n*-butanolique

Tous les rats traités par voie orale avec l'extrait *n*-butanolique à la dose de 2000 mg/kg sont tous morts dans les 24 heures qui suivent l'administration de l'extrait. Les rats de ce lot présentent surtout des convulsions avec de fortes agitations ; une accélération du rythme cardiaque avec des difficultés respiratoires, puis un coma profond jusqu'à la mort.

Un seul animal est mort après 03 jours de traitement avec la dose de 1000 mg/kg, mais aucune mortalité n'a été observée chez les rats traités avec la dose de 500 mg/kg.

Des modifications comportementales et morphologiques (couleur des yeux et fourrure) ont été observées chez les animaux survivants traités aux doses de 1000 mg/kg et de 500 mg/kg, y compris les changements dans les couleurs des yeux et de la peau. La mobilité de tous les rats traités était affectée (sédation). Ainsi, les périodes de repos étaient plus longues (léthargie) (**Figure 48**).

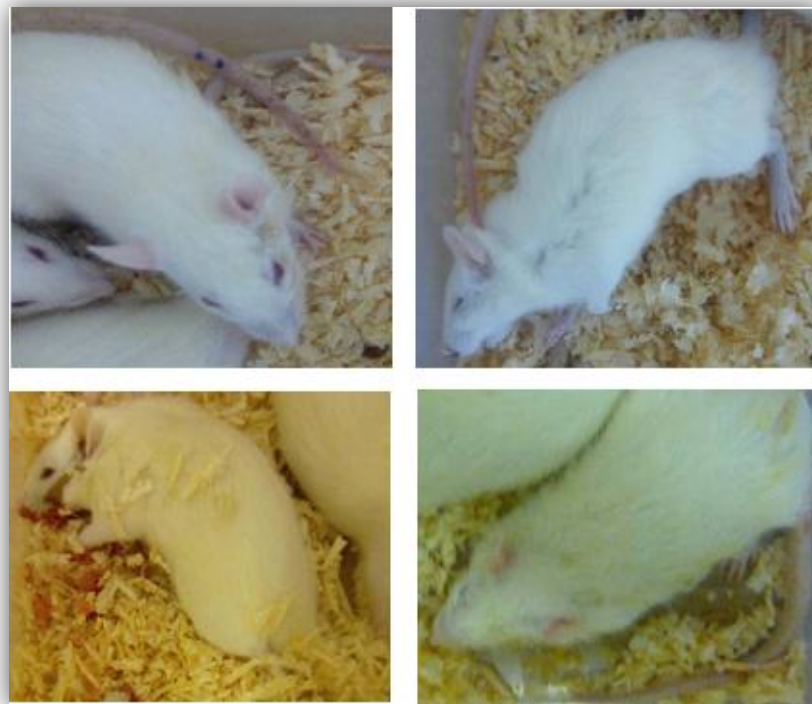


Figure 48 : Signes de toxicité observés chez les rats traités par l'extrait *n*-butanolique (2000,1000 et 500 mg/kg).

Le traitement par l'extrait *n*-BuOH a favorisé la suppression de l'appétit. En effet, l'apport alimentaire et la consommation d'eau ont été affectés. Ainsi, Le poids corporel de tous les rats ayant survécu n'a pas augmenté normalement par rapport au groupe contrôle.

Certains organes prélevés à la fin du traitement (foie et rate) ont connu une augmentation significative de leur poids par rapport au groupe témoin.

L'administration orale de l'extrait *n*-butanolique a induit une augmentation significative du taux d'AST et d'ALAT qui indique que cet extrait a un effet destructeur des hépatocytes et présente des modifications structurelles induisant une augmentation de la

perméabilité cellulaire et une infiltration des enzymes intracellulaires, notamment l'alanine l'aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT).

En effet, plusieurs études ont montré que les intoxications induisent une dégénérescence des hépatocytes et plusieurs modifications structurales accompagnées à l'augmentation de l'activité enzymatique du foie (la catalase, ALAT et ASAT) (**Ramaiah 2011**).

De plus, l'extrait *n*-butanolique augmente significativement le taux du cholestérol et des triglycérides. Cette augmentation serait due à l'augmentation du taux des lipides peroxydases, des acides gras insaturés et à l'altération de l'intégrité membranaire induisant ainsi la perturbation du métabolisme hépatique des rats (**Tableau 22**).

Tableau 22 -Effets de l'administration de l'extrait *n*-butanolique de *Scabiosa stellata* sur les paramètres biochimiques des rats

Paramètres	Unité	Groupe contrôle	500mg/kg	1000 mg/kg
ALAT	(UI/l)	25.94 ± 0.22	29.02***±0.15	31.2*** ± 0.15
ASAT	(UI/l)	14.51 ± 0.09	16.12 * ±0.04	21.35*** ± 0.2
Urée	(g/l)	0.378 ±0.01	0.4 ±0.003	0.455* ± 0,004
Créatinine	(mg/l)	7.78 ± 0.09	7.512 ±0,05	8.55 *± 0,08
Glucose	(g/l)	0.976± 0.04	0.78* ±0.005	0.72* ± 0.005
Cholestérol	(g/l)	0.478 ± 0.3	0.49 ±0.001	0.711 *** ± 0.01
Triglycérides	(g/l)	0.29 ± 0,01	0.32 ±0.04	0.476*±0.109
Bilirubine totale	(mg/l)	1.53 ± 0.3	1.49 ±0.001	1.74 ± 0.4

L'examen histologique du foie a confirmé ces résultats, plusieurs altérations structurales des hépatocytes ont été observées y a compris : des congestions hépatiques et l'apparition de granulomes inflammatoires indiquant l'installation d'une nécrose hépatique (**Figure 49**).

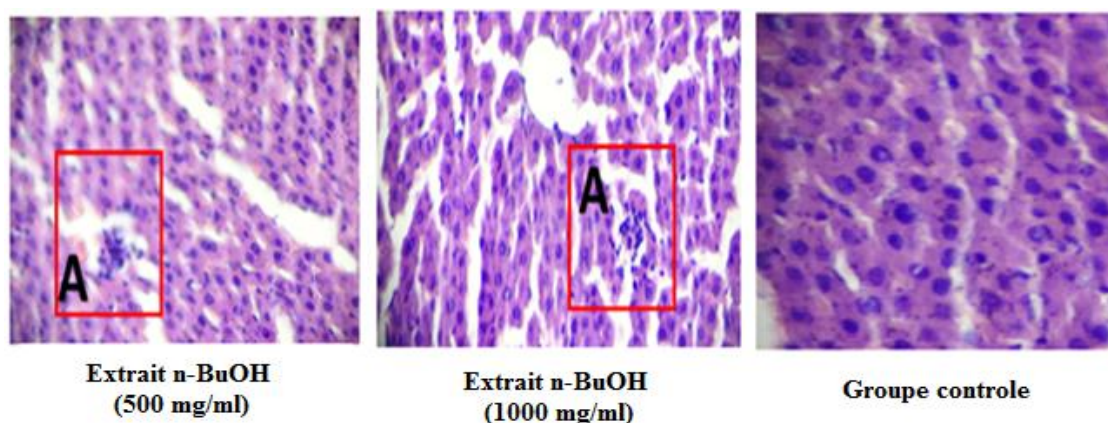


Figure 49 : Photos représentatives des coupes histologiques du foie des rats traités par l'extrait *n*-BuOH (× 20).

L'administration par voie orale de l'extrait *n*-butanolique entraîne une augmentation du taux de la créatininémie et de l'urémie qui pourrait être expliquée par une augmentation de catabolisme des composés protéiques et par une atteinte de la fonction de mécanisme de filtration rénale, ce qui témoigne l'installation d'une insuffisance rénale transitoire avec une baisse de la filtration glomérulaire, un dysfonctionnement tubulaire ou une néphropathie tubulo-interstitielle qui évolue vers une insuffisance rénale qui est l'un des signes d'intoxication.

L'examen histologique des reins a confirmé ces résultats, en effet, plusieurs altérations structurales au niveau de la zone corticale où les capsules de Bowman adhèrent aux glomérules ont été observées, une juxtaposition de glomérules rénaux (C), des congestions rénales (A) et des néphrites interstitielles (B) ont été observées dans les coupes histologiques des rats traités par l'extrait *n*-butanolique à la dose de (1000mg/kg) (**Figure 50**).

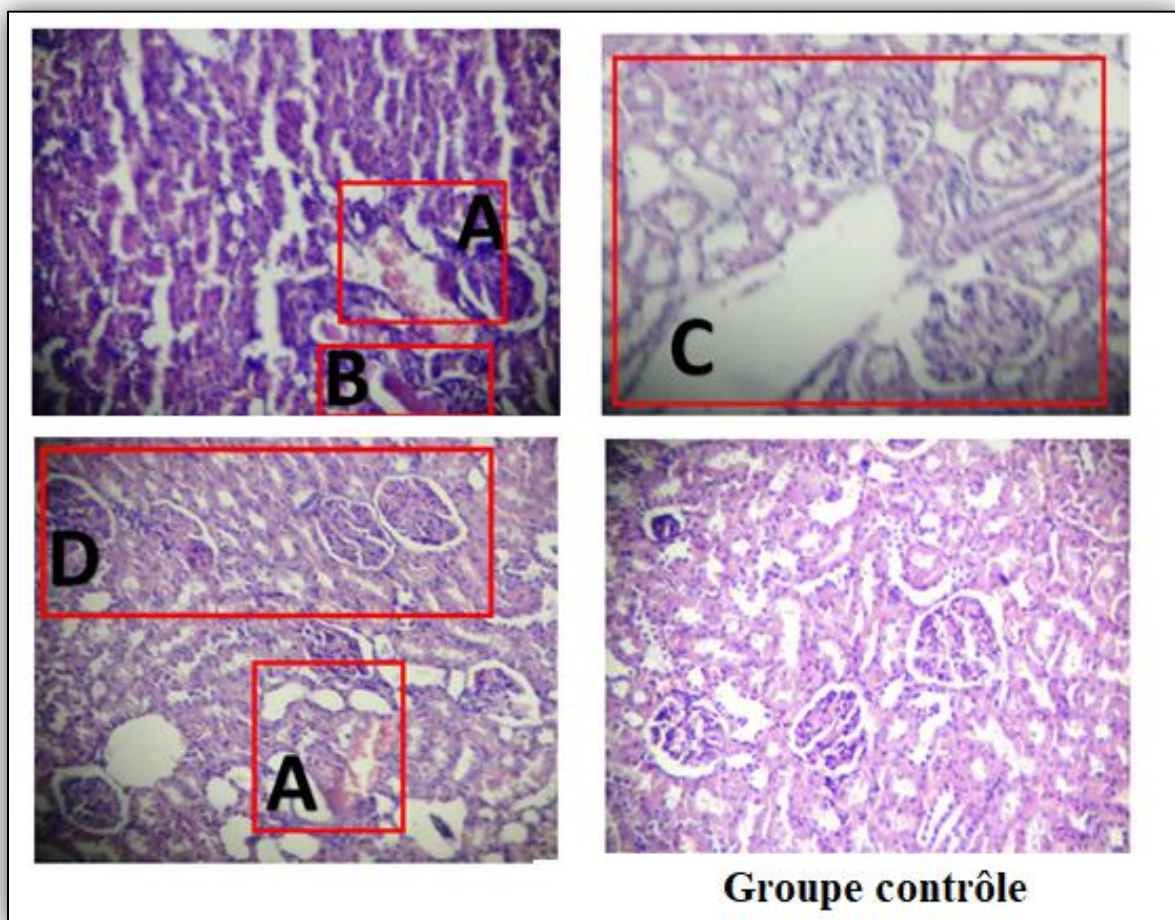


Figure 50 : Photos représentatives des coupes histologiques du rein des rats traités par l'extrait *n*-BuOH ($\times 20$). Des congestions rénales (A), Néphrite interstitielle (B), une juxtaposition de glomérules rénaux (C).

Le traitement des rats par l'extrait *n*-butanolique induit des difficultés respiratoires et un changement de la fréquence respiratoire. L'examen histologique des poumons a montré des altérations structurales au niveau des poumons incluant : une fibrose (A), une dilatation alvéolaires (B), une extravasation (C), des congestions (D) et des granulomes inflammatoires (E) (Figure 51).

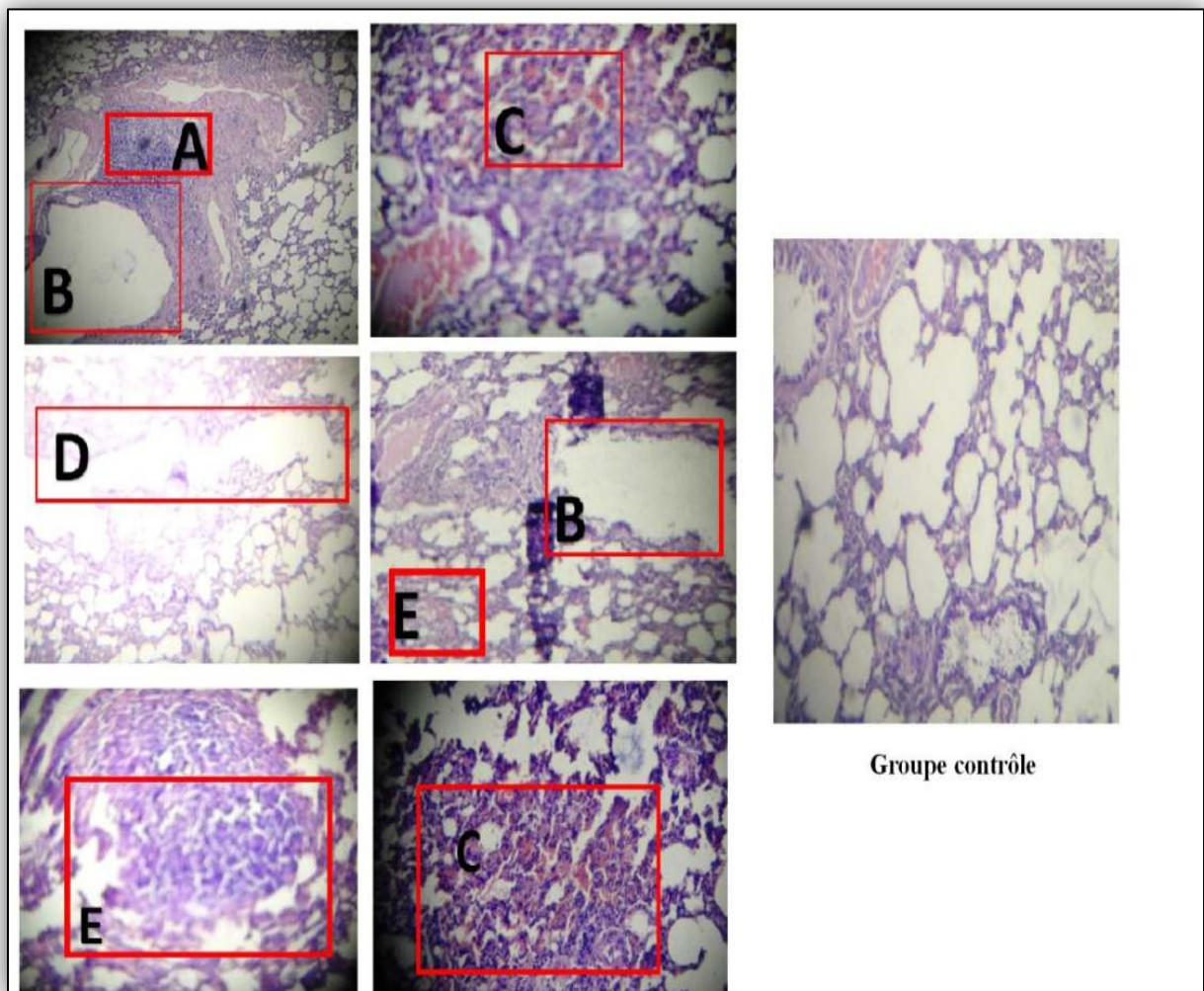


Figure 51 : Photos représentatives des coupes histologiques des poumons des rats traités par l'extrait *n*-BuOH ($\times 20$). Fibroses(A), dilatation alvéolaires (B) , Extravasation (C), Congestions (D) et des granulomes inflammatoires (E).

Le traitement par l'extrait *n*-butanolique à différentes doses altère significativement les paramètres hématologiques (**Tableau 23**), une diminution significative de l'hémoglobine, l'hématocrite et le nombre de globules rouges a été observée chez tous les rats traités par l'extrait *n*-BuOH à des doses de (500 et 1000mg/kg). Cette diminution est associée à une augmentation non significative des taux de la bilirubine totale (**Tableau 22**). En effet,

l'augmentation prédominante de la bilirubinémie non conjuguée peut provenir d'une augmentation de la destruction de l'hémoglobine ou d'une captation ou d'une conjugaison insuffisante de la bilirubine par l'hépatocyte. Donc l'hyperbilirubinémie observée est due soit à l'altération du fonctionnement hépatocytaire ou à l'hémolyse excessive provoquée par la présence de certains composés phytochimiques comme les saponines qui ont été déjà isolés et identifiés à partir de cet extrait. Ainsi le pouvoir hémolytique des extraits déjà testé dans la présente étude peut expliquer les perturbations observés et l'état d'anémie.

Donc, les signes de toxicité observés (accélération du rythme cardiaque, difficultés respiratoires, léthargie et la sédation) peuvent être fortement associés à l'état d'anémie observés chez les rats traités par l'extrait *n*-BuOH à la dose de 1000mg/kg.

Tableau 23- Effets de l'administration de l'extrait *n*-butanolique de *Scabiosa stellata* sur les paramètres hématologiques des rats traités (moyenne \pm SEM, n = 5).

Paramètres	Unit	Control	Doses	
		group	500 mg/kg	1000mg/kg
WBC	(10 ⁹ /l)	4,63 \pm 0,26	5,38 \pm 0,26	5,90* \pm 0,18
LYM	(10 ⁹ /l)	3,20 \pm 0,33	3,30 \pm 0,11	2,20* \pm 0,25
LYM	%	69,80 \pm 2,66	73,85 \pm 1,20	74,83** \pm 1,24
MID	(10 ⁹ /l)	0,74 \pm 0,05	0,80 \pm 0,03	0,85 \pm 0,04
MID	%	17,28 \pm 2,07	17,3 \pm 0,44	18,93 \pm 0,59
GRA	(10 ⁹ /l)	0,57 \pm 0,07	1,18 \pm 0,13	1,18* \pm 0,06
GRA	%	12,93 \pm 1,35	28,35* \pm 2,77	29,38** \pm 0,81
HGB	(g/dL)	15,38 \pm 0,40	11,53* \pm 0,24	10,65** \pm 0,23
MCH	pg	18,93 \pm 0,31	16,03* \pm 0,38	16,43* \pm 0,99
MCHC	g/dl	34,48 \pm 1,01	30,18* \pm 0,12	28,08** \pm 0,46
RBC	(10 ¹² /l)	8,13 \pm 0,17	7,70* \pm 0,06	6,49* \pm 0,18
MCV	(fL)	55,03 \pm 1,43	56,25 \pm 0,42	56,58 \pm 0,35
HCT	(%)	44,80 \pm 2,09	42,50 \pm 1,40	44,25 \pm 0,64
RDW	(%)	13,13 \pm 2,28	17,05 \pm 0,41	15,98 \pm 0,52
PLT	(10 ⁹ /l)	783,62 \pm 2,81	741,5 \pm 2,17	816 \pm 2,45
MPV	(fL)	6,58 \pm 0,25	6,78 \pm 0,17	8,58** \pm 0,05
PDW	(fL)	10,80 \pm 1,57	9,18 \pm 0,03	9,00 \pm 0,10
PCT	%	0,54 \pm 0,05	0,58 \pm 0,03	0,78** \pm 0,02

Les valeurs exprimées représentent la moyenne \pm SEM, Signification avec le test de Tukey après ANOVA à un facteur est évaluée à P <0,05. Volume cellulaire moyen (VMC), Concentration moyenne d'hémoglobine corpusculaire (MCHC), Largeur de distribution des globules rouges (RDW), hémocrite (Hct), Volume cellulaire emballé (PCV), Globules rouges (globules rouges), globules blancs (WBC), Hémoglobine (HGB), Lymphocytes (LYM), Plaquettes (PLT), Granulocytes (GRA), Volume moyen des plaquettes (MPV), Cellule de taille moyenne (MID), Largeur de distribution plaquettaire (PDW), Critère plaquettaire (PCT), Volume corpusculaire moyen (MCH).

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation des taux des lymphocytes, des granulocytes et des plaquettes. Ces résultats prouvent que l'administration de l'extrait *n*-BuOH perturbe le mécanisme d'érythropoïèse et active certaines réactions inflammatoires.

En effet, plusieurs études ont rapporté que l'empoisonnement est associé à des risques d'anémie et à la stimulation du système immunitaire (Yagminas et al. 1990, HosseinZadeh et al. 2013).

V-2- Activité anti-inflammatoire (modèle d'induction de l'œdème par injection de la carragénine)

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules sont efficaces mais leur utilisation prolongée peut entraîner de graves effets indésirables, la plus courante étant les saignements gastro-intestinaux et les ulcères gastro-duodénaux (Yamada et al. 1987). Par conséquent, il est nécessaire de développer des nouveaux agents anti-inflammatoires efficaces avec des effets secondaires minimaux.

L'activité anti-inflammatoire des extraits organiques (AcOEt et *n*-BuOH) issus de la plante *Scabiosa stellata* a été testée par induction de l'œdème suite à l'injection de la carragénine qui est un modèle animal largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des substances.

La carragénine est un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae, elle provoque une inflammation typiquement liée à l'activation des cyclooxygénases. Cette inflammation est biphasique. En effet, la carragénine, dans une première phase, provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation (Di Rosa et al., 1971), cette phase dure environ une heure. Dans une seconde phase (1,5-3 heures), cette molécule de référence induit la synthèse de prostaglandines principalement, des protéases et des lysosomes. Cette étape est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines et aux anti-inflammatoires naturels ou de synthèse tels que les glucocorticoïdes (Vinegar et al., 1969).

Les médiateurs produits aux cours de l'inflammation augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers

l'espace interstitiel et cause l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (**Di Rosa *et al.*, 1971**).

L'injection de la carragénine sous le coussinet plantaire provoque une augmentation progressive du volume de l'œdème chez les rats témoins durant les six heures de l'expérimentation (**Figure 52**).



Figure 52 : L'œdème de patte observé chez les rats traités par la carragénine

Cependant, l'augmentation du volume de la patte chez les groupes traités par les extraits (AcOEt et n-BuOH) a été moins important par rapport au groupe témoin.

Les effets des extraits d'acétate d'éthyle et de n- butanolique se manifestant comme ceux de diclofénac, dès la première heure de l'expérimentation, les deux extraits ont une activité anti-inflammatoire supérieure à celle du diclofénac durant les deux premières heures après le traitement. Donc, ces extraits sont dotés des molécules naturelles anti-sérotoniques et anti-histaminiques.

L'activité maximale de la molécule de référence (diclofénac) a été observée à la 3^{ème} heure d'expérimentation au moment de la libération de prostaglandines (61,59 %), ce résultat est attendu du fait que cette substance est considérée comme un inhibiteur des prostaglandines.

L'extrait d'acétate d'éthyle a montré un pourcentage d'inhibition très proche à celui du diclofénac pour les deux doses testées mais la dose la plus faibles (50mg/kg) a été plus efficace (58,33 %) que celle du 75mg/kg avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 54,52 %. Ce résultat montre la richesse de cet extrait en molécules inhibitrices des prostaglandines d'une part et l'effet de dose d'une autre part. Nous pouvons conclure que l'extrait est plus actif lorsqu'il est administré à faible dose.

L'activité de l'extrait AcOEt devient plus importante que celle du diclofénac après la 3^{ème} heure et l'effet anti-inflammatoire persiste jusqu'à 24h (48,62 et 43,57 %), alors que le diclofénac n'inhibe que 15,68 % après 24h du traitement. Ce résultat est très important du fait que l'élimination des molécules ayant un effet anti-inflammatoire présentes dans l'extrait nécessitent plus que 24 h, ainsi l'effet anti-inflammatoire persiste et est supérieur à celui du diclofénac. Donc l'extrait d'acétate d'éthyle donne un effet anti-inflammatoire qui se manifeste très rapidement (1h après le traitement) proche ou supérieur à celui du diclofénac dans toutes les phases d'essai (**Figure 53**) et qui persiste jusqu'à 24 h du traitement.

Toutes ces propriétés sont très recherchées dans le domaine pharmaceutique, l'efficacité de cet extrait pourrait être liée à sa composition chimique, particulièrement à la présence de composés polyphénoliques. Parmi ces composés se trouvent les flavonoïdes qui sont capables d'inhiber les oxydants libérés par les leucocytes et d'autres phagocytes dans la zone inflammatoire entretenant ainsi l'inhibition de l'inflammation (**Amezouar *et al.*, 2013**).

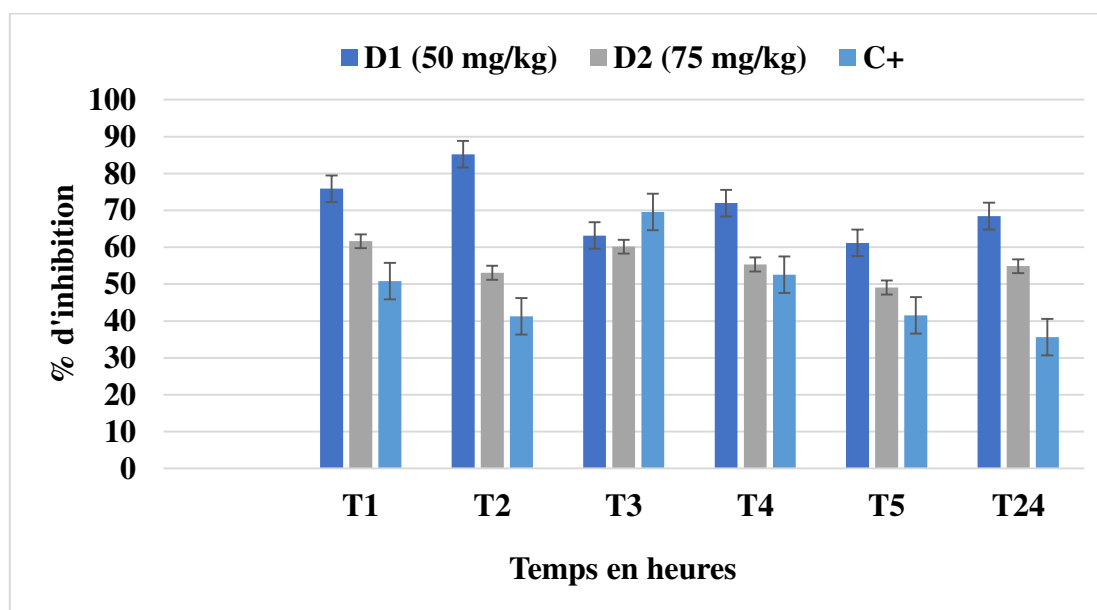


Figure 53 : Effet de l'administration orale de l'extrait AcOEt sur l'œdème de la patte de rat induite par la carragénine.

L'extrait d'acétate d'éthyle présente un effet anti-inflammatoire supérieur à celui de l'extrait *n*-butanolique et cette différence d'activité entre les extraits peut s'expliquer par la différence de la composition chimique.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait n-butanolique administré à la dose de 75mg/kg reste stable à partir de la 2^{ème} heure et jusqu'à 24h du traitement, ce qui montre la stabilité de l'effet anti-inflammatoire de cet extrait (**Figure 54**).

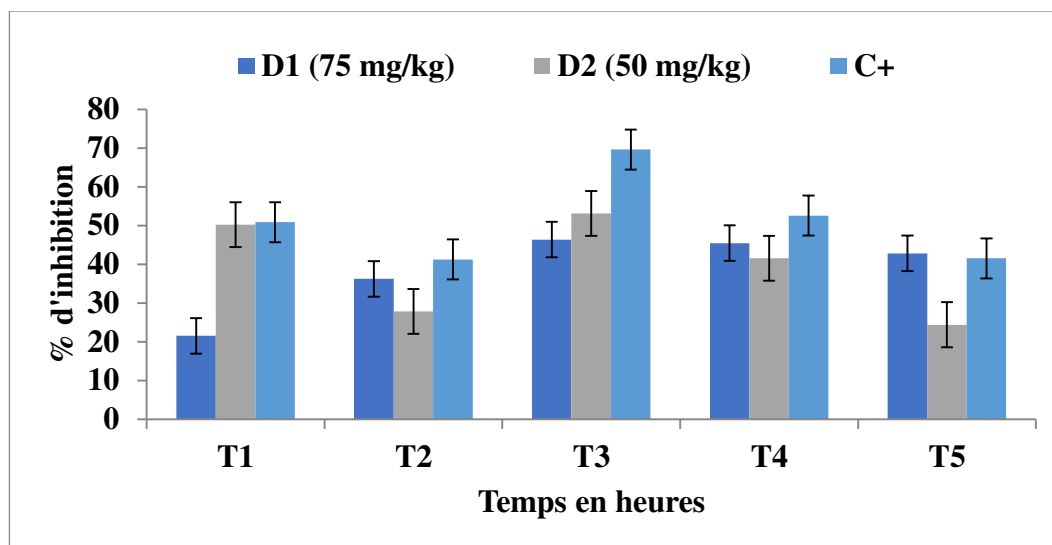


Figure 54 : Effet de l'administration orale de l'extrait n-BuOH sur l'œdème de la patte de rat induite par la carraghénine.

Ce résultat est confirmé par le pourcentage d'inflammation (**Figure 55**) qui reste constant durant toutes les phases du traitement à cette dose.

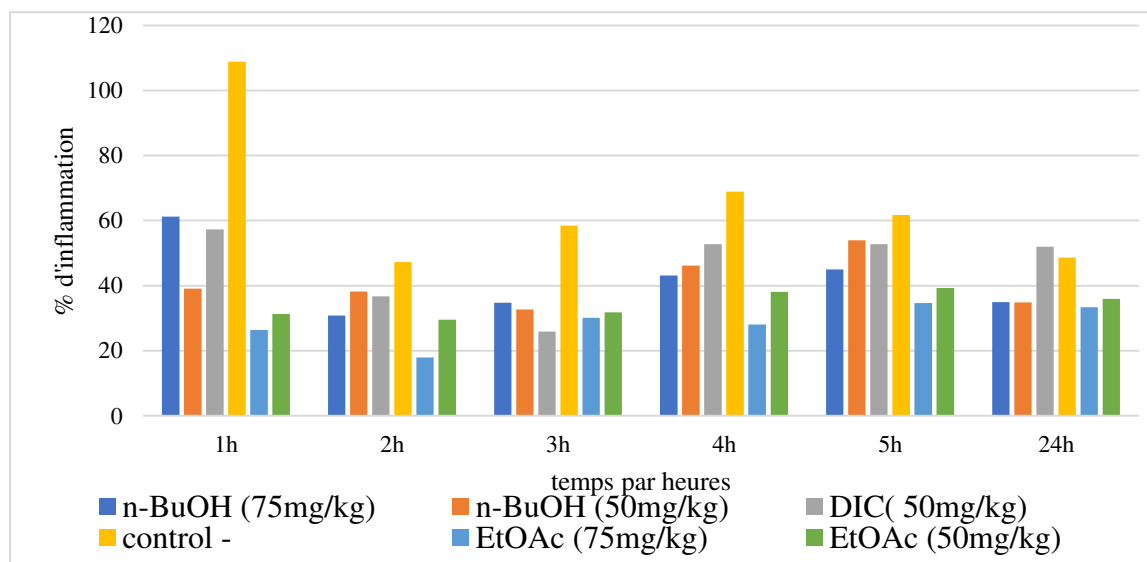


Figure 55 : Pourcentages d'inflammation observés au cours de toutes les périodes d'essais sur tous les traitements testés

L'effet anti-inflammatoire des extraits (AcOEt et n-BuOH) pourraient être liés à la composition chimique. En effet, les investigations phytochimiques de l'espèce *Scabiosa*

stellata collectées dans notre même région ont démontré la présence de glycosides iridoïdes (Lehbili^a *et al.*, 2018), ces derniers sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et la relation entre leur structure et l'activité anti-inflammatoire sur différents modèles qui ont déjà été reportés (del Carmen Recio *et al.*, 1994).

Les saponines triterpénoïdes isolées de cette espèce (Lehbili^b *et al.*, 2018) pourraient également expliquer les effets anti-inflammatoires, en effet, plusieurs études ont montré la capacité potentielle des saponines à supprimer la libération de cytokines pro-inflammatoires, y compris TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-12 (Quang *et al.*, 2018) et pour réguler les réponses immunitaires innées (Sarikahya *et al.*, 2018).

Ainsi les polyphénols et les acides phénoliques isolées précédemment à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* (Rahmouni *et al.*, 2018) peuvent être l'origine des effets anti-inflammatoires observés (Moscatelli *et al.*, 2006).

V-3 Activité antipyrétique

L'administration orale du médicament standard (paracétamol) à 50 mg / kg et des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) à la dose de 75 mg / kg diminue significativement la température corporelle des rats par rapport aux animaux témoins qui présentaient une hyperthermie pendant toutes les phases de l'essai (Tableau 24).

Tableau 24- L'effet antipyrétique des différents extraits issus de la plante *Scabiosa stellata* sur l'hyperthermie induite par l'injection d'une solution de la levure de bière (20 %).

Groupes et traitement	Température rectale en °C après 18h de l'injection de la levure					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
Témoin	38,12 \pm 0,18	38,5 \pm 0,21	37,92 \pm 0,12	38,36 \pm 0,19	38,92 \pm 0,18	38,98 \pm 0,12
<i>n</i> -BuOH (75mg/kg)	38,14 \pm 0,22	36,88 \pm 0,30*	36,92 \pm 0,19*	37,34 \pm 0,45*	37,14 \pm 0,34*	37,52 \pm 0,24*
<i>n</i> -BuOH (50mg/kg)	38,4 \pm 0,22	38,52 \pm 0,04	38,68 \pm 0,17	39,04 \pm 0,46	37,8 \pm 0,35	38,32 \pm 0,32
AcOEt (75mg/kg)	38.6 \pm 0.3	37.9 \pm 0.26	37.2* \pm 0.16*	37.1 \pm 0.22*	37.5* \pm 0.6	38.1 \pm 0.36
AcOEt (50mg/kg)	38.12 \pm 0.9	37.22 \pm 0.5	37.36 \pm 0.22	37.5 \pm 0.36	37.6 \pm 0.6	38.5 \pm 0.22
Paracétamol (50mg/kg)	38,7 \pm 0,45	37,86 \pm 0,21*	37,2 \pm 0,27*	37,56 \pm 0,08*	37,44 \pm 0,19*	37,78 \pm 0,27*

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. pour un groupe de cinq animaux (n = 5). Les valeurs sont analysées par rapport à contrôle en utilisant une ANOVA à sens unique suivie d'un test t. Les astérisques sont utilisés pour indiquer les valeurs statistiquement significatives du contrôle, * (P = 0,05), ** (P <0,01)

Cependant, l'administration des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) à la dose de 50 mg / kg n'a montré aucune réduction significative de la température corporelle. Ces résultats indiquent que les extraits sont plus actifs et capables d'inhiber l'activité de la cyclooxygénase (COX-2) s'ils sont administrés à la dose de 75 mg / kg. Ceci est probablement dû à la présence d'une concentration suffisante des composés actifs avec effet antipyrétique à cette dose.

L'effet antipyrétique des extraits observés à la dose de 75 mg/kg pourrait être dû à la réduction de la libération des cytokines et de la biosynthèse des prostaglandines. En effet, l'hyperthermie induite par l'injection de la levure est liée à la libération des cytokines (TNF α , IL 1 β , IL6) ayant atteint les vaisseaux sanguins stimulent la biosynthèse des prostaglandines (PGE2) aux environs du centre hypothalamique thermorégulateur (**Begum *et al.*, 2010**).

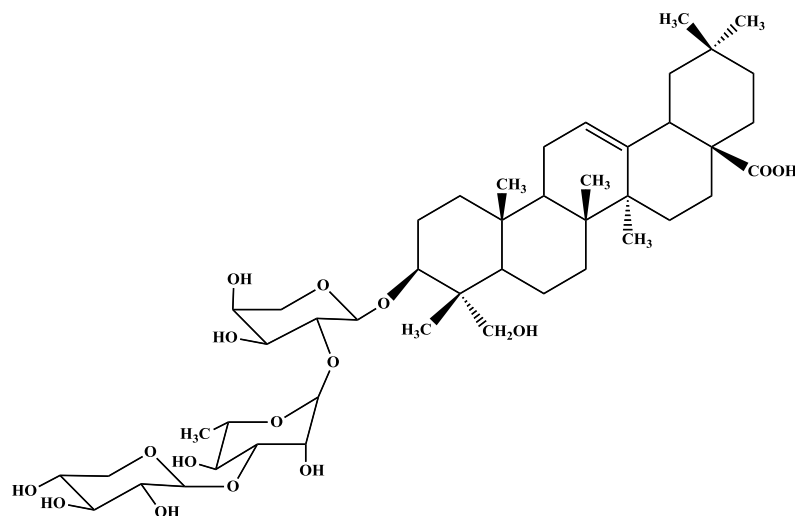
L'effet antipyrétique significatif de l'extrait *n*-butanolique peut être dû à la présence de composés chimiques tels que : les saponines, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et qui avait la capacité d'inhiber l'activité de la cyclo-oxygénase et la réduction du taux de prostaglandine PGE2 dans l'hypothalamus induisant la réduction de la fièvre (**Subedi *et al.*, 2016 ; Hajjaj *et al.*, 2017**).



**Partie
phytochimique**

1- Identification structurale des composés isolés

1-1- Identification structurale du composé 1



Hederagenine 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1'''→3'')-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1''→2')-O-α-L-arabinopyranosyl]

Le composé **1** est obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol. Il présente une tâche invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en violet après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 905 [M+Na]^+$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 882 uma et une formule brute en $C_{46}H_{74}O_{16}$.

Le spectre RMN 1H (**Figure 59**) du composé **1** montre la présence de six groupements méthyles dans la région des champs forts (0,65 - 1,20 ppm), à δ_H 0,68 (3H, *s*, H₃-24), 0,96 (3H, *s*, H₃-25), 0,81 (3H, *s*, H₃-26), 1,16 (3H, *s*, H₃-27), 0,85 (3H, *s*, H₃-29) et 0,93 (3H, *s*, H₃-30) caractéristique d'un squelette triterpenique pentacyclique.

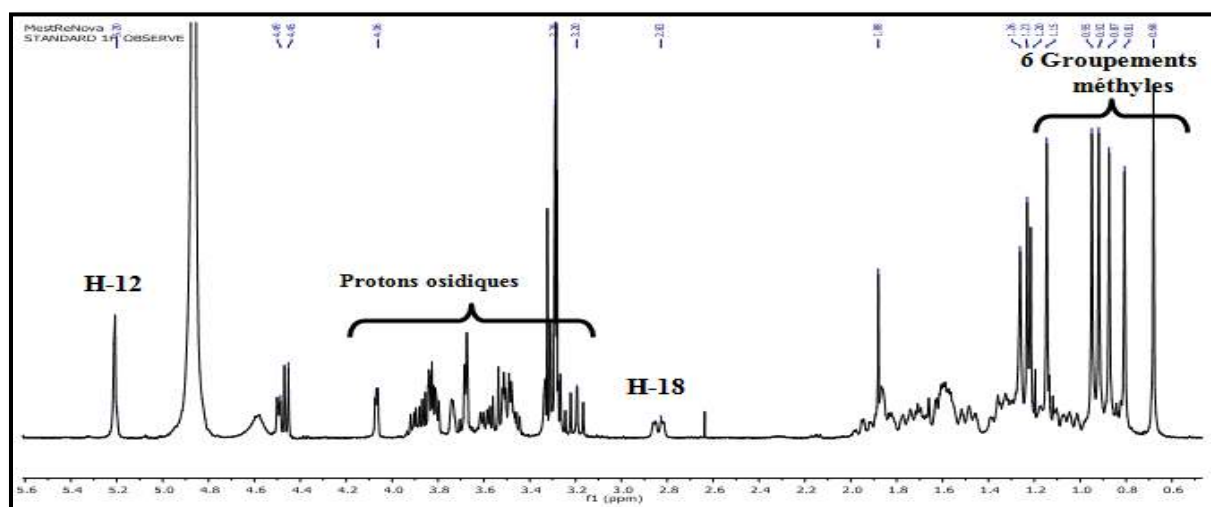


Figure 56 : Spectre RMN 1H du composé **1** (CD_3OD , 500 MHz)

Aussi ce spectre exhibe l'existence du proton hydroxyméthine H-3 à δ_H 3,61 (1H, *dd*, $J = 12,1 ; 4,8$ Hz), le proton éthylénique H-12 à δ_H 5,23 (1H, *t*, $J = 3,5$) et le proton méthine H-18 à δ_H 2,86 (1H, *dd*, $J = 14,0 ; 4,5$ Hz). Un massif de protons résonant entre 1,0 et 2,0 ppm correspondant au groupement CH et CH₂ des cinq cycles du triterpène.

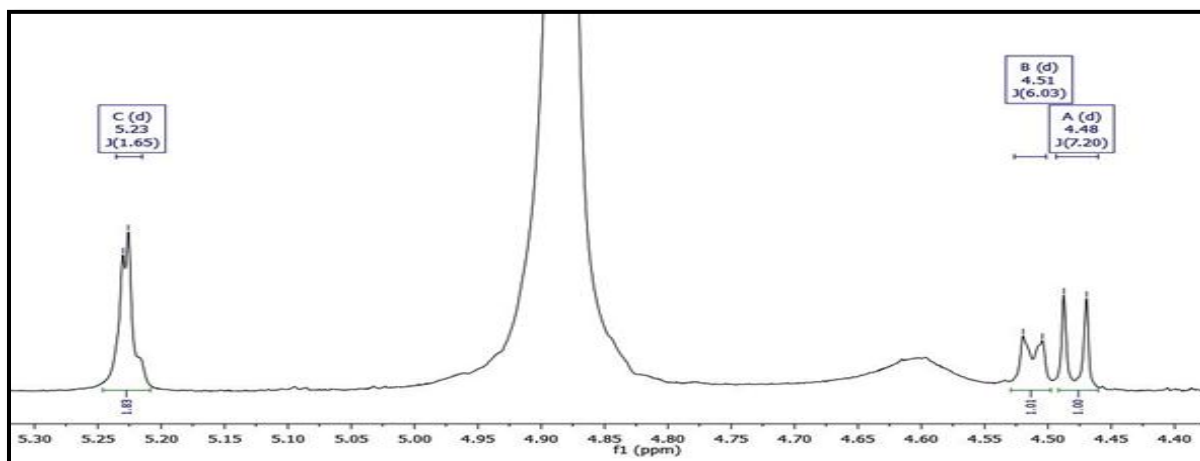


Figure 57: Partie du spectre RMN ¹H du composé **1** indiquant la présence de trois protons anomères

Le spectre RMN ¹H de ce composé montre également la présence de plusieurs signaux entre 3,0 et 4,1 ppm caractéristiques des protons osidiques, dont l'apparition de trois protons anomères à δ_H 4,48, 4,51 et 5,23 sous forme de doublet chacun suggérant l'existence de trois sucres (**Figure 57**).

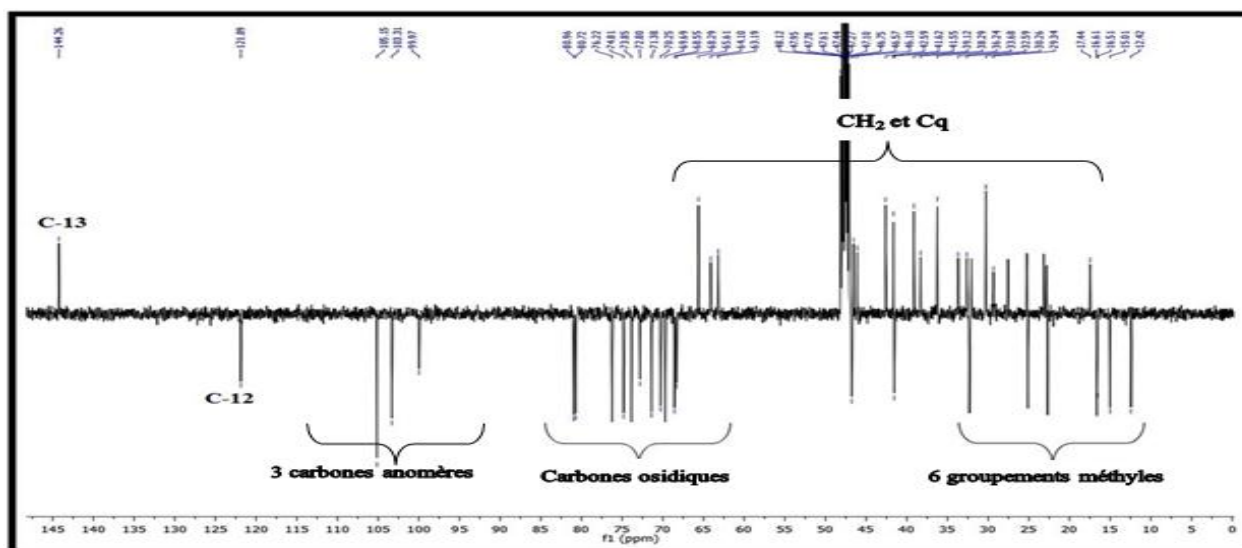


Figure 58 : Spectre RMN ¹³C *J*-modulé du composé **1** (CD₃OD, 125 MHz)

L'analyse du spectre RMN ¹³C *J*-modulé (**Figure 58**) confirme la nature triterpénique de ce composé par la présence de plus de 30 signaux. En effet, ce spectre montre l'existence de six groupements méthyles à δ_C 12,4 (Me-24), 15,0 (Me-25), 16,5 (Me-26), 25,1 (Me-27),

32,0 (Me-29) et 22,5 (Me-30). La présence seulement de six groupements méthyles suggère l'oxydation de deux des huit méthyles constituant habituellement un squelette triterpénique pentacyclique. L'observation du signal à δ_C 178,0 indique que l'un de ces méthyles est probablement oxydé en carbonyle. Aussi l'apparition sur le spectre RMN 1H des deux signaux déblindés d'un système AB résonant à δ_H 3,53 et 3,37 confirme l'oxydation du deuxième groupement méthyle en groupement hydroxyméthine (CH_2OH). Son carbone est assigné par analyse du spectre HSQC J -modulé à 63,2 ppm. Un ensemble de signaux entre 17,0 et 47,0 ppm est attribué aux carbones de type CH, CH_2 et C_q de la génine triterpénique.

Le spectre RMN ^{13}C du composé **1**, permet aussi de visualiser les signaux des carbones osidiques sortant entre 60,0 et 85,0 ppm et les deux carbones éthyléniques C-12 (δ_C 121,9) et C-13 (δ_C 144,3). Toutes ces données spectrales indiquent qu'on est en présence d'un saponoside à squelette oléane, son identification structurale sera présentée en deux parties : identification de la partie génine et de la partie osidique.

1-1-1- Identification de la partie génine

L'élucidation structurale de la génine triterpénique est commencée par la localisation du proton hydroxyméthine H-3 (δ_H 3,61, 1H, *dd*, $J = 12,1 ; 4,8$ Hz). Ce proton montre sur le spectre COSY H-H (**Figure 59**) un système de spins à cinq protons incluant H-3/H-2a (δ_H 1,89), H-3/H-2b (δ_H 1,77), H-2b/H-1a (δ_H 1,60) et H-1a/H-1b (δ_H 0,95).

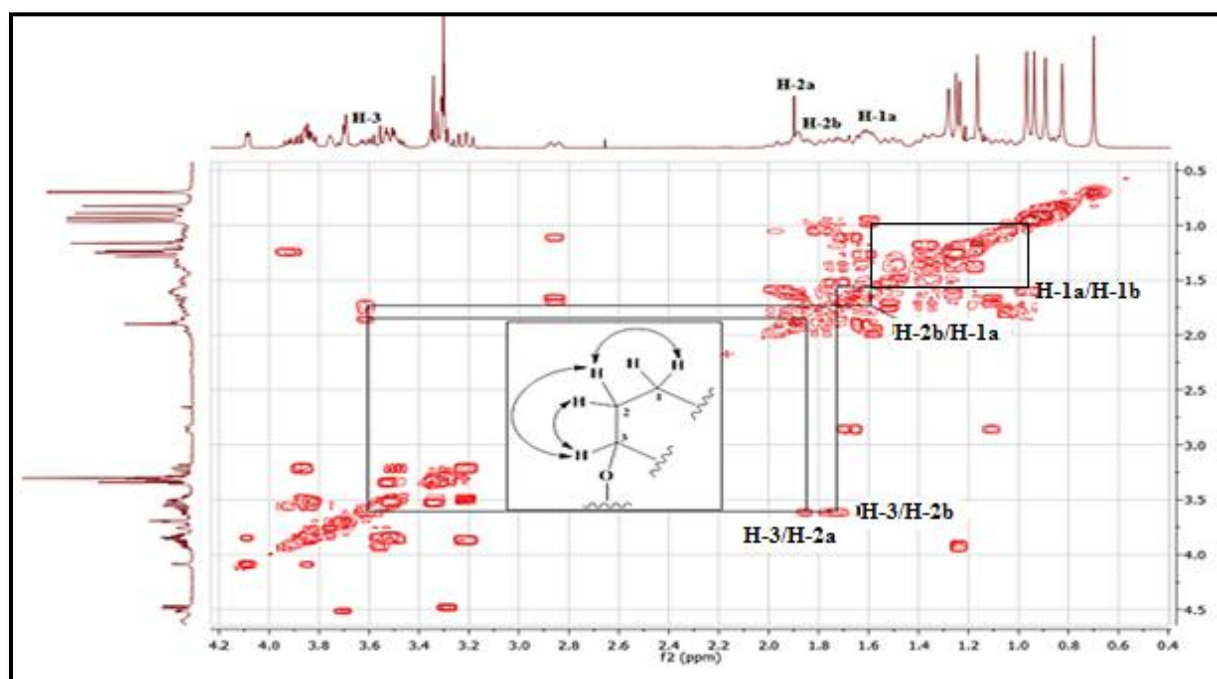


Figure 59 : Corrélations COSY H-H du composé **1**

Tous les carbones des protons de cet enchaînement sont déterminés par analyse du spectre HSQC *J*-modulé à δ_C 81,0 (C-3), 25,1 (C-2) et 38,0 (C-1) (**Figure 60**).

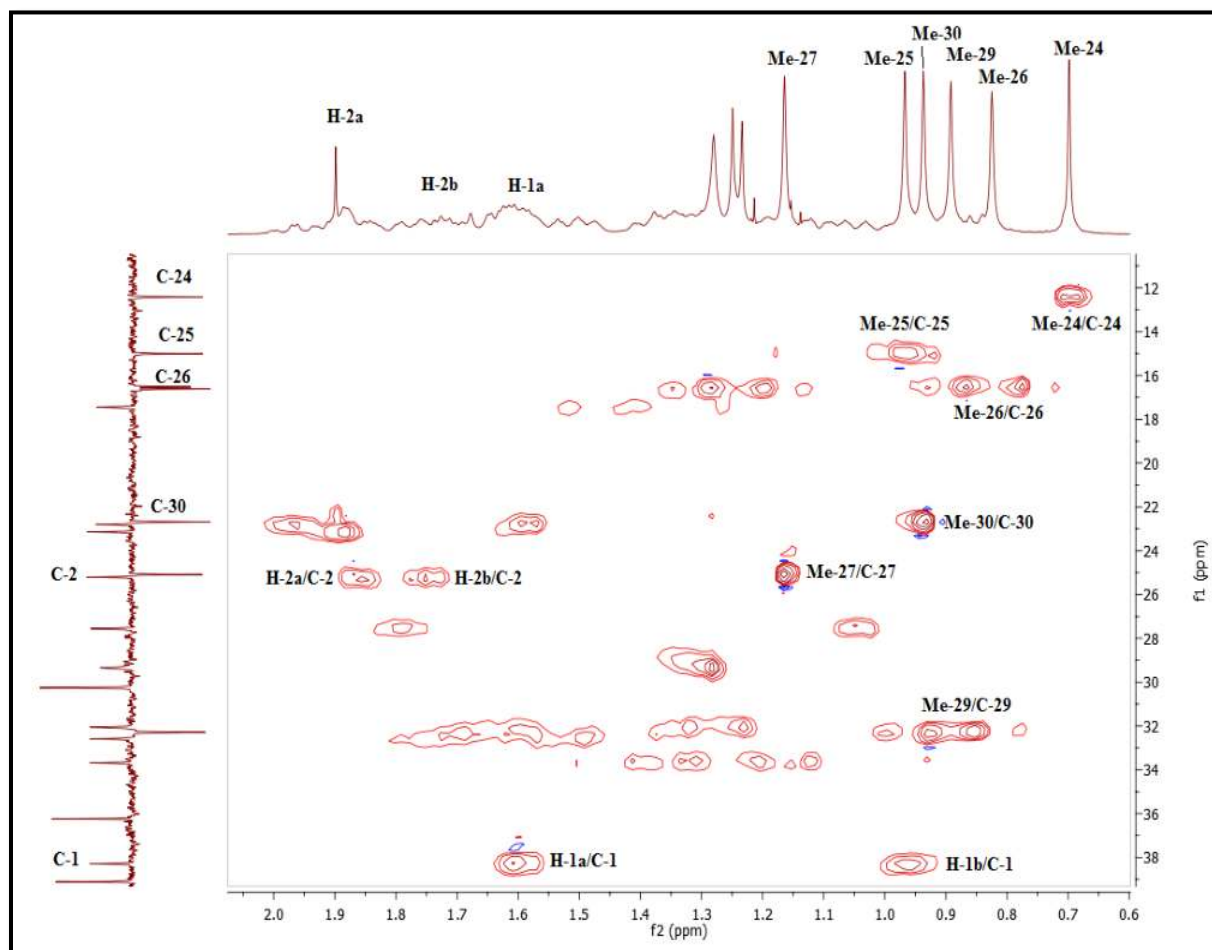


Figure 60 : Spectre HSQC *J*-modulé (Partie génine) du composé **1**

Le spectre HMBC de ce composé montre des corrélations entre le proton hydroxyméthine H-3 et le carbone du groupement méthyle en position C-24 à δ_C 12,1, un carbone quaternaire à 42,4 ppm ne pouvant être que le carbone C-4 de la génine et un autre carbone à δ_C 63,2 caractéristique du groupement hydroxyméthine (CH₂OH) en C-23. Les protons des carbones cités précédemment sont identifiés par l'analyse du spectre HSQC à δ_H 0,68 (H₃-24), 3,53 (H-23a) et 3,37 (H-23b) (**Figure 61**).

D'autres taches de corrélations sont visualisées entre les protons du groupement hydroxyméthine H-23a et H-23b et les carbones C-24, C-3, C-4 et un CH à δ_C 46,8 qui ne peut être que le carbone C-5 de la génine, son proton est repéré à 1,25 ppm sur le spectre HSQC. Les protons du groupement méthyle en CH₃-24 présentent sur le spectre HMBC (**Figure 62**) des couplages avec les carbones C-4, C-5, C-23 et C-3.

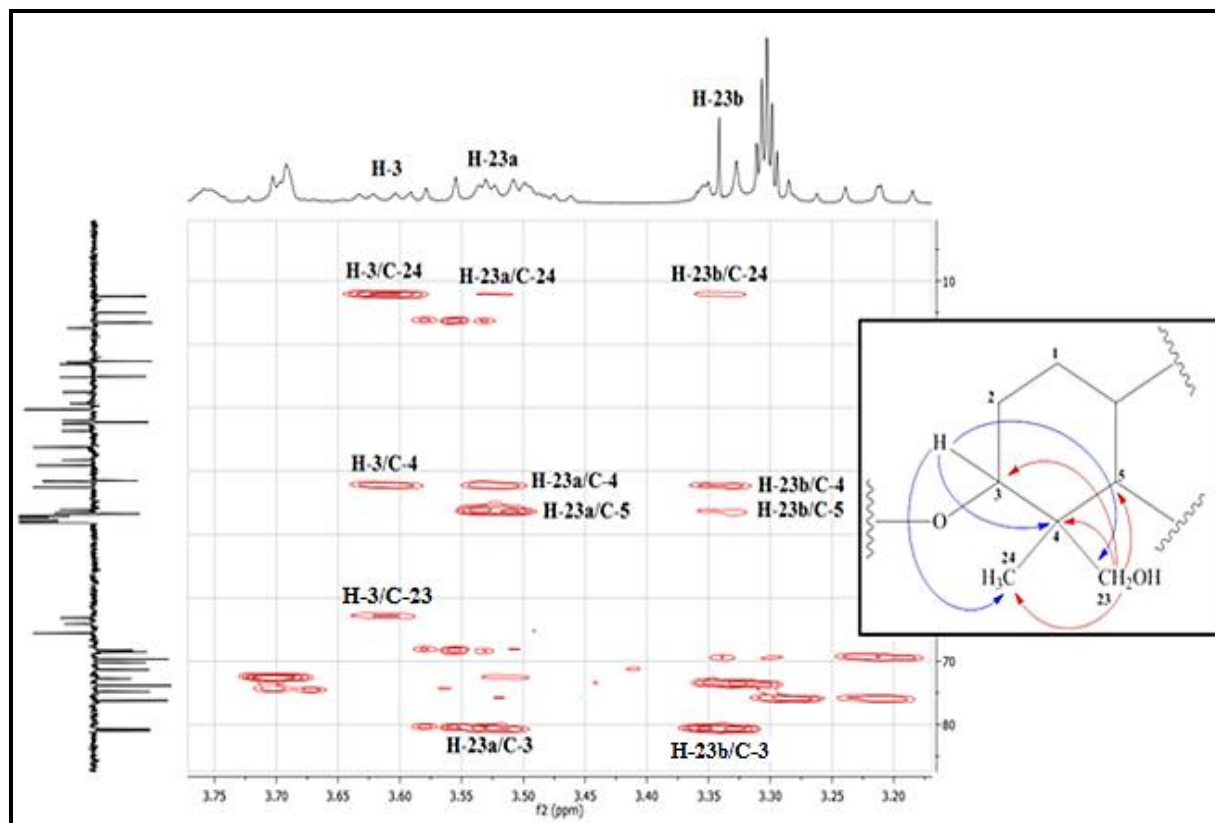
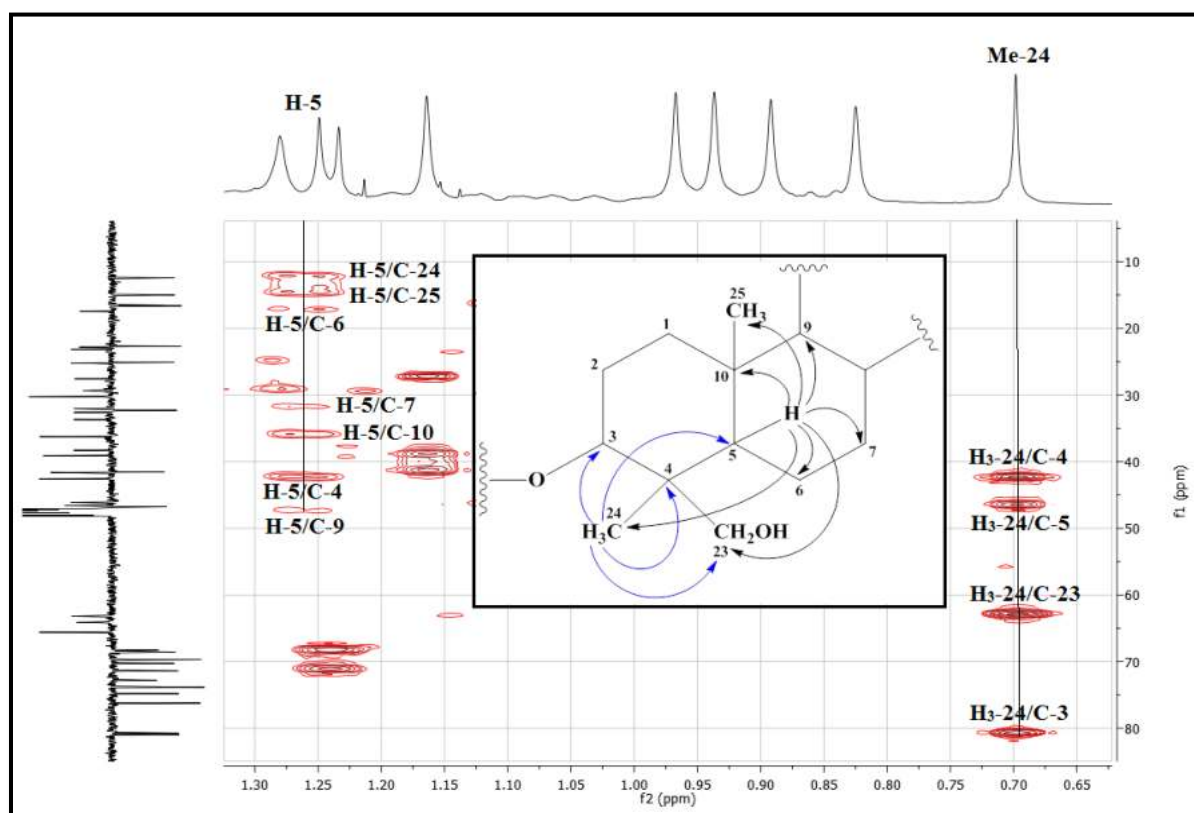
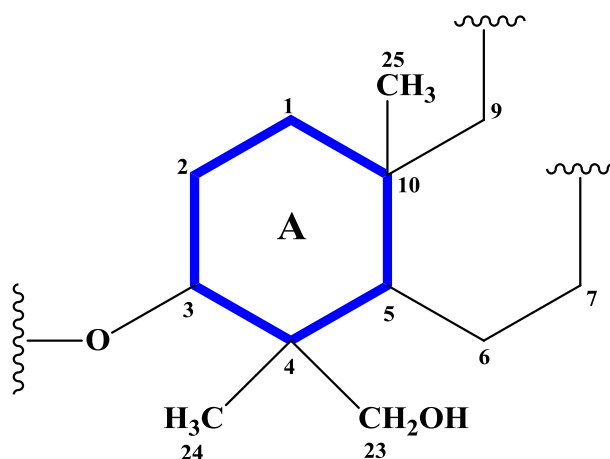


Figure 61 : Partie du spectre HMBC du composé 1

Figure 62 : Corrélations HMBC des protons H₃-24 et H-5

Le proton H-5 (δ_H 1,25) corrèle en HMBC (**Figure 62**) avec les carbones C-4, C-24 déjà assignés, un carbone quaternaire à δ_C 36,24 attribuable au carbone C-10, un groupement méthyle à 14,8 correspondant au Me-25 et deux groupements méthylènes à δ_C 17,4 et 32,1 attribuables aux carbones C-6 et C-7 respectivement. Aussi, ce proton présente une tache de corrélation avec un groupement méthine (CH) à δ_C 47,5 caractéristique du carbone C-9 du cycle B de la génine triterpénique. L'expérience HSQC *J*-modulé de ce composé permet la détermination de déplacements chimiques des protons correspondant aux groupements cités précédemment à δ_H 0,98 (H₃-25), 1,69 (H-9), 1,54 (H-6a), 1,34 (H-6b), 1,51 (H-7a) et 1,24 (H-7b).

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du cycle A sont déterminés.



Les protons du groupement Me-25 caractéristique de ce type de composé montrent sur le spectre HMBC des corrélations en 2J avec le carbone C-10 et en 3J avec les carbones C-5, C-1 et C-9. D'autres taches de corrélations sont observées entre le proton H-9 déjà assigné et les carbones C-10, C-25, deux carbones quaternaires à 38,9 et 41,3 ppm correspondent aux carbones C-8 et C-14 respectivement et un groupement méthylène à 22,7 ppm attribuable au carbone C-11 du cycle C de la génine.

Les corrélations apparus sur le spectre HMBC entre les protons du groupement méthyle (Me-26) à δ_H 0,81 et les carbones C-7, C-8, C-9 et C-14 permet de positionner ce groupement en C-8 (**Figure 63**). Les déplacements chimiques des protons de ces carbones sont identifiés par l'expérience HSQC à δ_H 1,69 (H-9), 1,99 (H-11a) et 1,61 (H-11b).

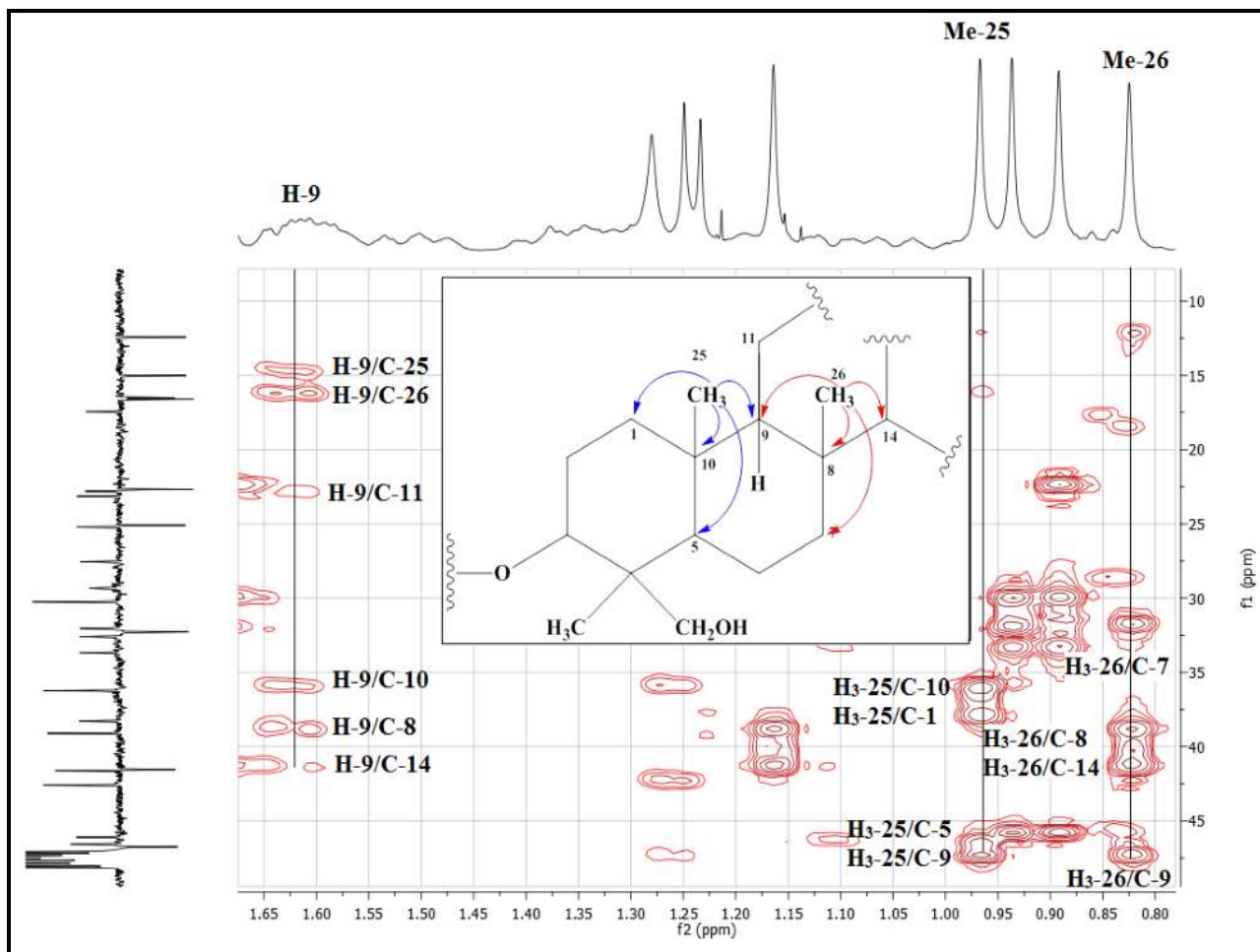
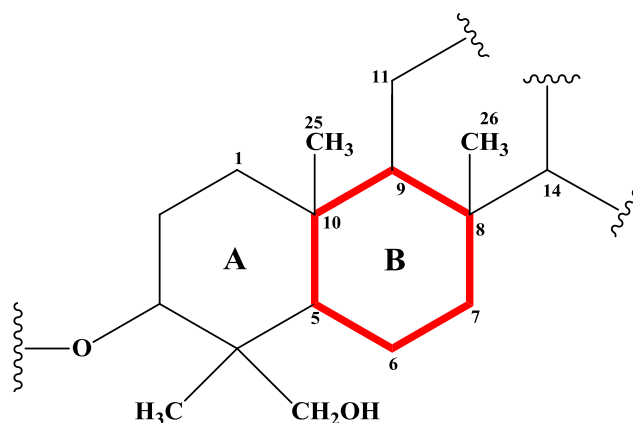


Figure 63 : Partie du spectre HMBC montrant les couplages des protons H₃-25, H₃-26 et H-9

A cette étape d'interprétation tous les protons et carbones du cycle B ont été identifiés.



A partir des protons H₂-11 déjà assignés et selon le spectre COSY H-H (**Figure 64**), on peut déterminer la valeur de déplacement chimique du proton éthylénique H-12 à δ_{H} 5,23 (*t*, $J = 3,5$ Hz), son carbone est repéré par l'expérience HSQC *J*-modulé à δ_{C} 121,9.

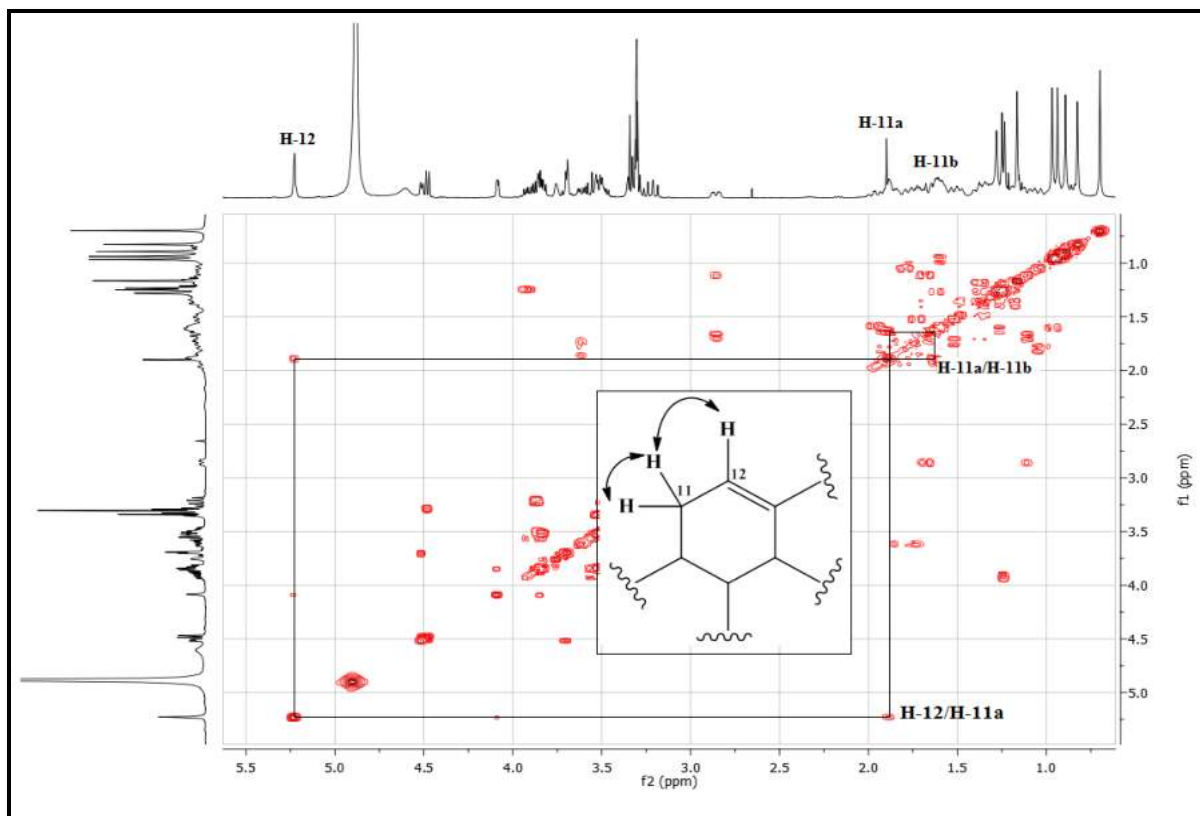


Figure 64 : Spectre COSY H-H du composé 1

Sur le spectre HMBC (Figure 65) de ce composé le proton éthylénique H-12 présente des taches de corrélation avec les carbones C-9, C-11 et C-14 déjà caractérisés et un CH à 41,3 ppm, caractéristiques du carbone C-18 des triterpènes, son proton est assigné à δ_H 2,86 (*dd*, $J = 14,0 ; 4,5$ Hz) par analyse du spectre HSQC.

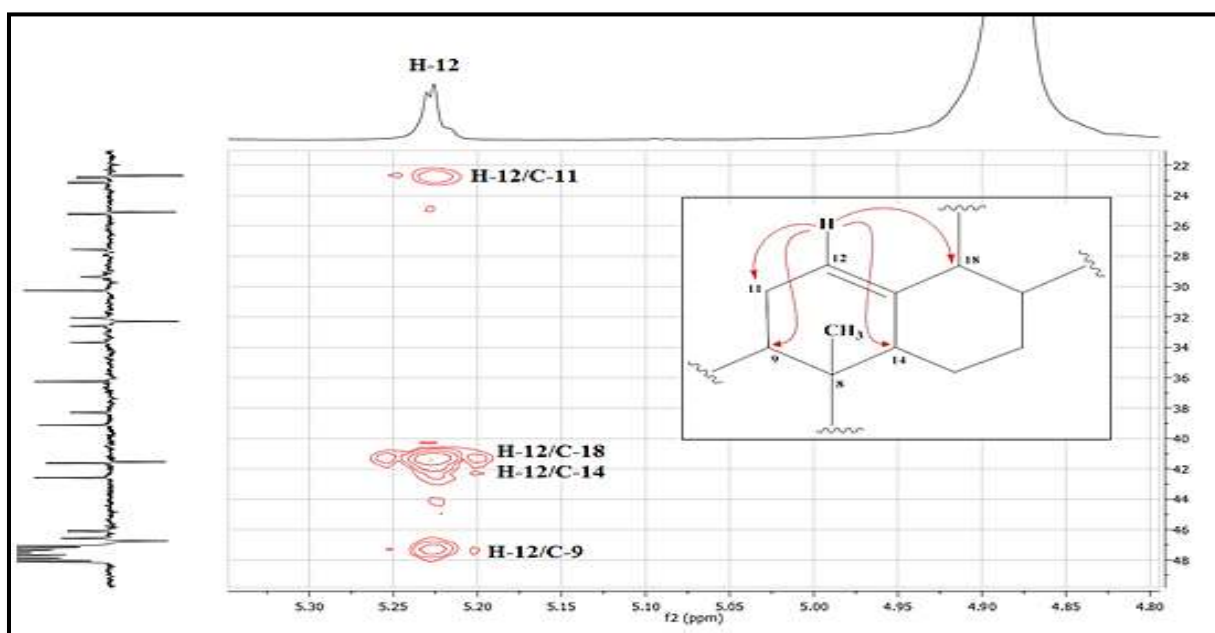


Figure 65 : Corrélations HMBC du proton éthylénique H-12

Les protons du groupement méthylène H-11a et H-11b montrent des corrélations en HMBC (**Figure 66**) avec les carbones C-9, C-8 et C-12 et un carbone quaternaire éthylénique à δ_C 144,3 ne pouvant être que le carbone C-13 du cycle C de la génine.

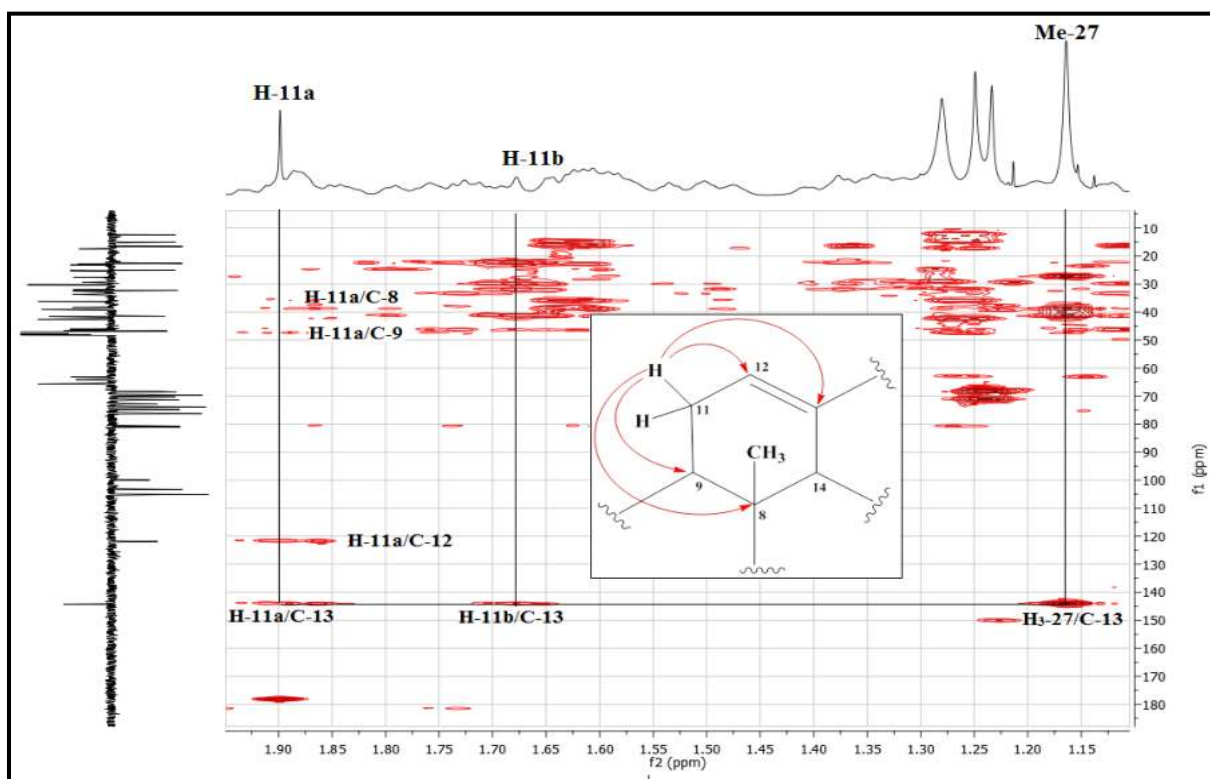
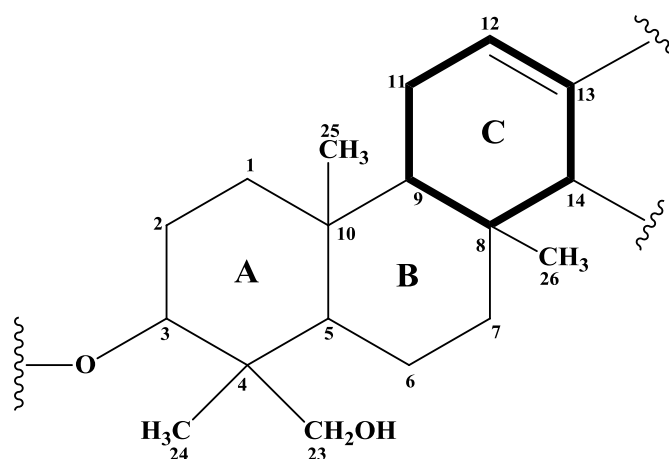


Figure 66 : Corrélations HMBC des protons H-11a et H-11b

A ce stade d'interprétation tous les déplacements chimiques des carbones et protons du cycle C sont déterminés. Donc, il reste à déterminer les deux cycles D et E du triterpène à squelette oléanane.



Les corrélations observées sur le spectre HMBC (**Figure 67**) entre les protons du groupement méthyle (Me-27) à δ_H 1,16 et les carbones C-8, C-14 et C-13 déjà identifiés nous permet de localiser ce groupement en position C-14. Son carbone est déterminé par

l'expérience HSQC à δ_C 25,1. Aussi, ces protons couplent sur le spectre HMBC avec un groupement méthylène à δ_C 27,6 attribuable au carbone C-15, ses protons sont repérés à δ_H 1,07 (H-15b) et 1,80 (H-15a) selon l'expérience HSQC *J*-modulé.

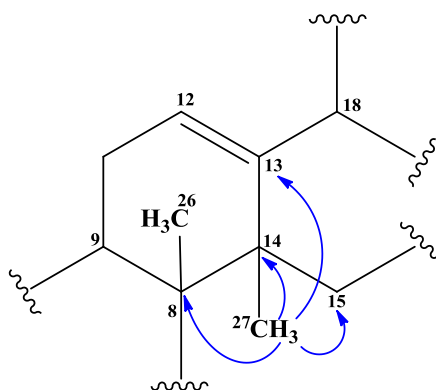


Figure 67 : Corrélations HMBC des protons du méthyle-27

La formation du cycle D de la génine est confirmée par les corrélations HMBC observées entre le proton H-18 déjà identifié et les carbones C-13, C-14 et un CH₂ à δ_C 22,7 attribuable au carbone C-16, ses protons sont détectés à 1,90 ppm par analyse du spectre HSQC. Le proton H-18 montre également une tache de corrélation avec un carbone quaternaire à δ_C 46,0 caractéristique du carbone C-17 d'un triterpène à squelette oléanane (**Figure 71**). La corrélation visualisée sur le spectre HMBC entre les protons H-16 (δ_H 1,90) et la fonction acide à δ_C 178,25 permet de localiser cette dernière en position C-17.

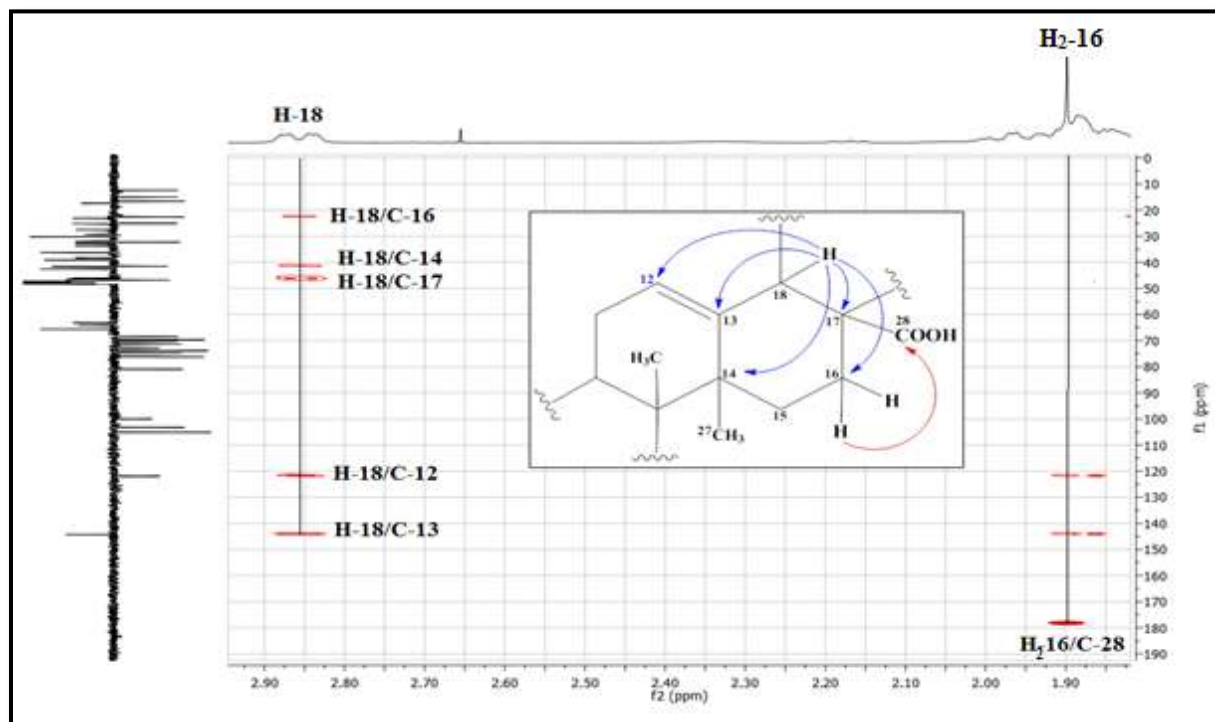
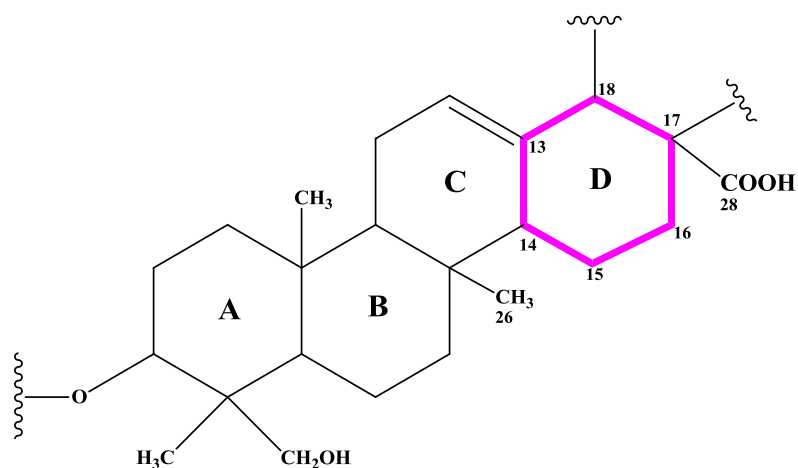


Figure 68 : Corrélations HMBC des protons H-18 et H₂-16

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du cycle D sont assignés.



Le spectre COSY H-H (**Figure 69**) du composé **1** montre un système de spins à trois protons qui visualise les couplages entre le proton méthine H-18 à δ_H 2,86 et les protons du groupement méthylène à δ_H 1,66 et 1,18 attribuables aux protons H-19a et H-19b respectivement, leur carbone est repéré à δ_C 46,03 par analyse du spectre HSQC.

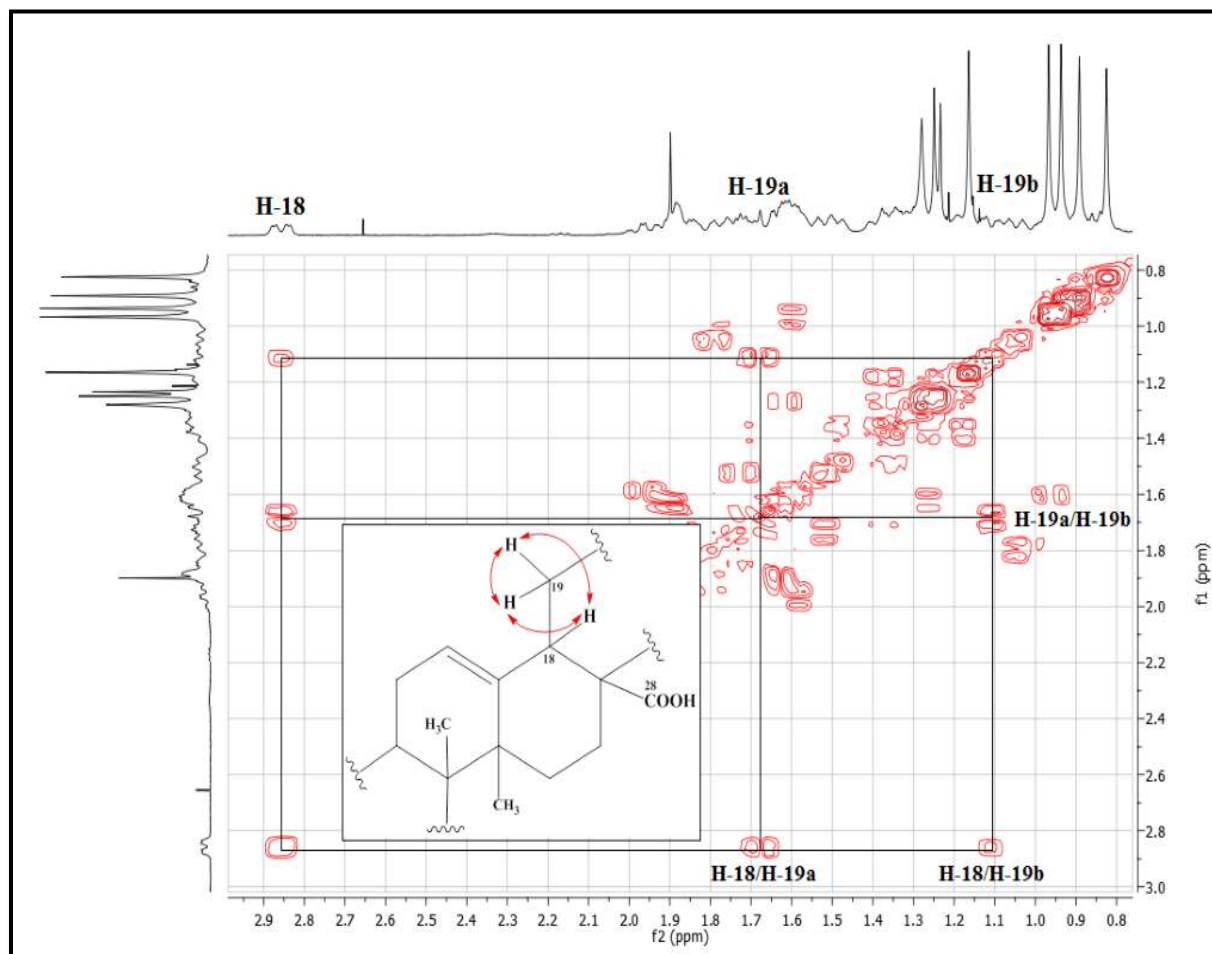


Figure 69 : Partie du spectre COSY H-H du composé **1**

Les deux groupements méthyles en position Me-29 (δ_H 0,85 ; δ_C 32,0) et Me-30 (δ_H 0,93 ; δ_C 22,5) caractéristiques du squelette oléanane couplent sur le spectre HMBC entre eux, avec le carbone C-19 déjà déterminé, un carbone quaternaire à 30,3 ppm ne pouvant être que le carbone C-20 porteur de deux groupement méthyle et un carbone méthylène à 33,7 ppm attribuable au carbone C-21, ses protons sont identifiés par HSQC *J*-modulé à δ_H 1,35 (H-21a) et 1,14 (H-21b) (**Figure 70**).

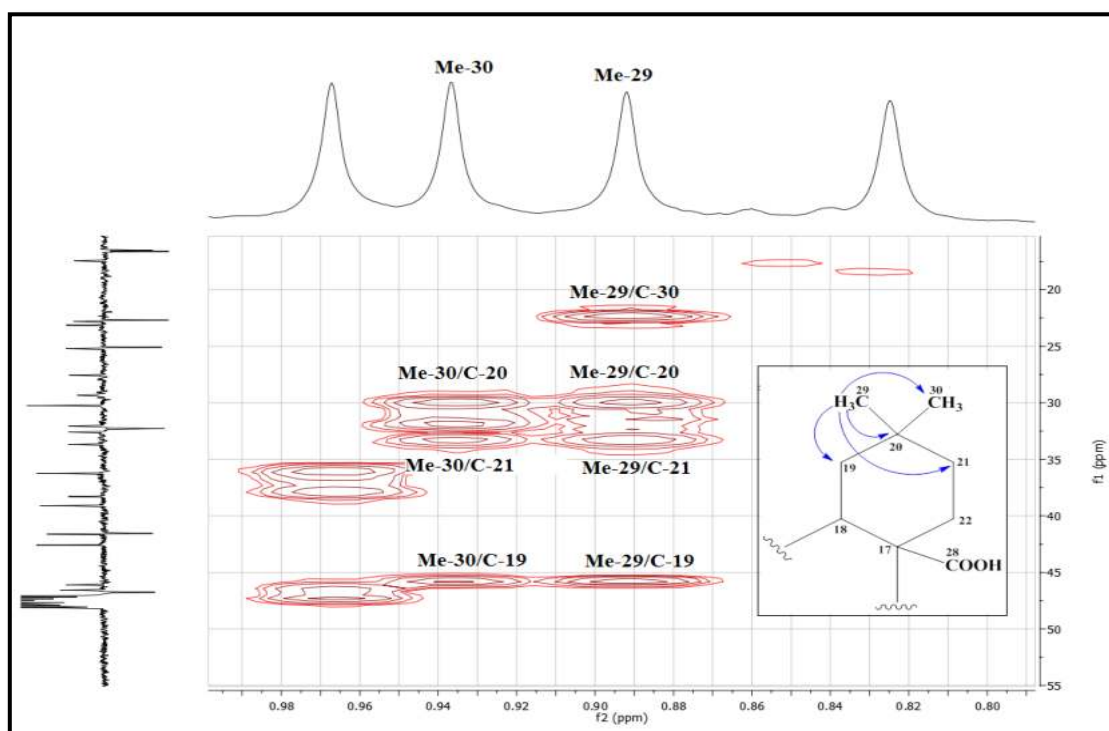


Figure 70 : Partie du spectre HMBC du composé 1

Le proton H-21b couple en HMBC avec les carbones C-19, C-20 et un carbone méthylénique à δ_C 32,2 attribuable au carbone C-22, ses protons sont assignés par analyse du spectre HSQC à δ_H 1,68 (H-22a) et 1,47 (H-22b). D'autres corrélations sont visualisées entre les protons H-22a et H-22b et les carbones C-20, C-21, C-18 et C-16 (**Figure 71**).

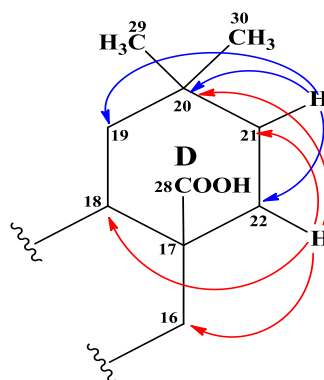
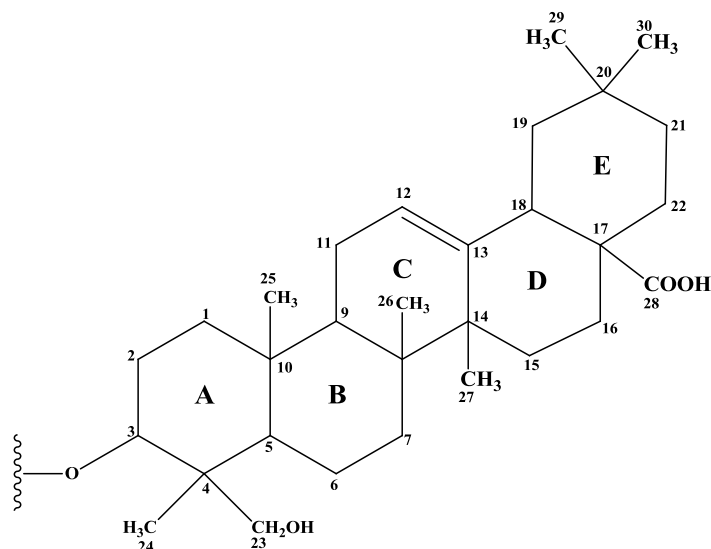


Figure 71 : Corrélations HMBC au niveau du cycle D

A ce stade d'interprétation tous les protons et carbones de la génine triterpénique sont identifiés à l'hederagenine (Joshi *et al.*, 1999) .



La stéréochimie relative des centres asymétriques de la génine est identifiée par analyse des valeurs des constantes de couplage et des effets NOE observés sur le spectre NOESY (Figures 72).

- La stéréochimie α -axiale du proton hydroxyméthine H-3 est confirmée par les effets nOe visualisés entre les protons H-3/ H-5 et la valeur de la constante de couplage $J = 12,0$ Hz entre les protons H-3ax et H-2ax.
- Les effets nOe visualisés entre le proton H-5/H-9, H-5/H-23a et H-5/H-23b permettent de mettre le proton H-9 et le groupement hydroxyméthylène CH₂OH-23 sur la face α .
- L'orientation α -axiale du groupement Me-27 est établie suite à sa corrélation avec le proton H-9 α -orienté.
- L'orientation β -axiale du proton méthine H-18 est prouvée par l'effet nOe apparu sur le spectre NOESY, entre les protons H-18/H-12 et par la grande constante de couplage $J = 14,2$ Hz entre les protons axiaux H-18 et H-19.
- Les effets nOe observés entre les protons CH₃-24, CH₃-25 et CH₃-26 confirment l'orientation β -axiale de ces méthyles.
- D'autres effets nOe sont visualisés entre les protons du groupement méthyle Me-27 et les protons H-22a et H-16.

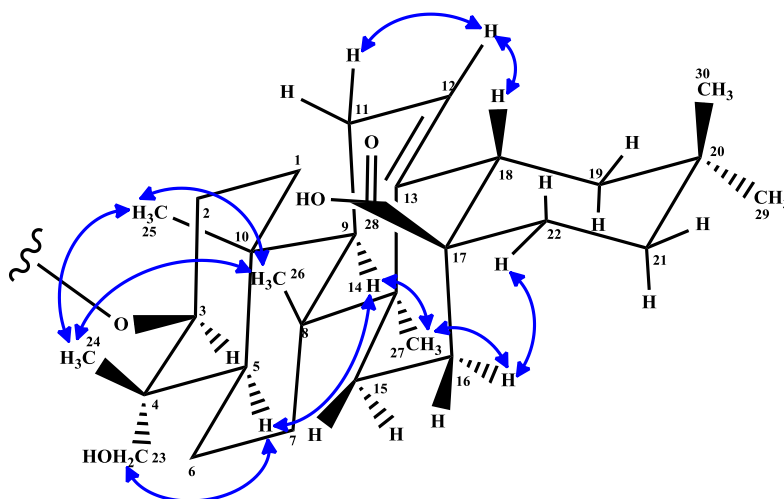


Figure 72 : Corrélations NOESY de la partie génine du composé 1

1-1-2-Identification de la partie osidique

L'analyse conjointe des spectres COSY H-H et TOCSY conduit à l'identification de trois groupements osidiques par l'observation des corrélations entre les protons dans différents systèmes de spins.

Partant du proton anomérique H-1' du premier sucre [δ_H 4,51 (*d*, $J = 6,0$ Hz)], il est facile d'identifier un système de spins à six protons selon l'expérience COSY (Figure 73) incluant les protons H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'a/H-5'b, ce qui permet d'attribuer leur déplacements chimiques : H-2' [δ_H 3,70 (*d*, $J = 4,3$ Hz)], H-3' [δ_H 3,68 (*dl*, $J = 3,4$ Hz)], H-4' [δ_H 3,76 (*m*)], H-5'a [δ_H 3,85 (*m*)] et H-5'b [δ_H 3,52 (*dd*, $J = 9,4 ; 3,3$ Hz)].

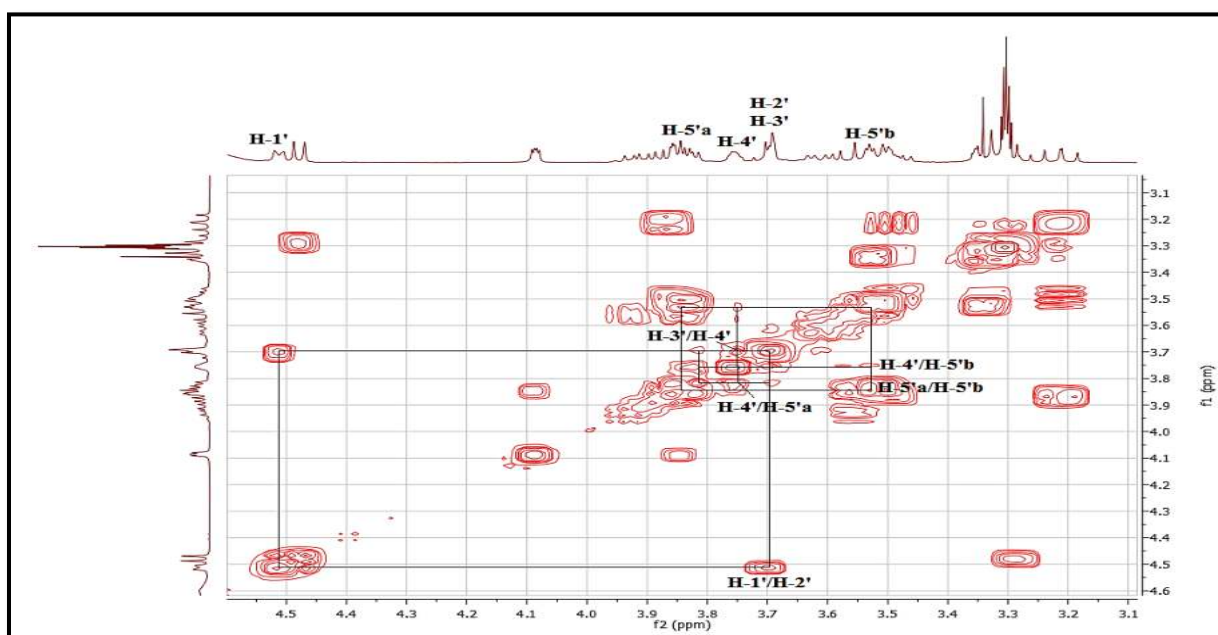


Figure 73 : Corrélations COSY H-H du premier sucre (Arabinose)

Les carbones des protons cités précédemment sont assignés par l'expérience HSQC à δ_C 103,2 (C-1'), 74,6 (C-2'), 72,6 (C-3'), 68,1 (C-4') et 63,9 (C-5') donc il s'agit d'un pentose de type xylose ou arabinose (**Figure 74**).

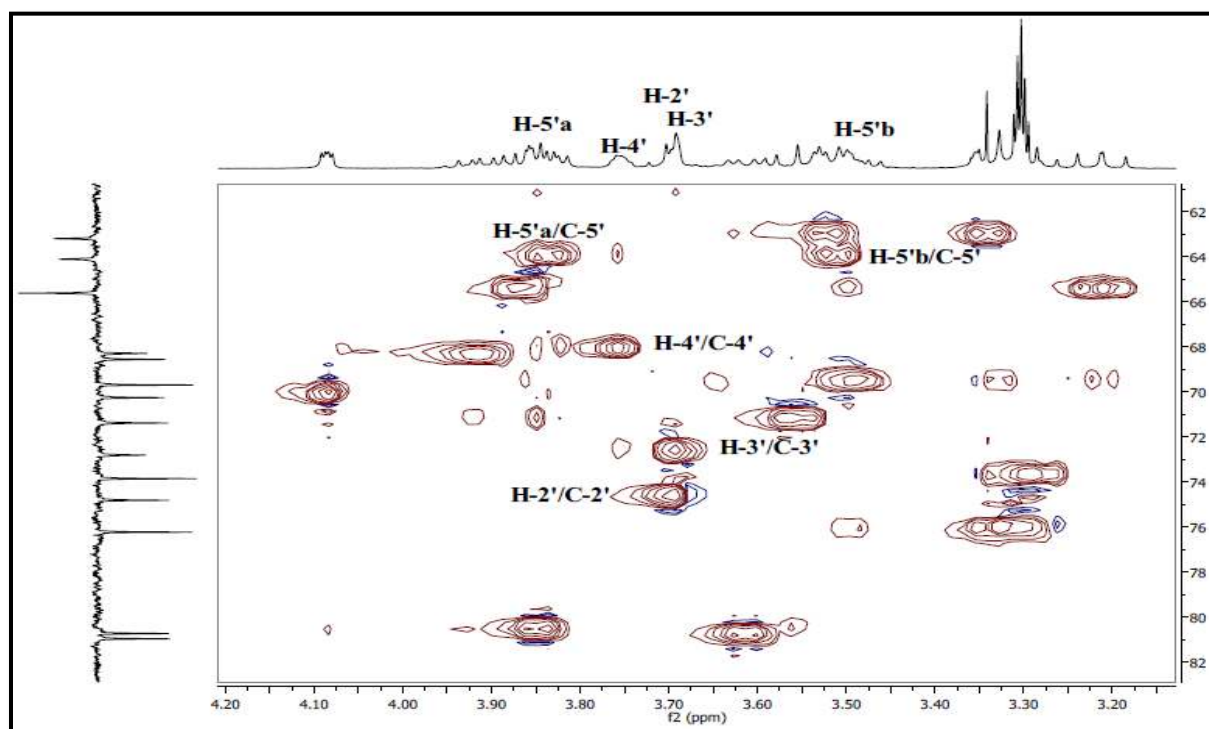
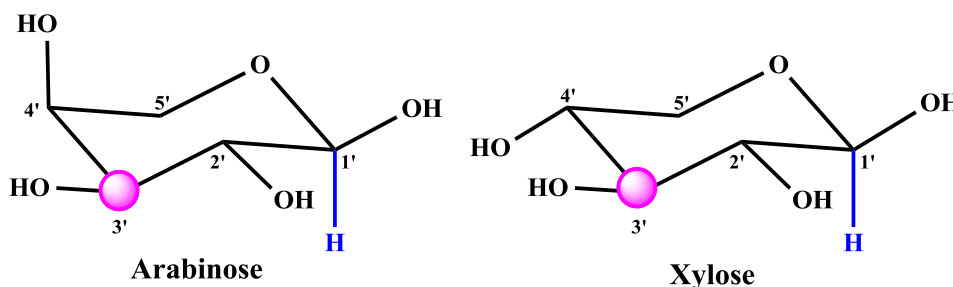


Figure 74 : Spectre HSQC de la partie osidique

La confirmation du type de sucre est faite par la comparaison avec les données de la littérature en comparant les valeurs de déplacements chimiques des carbones en position C-3' et les valeurs des constantes de couplage des protons H-1' et H-3'. En effet, dans le cas d'un xylose le carbone C-3' est apparue à δ_C 77,0, $J_{H-1'} = 7$ Hz et $J_{H-3'} = 8,0$ Hz, mais dans le cas d'un arabinose le carbone C-3' sort à δ_C 72,0, $J_{H-1'} = 6$ Hz et $J_{H-3'} = 3,4$ Hz (**Lehbili^b et al., 2018**) ce qui est en accord avec nos résultats (C-3' δ_C 72,6 et $J_{H-1'} = 6,0$ Hz). En conséquence, le premier sucre est un arabinose.



Le spectre HMBC (**Figure 75**) de ce composé confirme ainsi ces attributions par les corrélations observées entre:

- Le proton anomère H-1' et le carbone C-3'

- Les protons H-3', H-5a' et H-5b' avec le carbone anomère C-1'
- Les protons H-5'a et H-5'b et les carbones C-3' et C-4'
- Le proton H-3' et le carbone C-2' et entre le proton H-2' et le carbone C-3'

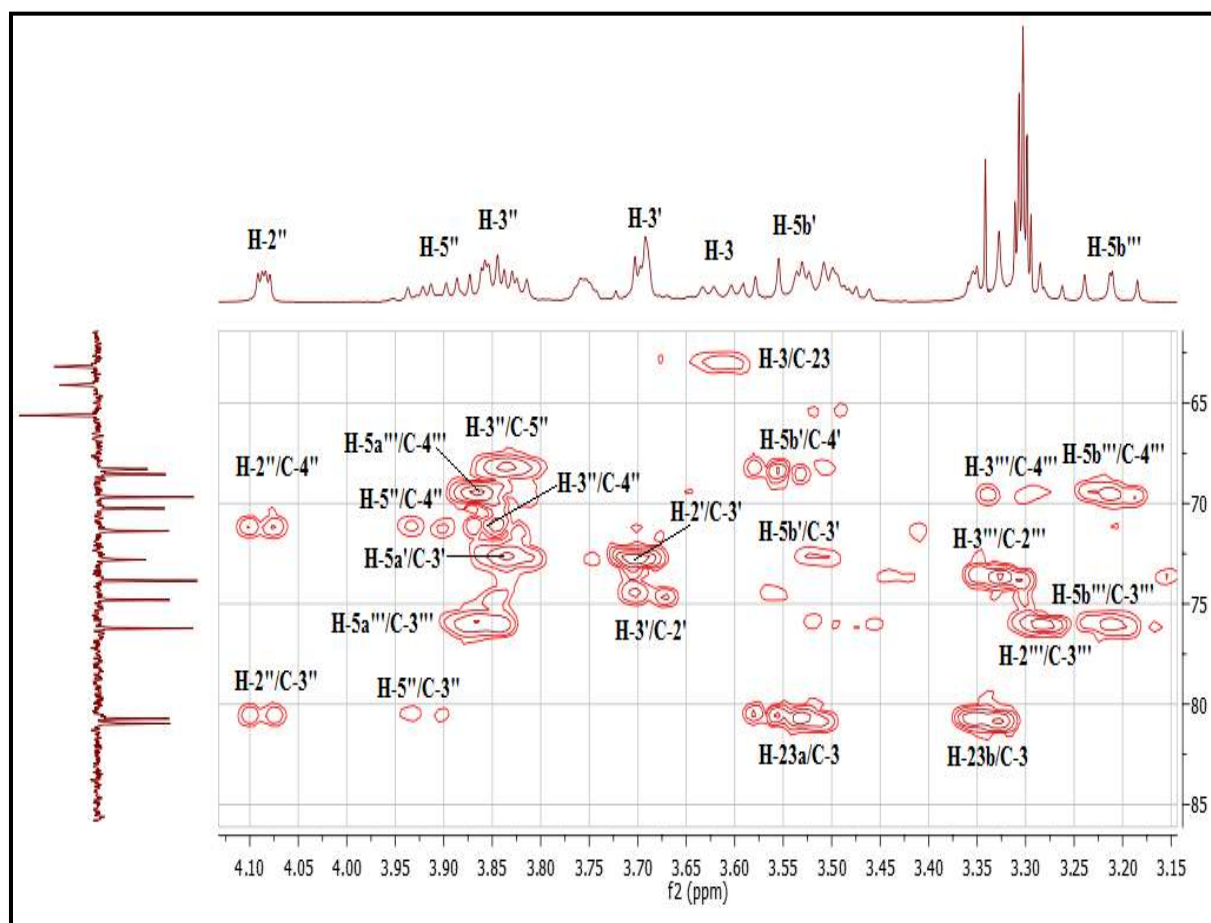


Figure 75 : Spectre HMBC de la partie osidique du composé 1

En partant du 2^{ème} proton anomérique H-1" [δ_{H} 5,23 (*d*, $J = 1,6$ Hz)], un autre système de spins à six protons d'un hexose est observé sur le spectre COSY H-H (**Figure 76**). Ce spectre montre la présence des corrélations entre le proton anomérique H-1" et le proton H-2" [δ_{H} 4,12 (*dd*, $J = 3,1; 1,8$ Hz)]; H-2" et H-3" [δ_{H} 3,83 (*dd*, $J = 9,2; 3,1$ Hz)]; H-3" et H-4" [δ_{H} 3,53 (*t*, 9,2 Hz)]. Ce dernier couple aussi avec le proton H-5" [δ_{H} 3,95 (*m*)] qui corrèle à son tour avec les protons du groupement méthyle H₃-6" résonant à δ_{H} 1,22 sous forme de doublet ($J = 6,2$ Hz) (**Figure 77**). La grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-4"/H-3" ($J = 9,2$ Hz) indique la position *trans*-diaxiale de ces protons, tandis que la valeur de la constante de couplage $J = 3,1$ Hz entre H-2"/H-3" révèle la position équatoriale du proton H-2". Les valeurs des constantes de couplage de ce sucre indiquent clairement la présence d'un α -L-rhamnose.

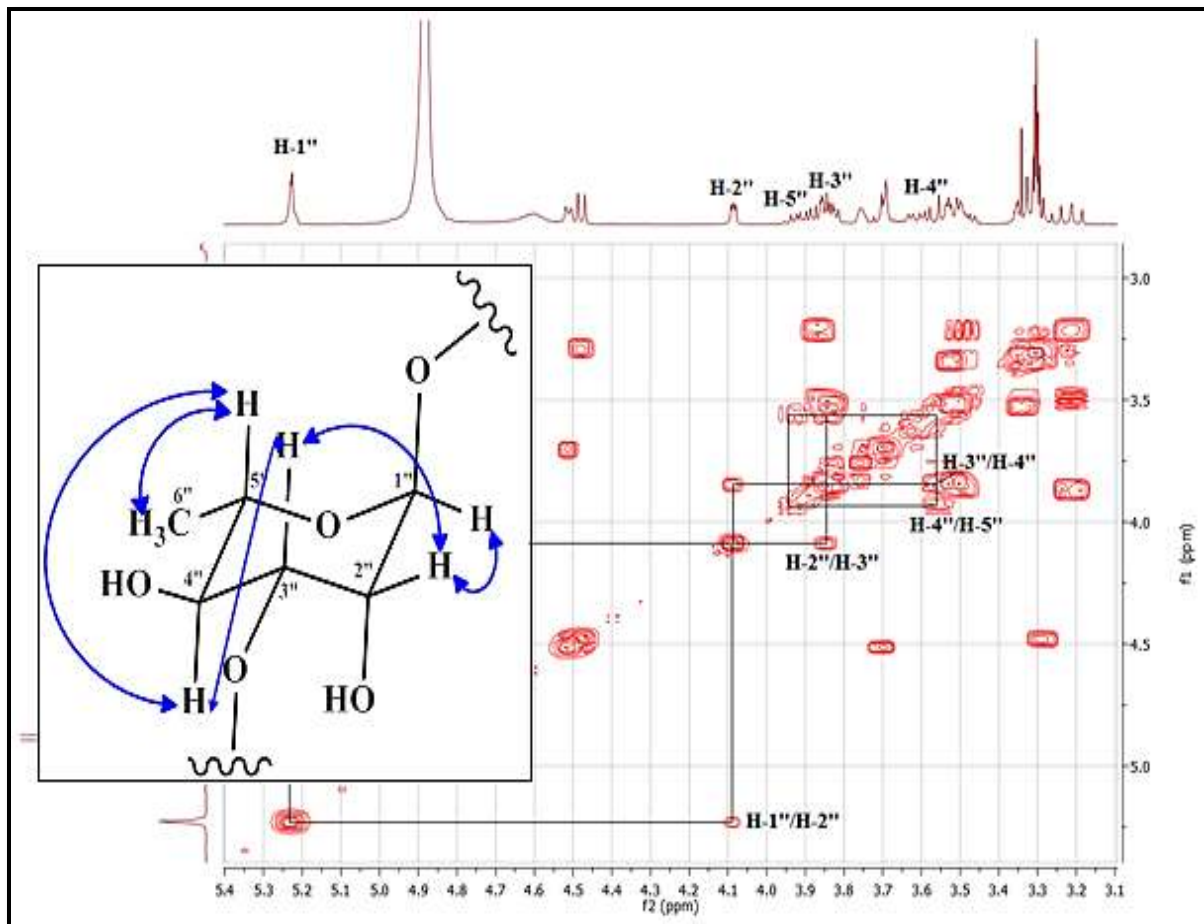


Figure 76 : Corrélations COSY H-H du deuxième sucre (α -L-rhamnose)

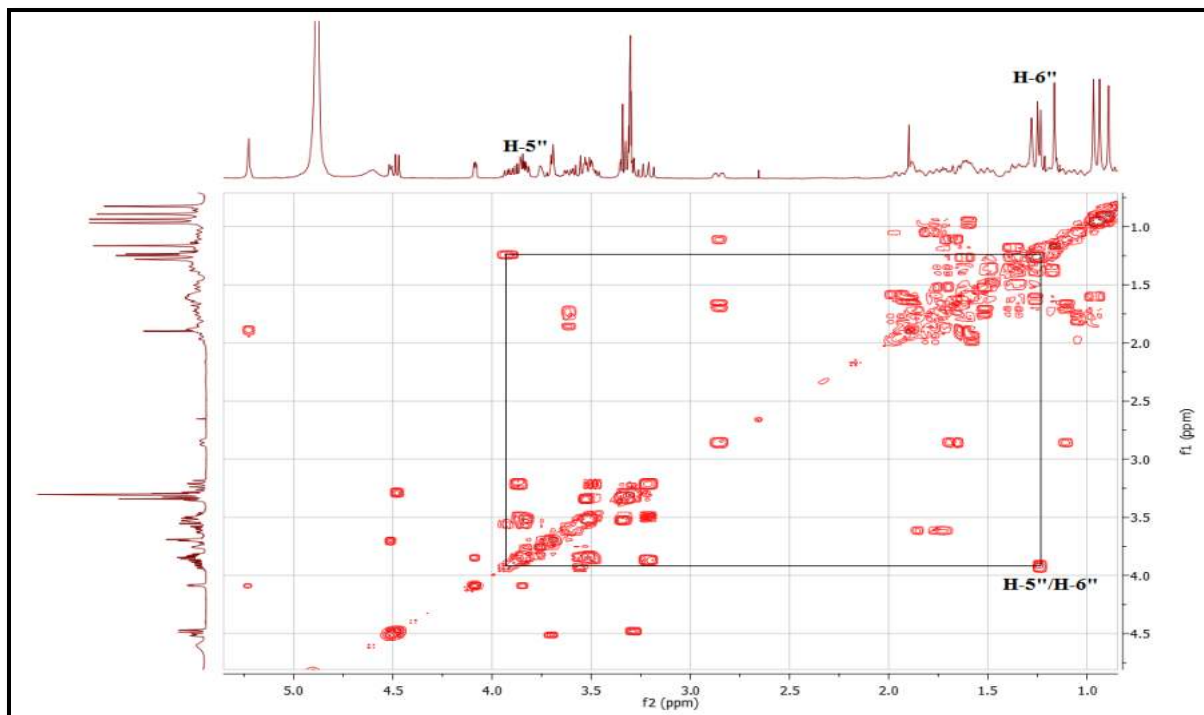


Figure 77 : Corrélations COSY H-H du groupement méthyle de α -L-rhamnose

L'analyse du spectre TOCSY de ce composé montre également la présence de α -L-rhamnose par les corrélations visualisées entre le proton H-2'' et les protons H-1'', H-3'', H-4'' et H-5'' (**Figure 78**).

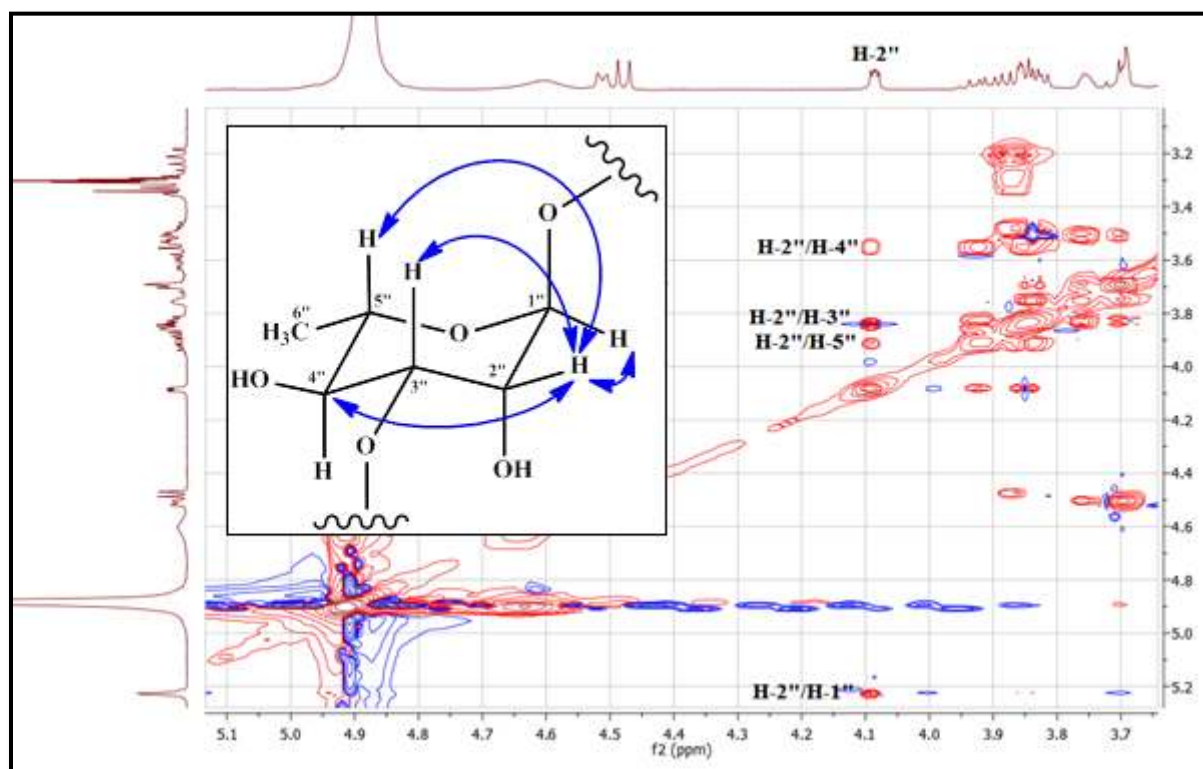


Figure 78 : Partie du spectre TOCSY du composé **1**

Tous les déplacements chimiques des carbones correspondant de α -L-rhamnose sont déterminés par l'expérience HSQC J -modulé à δ_C 99,8 (C-1''), 70,0 (C-2''), 80,6 (C-3''), 71,2 (C-4''), 68,3 (C-5'') et 16,4 (C-6'').

Le spectre HMBC présente des taches de corrélations en 2J et 3J entre :

- Le proton anomère H-1'' et les carbones C-3'', C-5''
- Le proton H-2'' et les carbones C-3'' et C-4''
- Le proton H-3'' et les carbones C-4'' et C-5''
- Le proton H-5'' et le carbone C-4''
- Les protons du groupement méthyle H₃-6'' et les carbones C-4'' et C-5''

En plus, le spectre COSY (**Figure 79**) du composé **1** exhibe un autre système de spins à six protons d'un pentose dont le proton anomère H-1''' résonne à δ_H 4,48 (*d*, $J = 7,2$ Hz). Ce dernier corrèle avec le proton H-2''' [δ_H 3,28 (*m*)], qui couple à son tour avec le proton H-3''' [δ_H 3,31 (*m*)]. Le proton H-3''' corrèle avec le proton H-4''' résonant à δ_H 3,48 (*m*). Ce dernier présente un système de spins avec les protons du groupement méthylène H₂-5''' à δ_H 3,89 (*dd*, $J = 10,3$; 5,8 Hz ; H-5'''a) et 3,21 (*dd*, $J = 11,4$; 10,3 Hz ; H-5'''b).

Les carbones de ce pentose u β -D-xylose sont identifiés par l'expérience HSQC à δ_C 104,9 (C-1'''), 73,7 (C-2'''), 76,0 (C-3'''), 69,5 (C-4''') et 65,4 (C-5''').

La nature de ce sucre (**β -D-xylose**) est déterminée par les valeurs des constantes de couplage qui sont toutes supérieures à 7 Hz et le déplacement chimique du carbone en position C-3''' à δ_C 76,0.

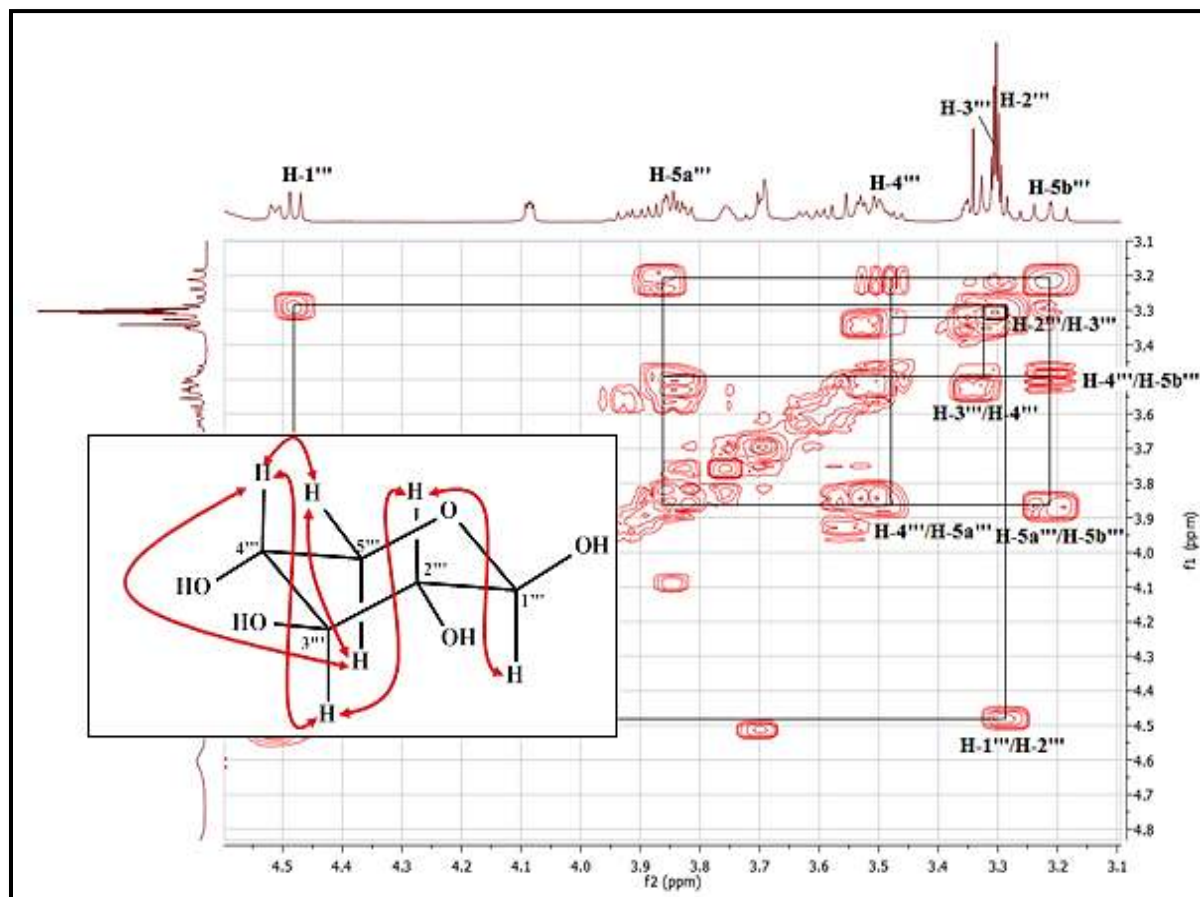


Figure 79 : Corrélations COSY H-H du troisième sucre (**β -D-xylose**)

L'analyse du spectre TOCSY (**Figure 80**) montre également la présence de β -D-xylose par les corrélations visualisées entre :

- Le proton anomère H-1''' et les protons H-2''', H-3''', H-4''', H-5a''' et H-5b'''
- Le proton H-2''' et les protons H-1''', H-3''', H-4''', H-5a''' et H-5b'''
- Le proton H-3''' et les protons H-1''', H-2''', H-4''', H-5a''' et H-5b'''
- Le proton H-4''' et les protons H-1''', H-2''', H-3''', H-5a''' et H-5b'''
- Le proton H-5a''' et les protons H-1''', H-2''', H-3''', H-4''' et H-5b'''
- Le proton H-5b''' et les protons H-1''', H-2''', H-3''', H-4''' et H-5a'''

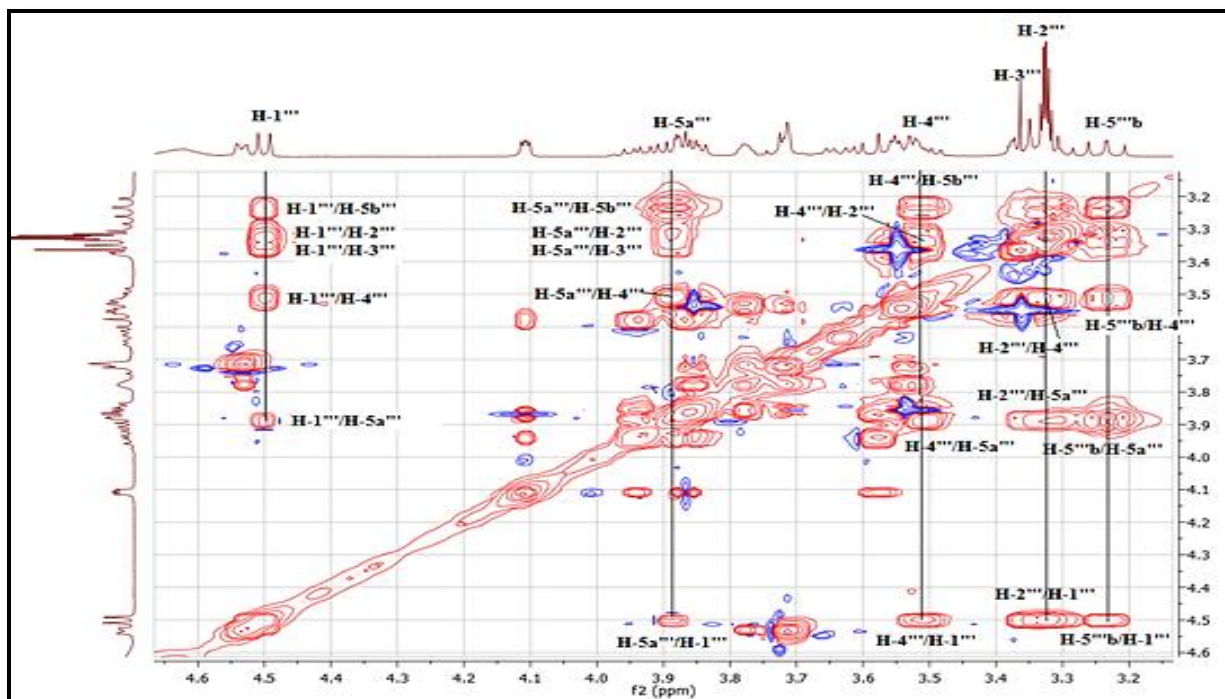


Figure 80 : Corrélations TOCSY du troisième sucre (β -D-xylose)

Les points de branchements des sucres et de la génine triterpénique ont été établis à partir de l'expérience HMBC (**Figure 81**) qui montre des taches de corrélations entre : le proton anomère H-1' de l'arabinose à δ_H 4,51 et le carbone C-3 (δ_C 81,0) de la génine, le proton anomère H-1'' de α -L-rhamnose à δ_H 5,22 et le carbone C-2' (δ_C 74,6) de l'arabinose et entre le proton anomère H-1''' du β -D-xylose à δ_H 4,48 et le carbone C-3'' (δ_C 80,6) du sucre α -L-rhamnose

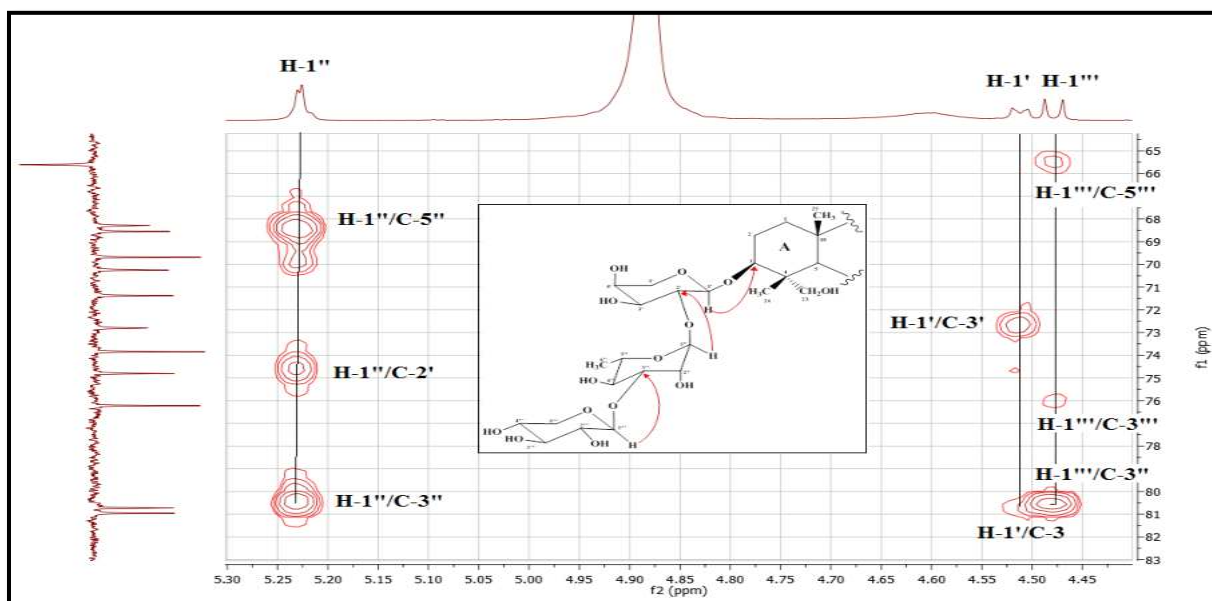
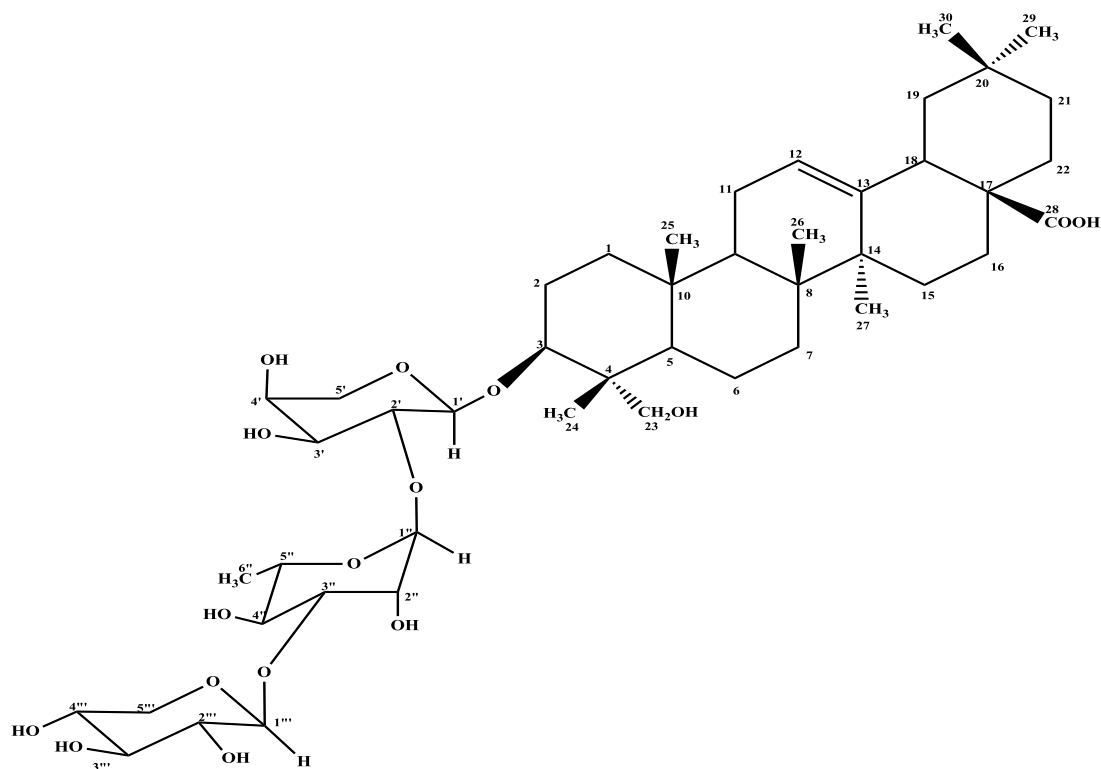


Figure 81 : Partie du spectre HMBC du composé **1** montrent les points de branchement entre la génine triterpénique et les unités osidiques

A l'issu de cette analyse spectrale complète tous les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **1** ont été déterminés.



L'ensemble de ces données spectroscopiques et la comparaison avec celles de la littérature (**Panov et al, 2006**), nous permettent d'identifier la structure du composé **1** comme étant une saponine nommé: Hederagenine 3-*O*-[[β -D-xylopyranosyl-(1''' \rightarrow 3'')]-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' \rightarrow 2')]-*O*- α -L-arabinopyranosyl]. Ce composé a été isolé antérieurement des espèces *Kalopanax septemlobum* et *Akebia quinata* (**Ikuta 1991 ; Panov et al, 2006**). Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 25**).

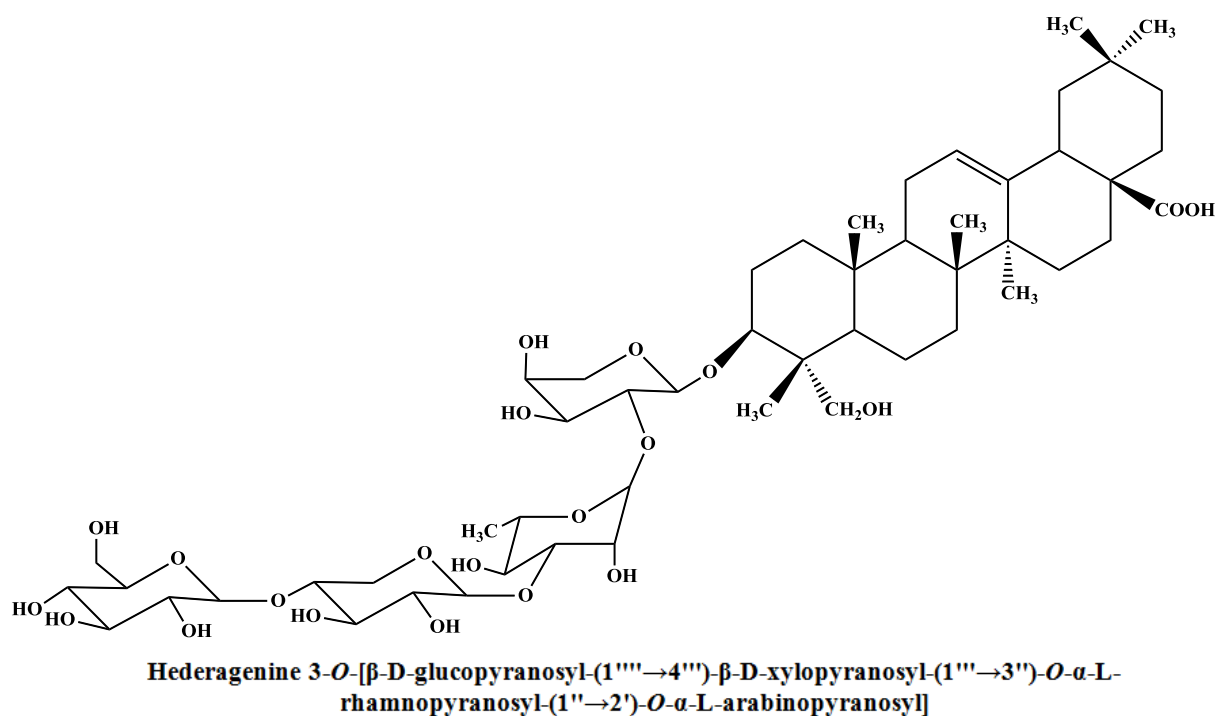
Tableau 25 - Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **1** dans le méthanol deutéré.

Position	δ_{H} m J Hz	δ_{C}
1	1,60 H-1a m ; 0,95 H-1b m	38,0
2	1,89 H-2a m ; 1,77 H-2b m	25,1
3	3,61 H-3 dd (12,1; 4,8)	81,0
4	-	42,4
5	1,25 m	46,6
6	1,54 H-6a m ; 1,45 H-6b m	17,3
7	1,51 H-7a m ; 1,34 H-7b m	31,8

8	-	38,9
9	1,69 <i>m</i>	47,4
10	-	36,2
11	1,95 H-11a <i>m</i> ; 1,59 H-11b <i>m</i>	22,6
12	5,23 <i>t</i> ; 3,5	121,9
13	-	144,3
14	-	41,3
15	1,80 H-15a <i>m</i> ; 1,05 H-15b <i>m</i>	27,2
16	1,88 <i>m</i>	22,9
17	-	46,0
18	2,86 <i>dd</i> (14,0 ; 4,5)	41,3
19	1,66 H-19a <i>m</i> ; 1,18 H-19b <i>m</i>	45,9
20	-	30,1
21	1,32 H-21a <i>m</i> ; 1,20 H-21b <i>m</i>	33,4
22	1,68 H-22a <i>m</i> ; 1,47 H-22b <i>m</i>	32,2
23	3,53 H-23a <i>m</i> ; 3,37 H-23b <i>m</i>	63,2
24	0,68 <i>s</i>	12,1
25	0,96 <i>s</i>	14,8
26	0,81 <i>s</i>	16,3
27	1,16 <i>s</i>	24,8
28	-	178,0
29	0,85 <i>s</i>	32,0
30	0,93 <i>s</i>	22,5
α-L-arabinose		
1'	4,51 <i>d</i> (6,0)	103,3
2'	3,70 <i>d</i> (4,3)	74,6
3'	3,68 <i>dl</i> (3,4)	72,6
4'	3,76 <i>m</i>	68,1
5'	3,85 H-5'a <i>m</i> ; 3,50 H-5'b <i>dd</i> (9,4 ; 3,3)	63,9
α-L-rhamnose		
1''	5,23 <i>d</i> (1,6)	99,8
2''	4,1 <i>dd</i> (3,1 ; 1,8)	70,0
3''	3,83 <i>m</i>	80,6

4''	3,53 <i>t</i> (9,2)	71,2
5''	3,95 <i>m</i>	68,3
6''	1,22 <i>d</i> (6,2)	16,4
β-D-xylose		
1'''	4,48 <i>d</i> (7,2)	104,9
2'''	3,28 <i>m</i>	73,7
3'''	3,31 <i>m</i>	76,0
4'''	3,48 <i>m</i>	69,5
5'''	3,89 H-5'''a <i>dd</i> (10,3 ; 5,8) ; 3,21 H-5'''b <i>dd</i> (11,4 ; 10,3)	65,4

1-2- Identification structurale du composé 2



Le composé **2** est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Sa CCM indique une tache invisible sous la lampe UV à 254 nm, se colorant en violet après pulvérisation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 1067 [M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 1044 uma et une formule brute en $C_{52}H_{84}O_{21}$.

Le Spectre RMN 1H (**Figure 82**) du composé **2** est presque similaire à celui du composé **1** déjà identifié, au niveau des cycles A, B, C, D et E de la génine triterpénique, par

la présence de six groupements méthyles à δ_H 0,69 (3H, *s*, H₃-24), 0,97 (3H, *s*, H₃-25), 0,82 (3H, *s*, H₃-26), 1,17 (3H, *s*, H₃-27), 0,89 (3H, *s*, H₃-29) et 0,94 (3H, *s*, H₃-30), le proton hydroxyméthine H-3 à δ_H 3,60 (1H, *dd*, $J = 11,5 ; 3,6$ Hz), le proton éthylénique H-12 à δ_H 5,21 (1H, *sl*) et le proton méthine H-18 à δ_H 2,85 (1H, *dl*, $J = 9,4$ Hz).

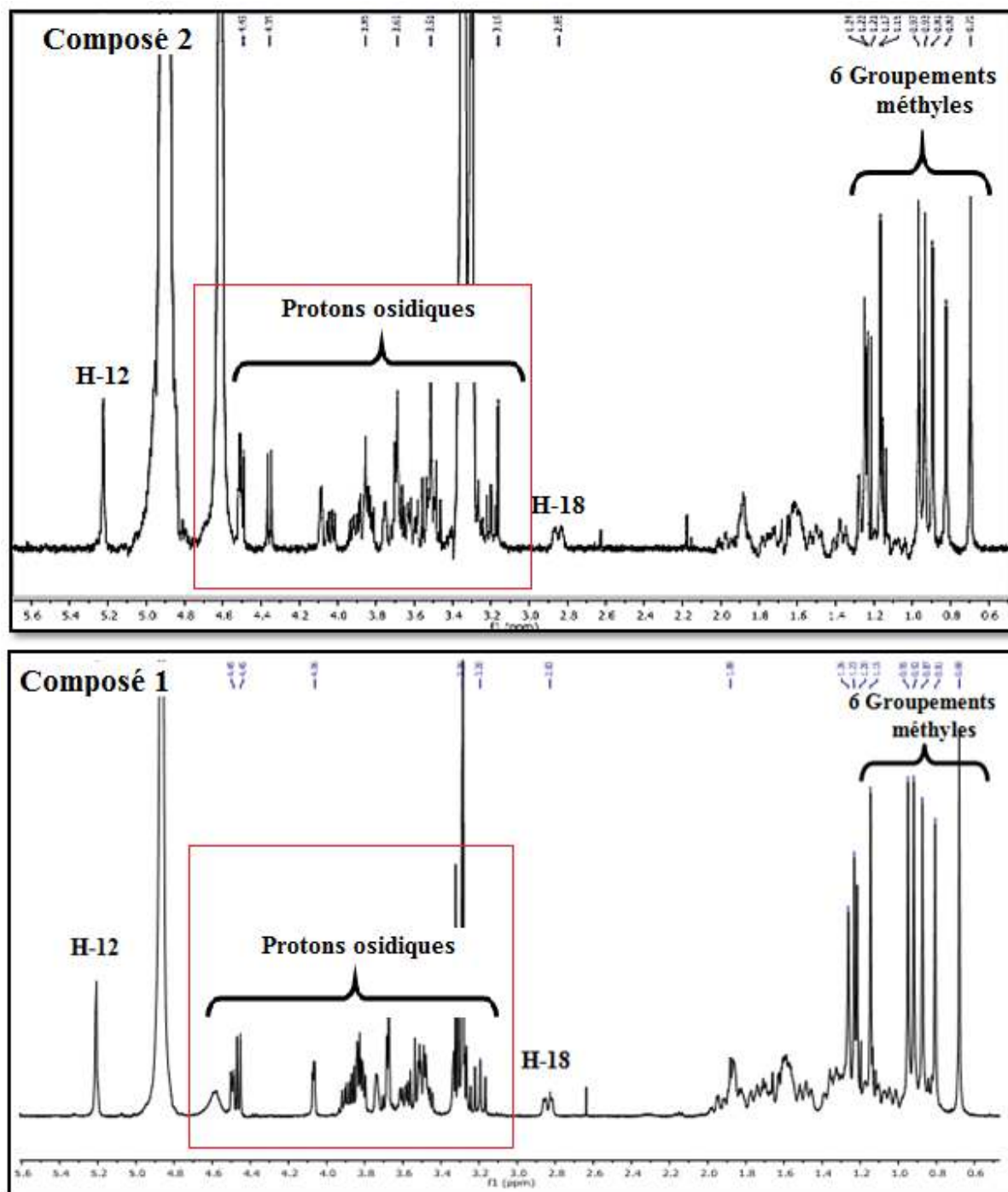


Figure 82 : Spectres RMN ¹H des composés 1 et 2 dans le (CD₃OD)

Les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B, C, D et E du composé 2 sont déterminés par l'analyse combinée des spectres RMN ¹H et ¹³C *J*-modulé,

HSQC et HMBC. La figure ci-dessous (**Figure 83**) résume les principales corrélations observées sur le spectre HMBC de la génine triterpénique de ce composé.

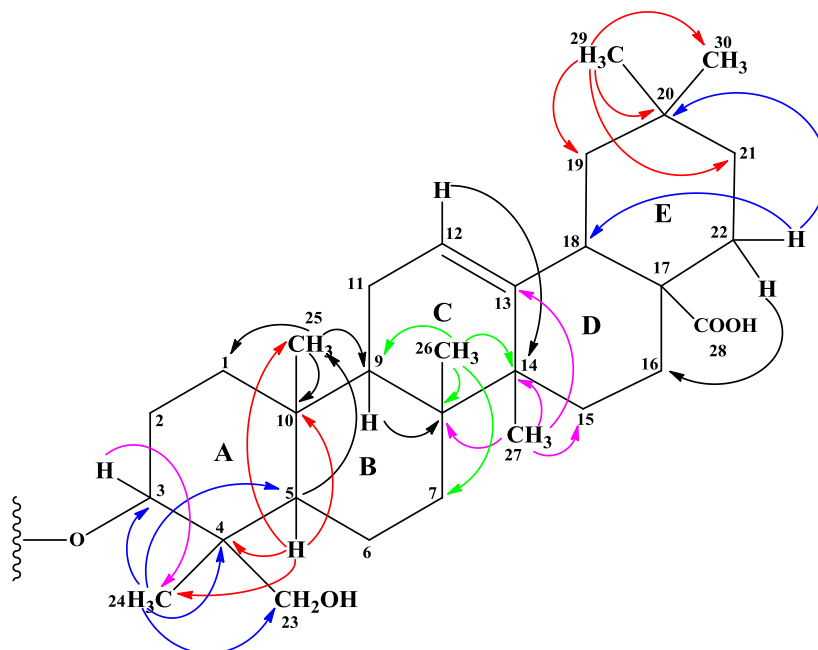


Figure 83 : Corrélations HMBC de la génine triterpénique

La partie osidique du composé **2** s'avère presque identique à celle du composé **1** comme l'indique l'analyse des spectres COSY, HSQC, TOCSY et ^{13}C J -modulé. En effet, l'analyse des spectres RMN ^1H et HSQC montre clairement la présence de quatre unités osidiques, dont trois sont commun avec le composé précédent (**Figures 84 et 85**) :

- ✓ Arabinose, H-1' (δ_{H} 4,52)/ C-1' (δ_{C} 103,3)
- ✓ α -L-rhamnose, H-1'' (δ_{H} 5,22)/ C-1'' (δ_{C} 100,1)
- ✓ β -D-xylose, H-1''' (δ_{H} 4,51)/ C-1''' (δ_{C} 105,1)

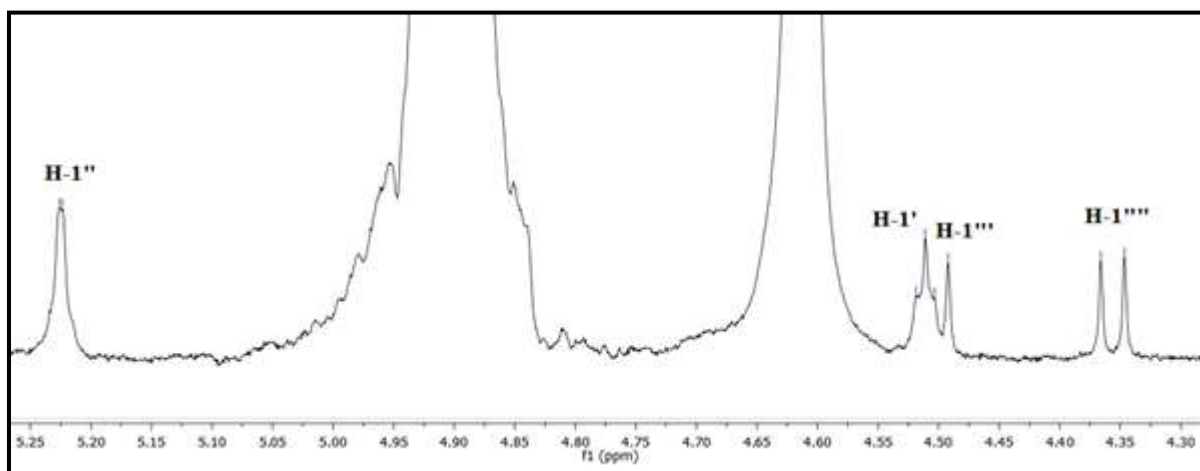


Figure 84 : Partie du spectre RMN ^1H du composé **2** présente les quatre protons anomères

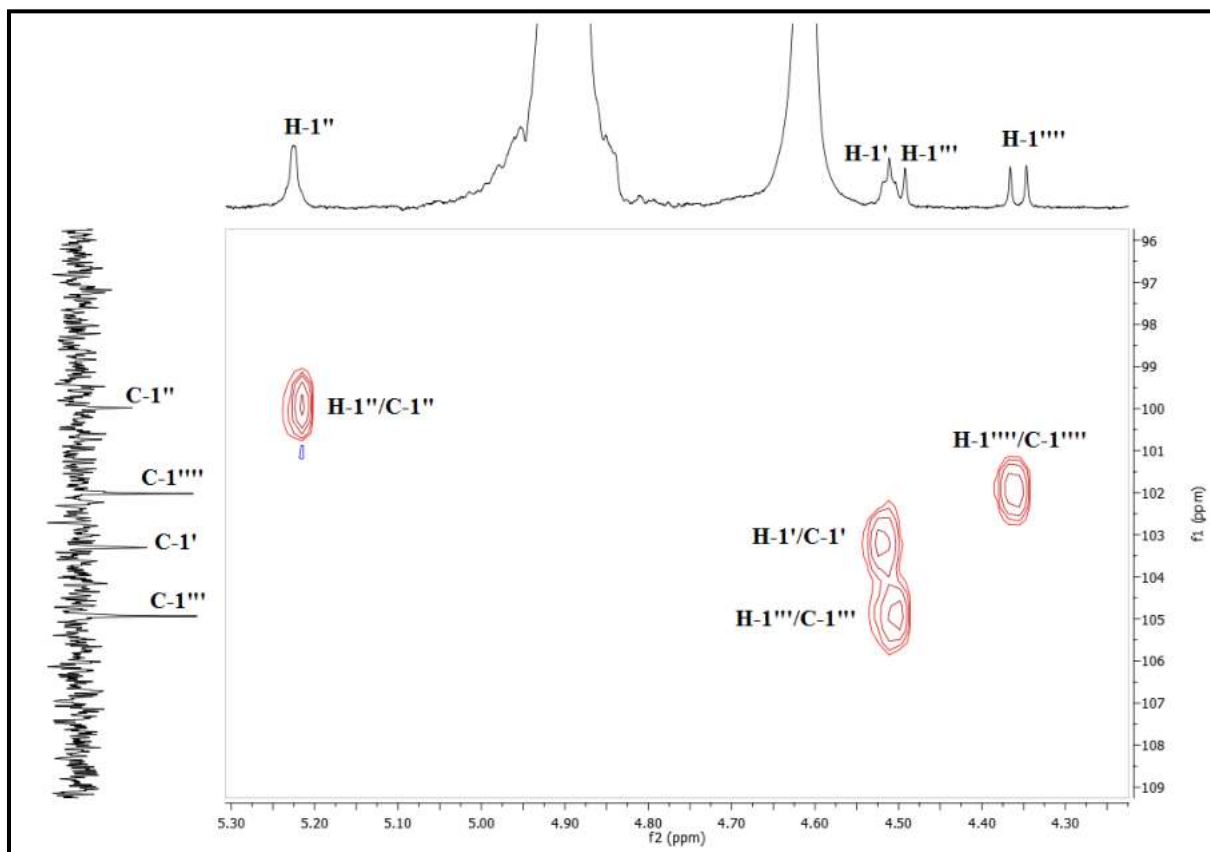


Figure 85 : Partie du spectre HSQC J -modulé du composé **2**

L'analyse des spectres COSY et TOCSY (**Figures 86 et 87**) de ce composé ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (**Panov *et al.*, 2006**), nous permettent d'identifier la nature glucosidique du quatrième sucre. En effet, le proton anomère H-1'''' résonne à δ_H 4,37 (*d*, $J = 7,8$ Hz) montre sur le spectre COSY H-H un système de spins à sept protons incluant les protons H-2'''' [δ_H 3,20 (*dd*, $J = 9,1 ; 8,0$ Hz)]/ H-3'''' [δ_H 3,34 (*m*)]/H-4'''' [δ_H 3,28 (*m*)]/ H-5'''' [δ_H 3,32 (*m*)]/ H-6''''a [δ_H 3,87 (*m*)]/ H-6''''b [δ_H 3,65 (*dd*, $J = 12,0 ; 6,0$ Hz)].

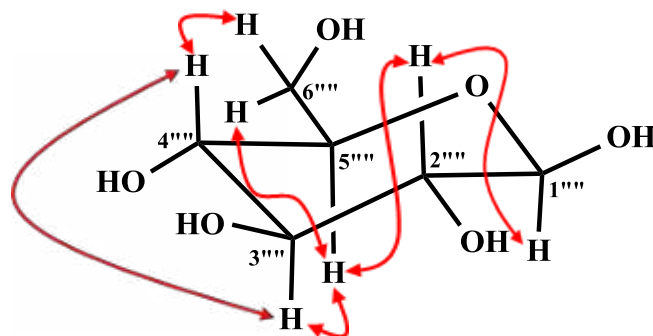


Figure 86 : Corrélations COSY H-H du quatrième sucre (β -D-glucose)

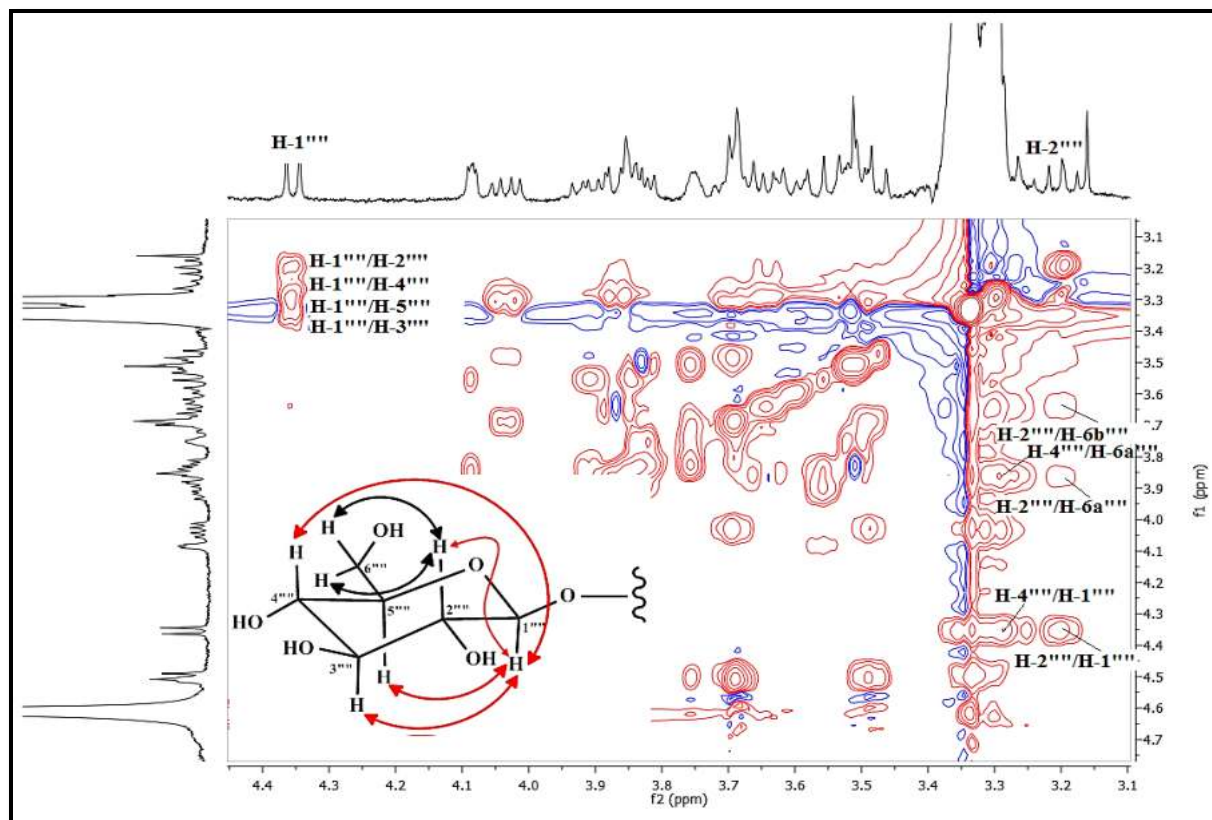


Figure 87 : Partie du spectre TOCSY du composé **2**

Les points de branchements des unités osidiques et la génine triterpénique sont déterminés par les corrélations HMBC entre (**Figure 88**) :

- Le proton H-3 de la génine triterpénique et le carbone anomère C-1' de l' α -L-arabinose
- Le proton H-2' de l' α -L-arabinose et le carbone anomère C-1'' de l' α -L-rhamnose
- Le proton H-3'' de l' α -L-rhamnose et le carbone anomère C-1''' de β -D-xylose
- Le proton H-4''' de β -D-xylose et le carbone anomère C-1'''' du β -D-glucose

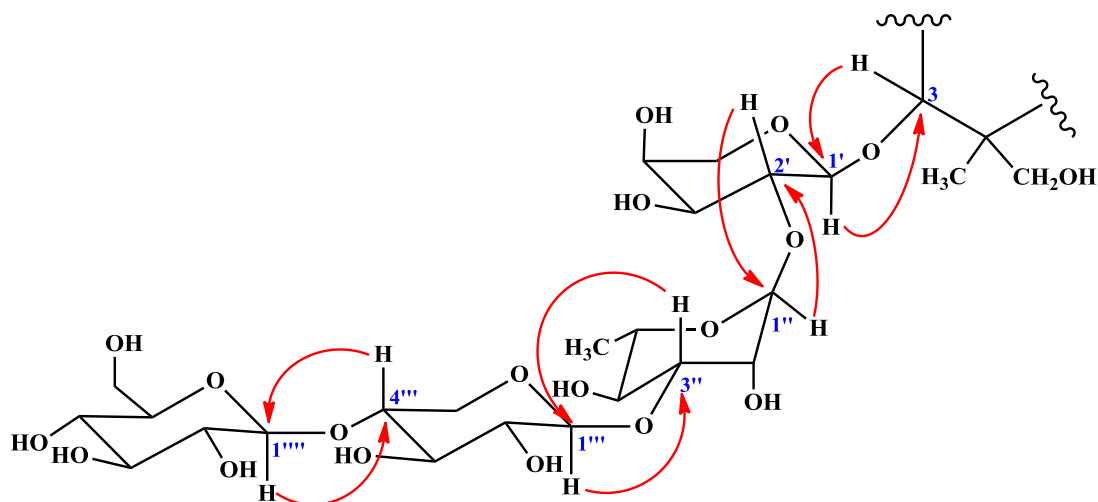


Figure 88 : Corrélations HMBC du composé **2** montrant le branchement des unités osidiques à la génine triterpénique

Toutes ces données spectrales et la comparaison avec les données de la littérature (**Panov *et al.*, 2006**), permettent de proposer sans ambiguïté pour ce composé la structure: Hederagenine 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1''' \rightarrow 4''')- β -D-xylopyranosyl-(1'' \rightarrow 3'')-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' \rightarrow 2'')-*O*- α -L-arabinopyranosyl]. Ce composé est isolé précédemment de l'espèce *Kalopanax septemlobum* (**Panov *et al.*, 2006**). Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones du composé **2** sont regroupées dans le tableau suivant (**Tableau 26**).

Tableau 26 - Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **2** dans le méthanol deutéré.

Position	δ_{H} <i>m J Hz</i>	δ_{C}
1	1,65 H-1a <i>m</i> ; 1,0 H-1b <i>m</i>	38,1
2	1,88 H-2a <i>m</i> ; 1,79 H-2b <i>m</i>	25,3
3	3,60 H-3 <i>dd</i> (11,5 ; 3,6)	81,1
4	-	42,6
5	1,26 <i>m</i>	46,7
6	1,29 H-6a <i>m</i> ; 1,20 H-6b <i>m</i>	16,8
7	1,60 H-7a <i>m</i> ; 1,39 H-7b <i>m</i>	32,0
8	-	39,1
9	1,59 <i>m</i>	47,6
10	-	36,5
11	1,89 H-11a <i>m</i> ; 1,58 H-11b <i>m</i>	22,4
12	5,22 <i>d</i> ; 1,4	122,1
13	-	144,4
14	-	41,6
15	1,77 H-15a <i>m</i> ; 1,05 H-15b <i>m</i>	27,5
16	1,89 <i>m</i>	23,0
17	-	47,1
18	2,85 <i>dl</i> (9,4)	41,5
19	1,64 H-19a <i>m</i> ; 1,12 H-19b <i>m</i>	46,1
20	-	30,2
21	1,32 H-21a <i>m</i> ; 0,93 H-21b <i>m</i>	33,4
22	1,71 H-22a <i>m</i> ; 1,36 H-22b <i>m</i>	32,5
23	3,53 H-23a <i>m</i> ; 3,33 H-23b <i>m</i>	63,2

24	0,69 <i>s</i>	12,4
25	0,97 <i>s</i>	14,8
26	0,82 <i>s</i>	16,7
27	1,17 <i>s</i>	25,1
28	-	174,8
29	0,89 <i>s</i>	32,4
30	0,94 <i>s</i>	22,4
α-L-arabinose		
1'	4,51 <i>d</i> (6,1)	103,3
2'	3,69 <i>d</i> (4,8)	74,9
3'	3,70 <i>d</i> (4,2)	72,7
4'	3,77 <i>m</i>	68,3
5'	3,85 H-5'a <i>m</i> ; 3,53 H-5'b <i>d</i> (9,4)	63,9
α-L-rhamnose		
1''	5,22 <i>d</i> (0,9)	100,1
2''	4,09 <i>dd</i> (3,1 ; 1,6)	70,4
3''	3,86 <i>dd</i> (9,9 ; 2,5)	80,7
4''	3,57 <i>m</i>	71,4
5''	3,92 <i>m</i>	68,6
6''	1,24 <i>d</i> (6,1)	16,8
β-D-xylose		
1'''	4,50 <i>d</i> (7,5)	105,1
2'''	3,36 <i>m</i>	74,0
3'''	3,48 <i>t</i> (6,5)	76,0
4'''	3,70 <i>m</i>	77,1
5'''	4,04 H-5'''a <i>dd</i> (11,6 ; 5,2) ; 3,33 H-5'''b <i>m</i>	63,4
β-D-glucose		
1''''	4,37 <i>d</i> (7,8)	102,1
2''''	3,20 <i>dd</i> (9,1 ; 8,0)	73,4
3''''	3,34 <i>m</i>	76,2
4''''	3,28 <i>m</i>	70,1
5''''	3,32 <i>m</i>	76,8
6''''	3,87 H-6''''a <i>m</i> ; 3,65 H-6''''b <i>dd</i> (12,0 ; 6,0)	61,2



Conclusion générale
Et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore locale d'intérêt thérapeutique, par l'évaluation des activités biologiques *in vivo* et *in vitro* et l'étude de la composition chimique de la plante *Scabiosa stellata* L. appartenant à la famille des Dipsacaceae. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle contre les fissures au talon et pour le traitement de nombreuses maladies respiratoires.

Le criblage phytochimique des extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) obtenus à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* L. révèle la présence de diverses classes de métabolites secondaires à savoir : les stéroïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, polyphénols et les quinones connus pour leurs activités biologiques.

Dans cette étude, des teneurs modérées en polyphénols et en flavonoïdes et de très faibles concentrations en tanins condensés ont été estimées par des méthodes colorimétriques.

Tous les extraits bruts présentent des activités antioxydantes intéressantes dans les différents systèmes utilisés : piégeage des radicaux DPPH et ABTS, le pouvoir réducteur, le test CUPRAC, l'inhibition du blanchiment β -carotène, la capacité antioxydante totale par dosage du phosphomolybdate, les tests de la chélation des ions métalliques et du fer ferreux. L'extrait AcOEt a montré une activité antioxydante très remarquable par rapport aux autres extraits, ce pouvoir antioxydant pourrait expliquer la capacité de cet extrait à inhiber l'activité de la cholinestérase et maintenir la structure des protéines.

Ceci nous permet de suggérer que les extraits de *S. stellata* pourraient être utilisés comme une bonne source d'antioxydants naturels, utiles pour prévenir ou ralentir la progression de diverses maladies liées au stress oxydant, qui pourraient avoir des applications pharmaceutiques ou diététiques.

Tous les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont montré une activité antibactérienne contre la plupart des souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 9 à 20 mm. L'extrait acétate d'éthyle est le plus efficace contre trois souches à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus* sp et *Streptococcus D*) et trois souches à Gram-négatif (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis*). La plus grande zone d'inhibition (20 mm) a été observée contre la souche clinique *Proteus mirabilis* qui est considérée comme une cause fréquente d'infections nosocomiales et urinaires et l'une des souches les plus résistantes aux antibiotiques.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* indiquent que tous les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) empêchent la dénaturation du sérum albumine bovine d'une manière dose-dépendante. Ils sont donc capables d'empêcher l'altération des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines et peuvent contrôler la production d'auto-antigène provenant de la dénaturation des protéines constituant ainsi des agents anti-arthritiques et anti-inflammatoires efficaces.

L'administration orale de l'extrait AcOEt ne provoque pas des symptômes d'intoxication chez tous les animaux traités à différentes concentrations (500, 1000 et 2000 mg/kg). Aucun changement significatif des paramètres biochimiques et hématologiques par rapport au groupe témoin n'a été observé. Ainsi, la dose létale aiguë approximative 50 de cet extrait était supérieure à 2000 mg/kg.

De plus, l'administration de l'extrait acétate d'éthyle à des doses de 50 et 75 mg/kg inhibe le développement aigu de l'œdème de la patte et présente une activité anti-inflammatoire supérieure à celle du diclofénac en tant que contrôle positif. De ce fait, l'extrait acétate d'éthyle de *Scabiosa stellata* pourrait être utilisé sans danger en thérapeutique dans les formulations pharmaceutiques visant la recherche de nouveaux agents antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires.

Un effet cytotoxique significatif a été observé pour l'extrait *n*-butanolique avec $57,2 \pm 0,2$ % de mortalité à 80 µg/ml. Ainsi, cet extrait induit une hémolyse d'une manière dose-dépendante avec une valeur de CE₅₀ de $37,3 \pm 0,5$ µg/ml.

L'administration orale de l'extrait *n*-butanolique à différentes concentrations (500, 1000 et 2000 mg/kg) entraîne des symptômes toxiques et la mortalité de tous les animaux traités à la dose de 2000 mg/kg, une augmentation significative des paramètres biochimiques, notamment (ALT, AST, cholestérol, triglycérides créatinine et urémie) et une altération significative des paramètres hématologiques par rapport au groupe témoin ont été observés dans les deux groupes survivants (500 et 1000 mg/kg). L'examen histologique du foie, des reins et des poumons a confirmé les signes toxiques observés. Par conséquent, on a estimé que la dose létale aiguë approximative 50 de cet extrait était supérieure à 500 mg/kg.

Ainsi, l'administration de l'extrait *n*-butanolique aux doses de 50 et 75 mg/kg inhibe la formation de l'œdème aigu de la patte par rapport au diclofénac en tant que contrôle positif. De plus, l'administration orale de l'extrait *n*-butanolique à 75 mg/k diminue d'une manière

significative la température corporelle pendant toutes les phases du test par rapport au médicament standard (Paracétamol) administré à 50 mg/kg. Mais la présence des composés chimiques à effet hémolytique sur les érythrocytes humains à savoir les saponines et les irridoides pouvant avoir des effets néfastes sur la santé en provoquant une anémie hémolytique implique une prudence dans l'utilisation de l'espèce *S. stellata*.

L'investigation phytochimique réalisée sur l'extrait *n*-butanolique de l'espèce *Scabiosastellata* L. a conduit à l'isolement et l'élucidation structurale de deux saponines triterpéniques nommés: Hederagenine 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1" \rightarrow 3")-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1" \rightarrow 2')-*O*- α -L-arabinopyranosyl] (**1**) et Hederagenine 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1" \rightarrow 4")- β -D-xylopyranosyl-(1" \rightarrow 3")-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1" \rightarrow 2')-*O*- α -L-arabinopyranosyl] (**2**).

Le fractionnement, la séparation et la purification des biomolécules obtenus **1** et **2** est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des différentes méthodes chromatographiques à savoir : VLC, CC, CCE, CCM, en utilisant divers supports (gel de silice normale SiO₂ et silice greffée RP-18).

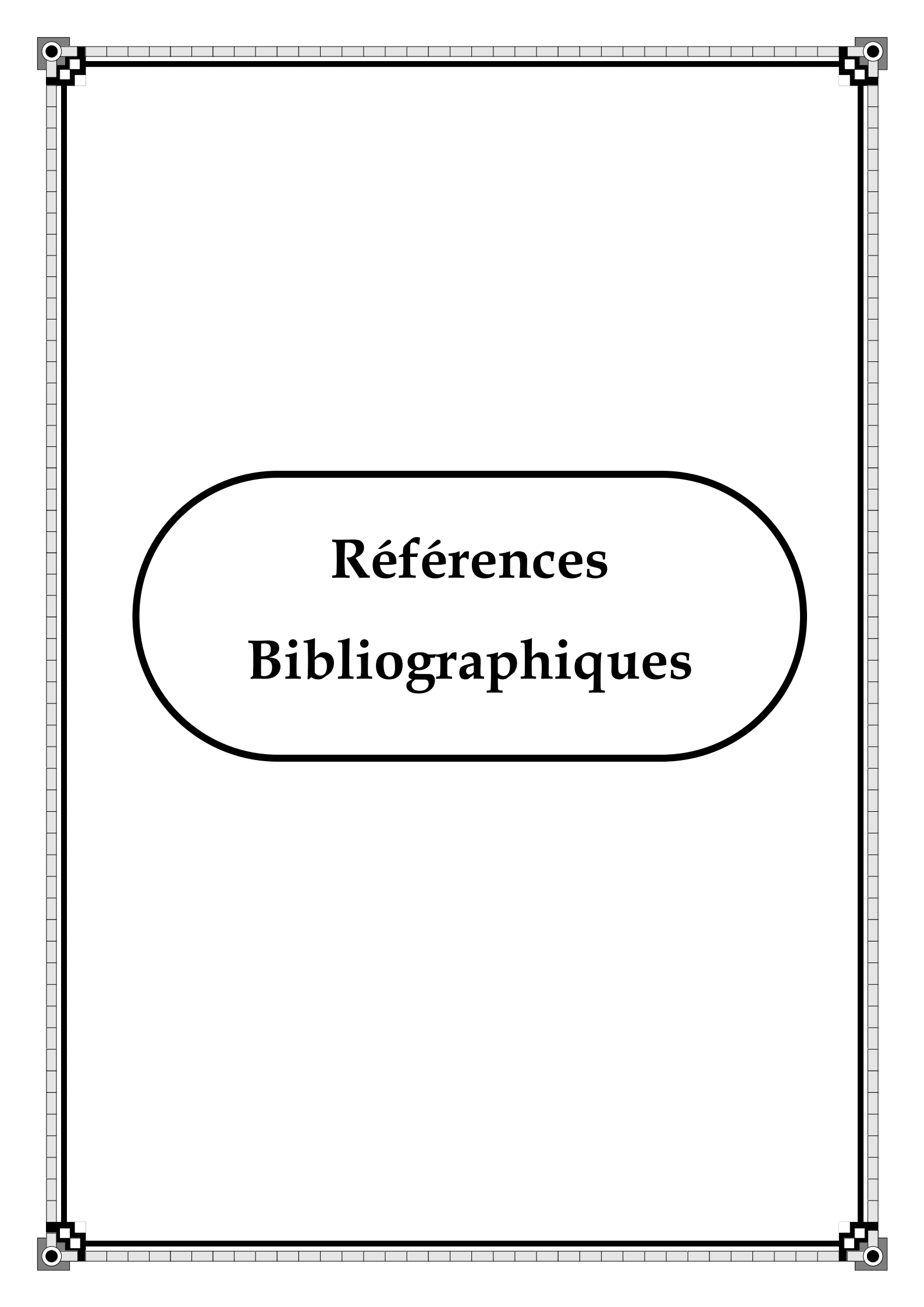
La détermination structurale des composés isolés **1** et **2** a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques telles que la RMN 1D (¹H et ¹³C *J*-modulé) et RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, TOCSY, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse ESI-MS et par la comparaison avec les données de la littérature.

Il est important de mentionner que la présence de ces composés pourrait expliquer les signes de toxicité, l'effet hémolytique et la cytotoxicité de l'extrait *n*-BuOH.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude, constitue une première étape dans la recherche des substances biologiquement active de source naturelle, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- Une étude plus approfondie sur la toxicité de la plante étudiée (sub-chronique, chronique, effet mutagène, reprotoxicité, etc.).
- Des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.
- D'autres études *in vivo* visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et le dosage des enzymes antioxydantes plasmatiques.

- L'étude des mécanismes d'action et des facteurs influençant l'efficacité des extraits obtenus de la plante.
- L'élargissement du spectre des propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo* telles que l'activité antitumorale, antivirale, insecticide et allélopathique, analgésique, cicatrisante, antidiabétique et antiulcéreuse.
- L'étude phytochimique des autres extraits de la plante et particulièrement l'extrait acétate d'éthyle.
- Détermination de la bioactivité des produits isolés à l'état pur.
- Elucidation des interactions possibles entre les composés isolés et les autres classes de métabolites secondaires.



Références
Bibliographiques

A

African Plant Database : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=en&id=142662>

Aggarwal N.R., King L.S., D'Alessio F.R. (2014). Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 306(8), 709-725.

Aldakheel F. M., Thomas P.S., Bourke J.E., Matheson M.C., Dharmage S.C., Lowe A.J. (2016). Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: a systematic review. *Allergy*. 71(6), 741-757.

Aldeyab M.A., Harbarth S., Vernaz N., Kearney M.P., Scott M.G., Funston C., McElnay J.C. (2009). Quasiexperimental study of the effects of antibiotic use, gastric acid-suppressive agents, and infection control practices on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(5), 2082-2088.

Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W.F.P.C., Fu P.C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*. 20(4), 470-475.

Al-Qudah M.A., Ootom N.K., Al-Jaber H.I., Saleh A.M., Abu Zarga M.H., Afifi F.U., Abu Orabi S.T. (2017). New flavonol glycoside from *Scabiosa prolifera* L. aerial parts with *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities. *Natural product research*. 31(24), 2865-2874.

Alrawaiq, N.S., Abdullah, A. (2014). A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. *International Journal of PharmTech Research*. 6(3), 933-941.

Amezouar F., Badri W., Hsaine M., Bourhim N., Fougrach H. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathologie-biologie*. 61(6), 254-258.

Anu G., Usha P.T.A. (2017). Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant study of chloroform soluble fraction of *Thespesia populnea* bark extract. *Journal of Livestock Science*. 8, 77-80.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(26), 7970-7981.

Asem A. (2008). Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research*. 9, 113-114.

Ashley T.N., Weil Z.M., Nelson R.J. (2012). Inflammation : mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 43, 385-406.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Asselineau J., Zalta J.P., Boissier J.R. (1973). Les antibiotiques: structure et exemples de mode d'action (No. 1353). Hermann.

Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 72(6), 435-457.

Awasthi Y.C., Sharma R., Cheng J.Z., Yang Y., Sharma A., Singhal S.S., Awasthi S. (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Molecular aspects of medicine*. 24(4-5), 219-230.

Azadmanesh J., Borgstahl G.E. (2018). A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants*. 7(2), 25.

Azwanida N.N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal Aromatic Plants*. 4(196), 2167-0412.

B

Backlund A., Bremer B. (1997). Phylogeny of the Asteridae s. str. Based on rbcL sequences, with particular reference to the Dipsacales. *Plant Systematics and Evolution*. 207, 225-254.

Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2), 71-79.

Bammi J., Douira A. (2002). Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach. *Acta Botanica Malacitana*. 27: 131-145.

Barba F.J., Zhu Z., Koubaa M., Sant'Ana A.S., Orlie V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products : a review. *Trends in Food Science & Technology*. 49, 96-109.

Barrouin-Melo S.M., Terán Y.A.M., Anturaniemi J., Hielm-Björkman A.K. (2018). Interaction Between Nutrition and Metabolism. In *Metabolic Interaction in Infection*. Egídio (Eds). Springer, Cham. pp. 29-114.

Barzilai A., Yamamoto K.I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*. 3(8), 1109-1115.

Baykal T., Panayir T., Sticher O., Calis I. (1997). Scabioside A: a new triterpenoid saponoside from *Scabiosa Rotata*. *Eczacilik Fakultesi Dergisi-Gazi Universitesi*. 14, 31-36.

Baykal T., Panayir T., Tasdemir D., Sticher O., Çalis I., (1998). Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry*. 48, 867-873.

Baykal, T., (1999). Two monodesmosidic triterpenoid saponins from *Scabiosa rotata* Bieb. *Eczacilik Fakultesi Dergisi-Gazi Universitesi*. 16, 1-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bbosa G.S., Mwebaza N., Odda J., Kyegombe D.B., Ntale M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*. 6(5), 410.

Begum S., Saxena B., Goyal M., Ranjan R., Joshi V.B., Rao C.V., Sahai M. (2010). Study of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of seeds of *Hyoscyamus niger* and isolation of a new coumarinolignan. *Fitoterapia*. 81(3), 178-184.

Benli M., Bingol U., Geven F., Guney K., Yigit N. (2008). An Investigation on the antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 6 (15),1774-1778.

Besbes M., Omri A., Cheraif I., Daami M., Jannet H.B., Mastouri M., Selmi B. (2012). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Scabiosa arenaria* Forssk. Growing Wild in Tunisia. *Chemistry & biodiversity*. 9(4), 829-839.

Bewaji C.O., Salami, A.K., Bababunmi, E.A. (2013). Effective combination therapies for preventing and treating highly prevalent human diseases: cancers, heart-failure, tuberculosis and malaria. *International Journal of Biomedical and Healthcare Science*. 9(3).

Birben E, Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organisation Journal*, 5(1), 9.

Bivona J.J., Patel S., Vajdy M. (2017). Induction of cellular and molecular Immunomodulatory pathways by vitamin E and vitamin C. *Expert opinion on biological therapy*. 17(12), 1539-1551.

Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Pidcock L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13(1), 42.

Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A., Jackson-Lewis V.R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*. 9(91), 1-9.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617), 1199-1200.

Bonet M.À., Parada M., Selga A., Valles J. (1999). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*. 68, 145-168.

Bonet M.À., Valles J. (2007). Ethnobotany of montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 110(1), 130-147.

Bonnard I., Rinehart K.L. (2004). Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*. *Tetrahedron*. 60(13), 2987-2992.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Boudy P.L.J. (1950). Économie forestière Nord-Africaine: Monographies et traitements des essences forestières. Éditions Larose.

Bougandoura N., Bendimerad N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*. (9), 14-19.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I., Couladis M. (2008). Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl sl and *A. pannonica* Scheele essential oils. *Molecules*. 13(9), 2058-2068.

Braidy N., Poljak A., Jayasena T., Sachdev P. (2017). Natural Plant-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: Relevance for Alzheimer's Disease. *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes*. 297-318.

Bruniera F.R., Ferreira F.M., Saviolli L.R., Bacci M.R., Feder D., da Luz Goncalves Pedreira M., Fonseca F.L. (2015). The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19(4), 694-700.

Buckley C.D., Gilroy D.W., Serhan C.N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 40(3), 315-327.

Bucolo G., David H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry*. 19(5), 476-482.

Burke J.P., Ingall D., Klein J.O., Gezon H.M., Finland M. (1971). *Proteus mirabilis* infections in a hospital nursery traced to a human carrier. *New England Journal of Medicine*. 284(3), 115-121.

Bussmann R.W., Glenn A., Meyer K., Kuhlman A., Townesmith A. (2010). Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 6(1), 10.

C

Can U., Yerlikaya F.H., Yosunkaya S. (2015). Role of oxidative stress and serum lipid levels in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of the Chinese Medical Association*. 78(12), 702-708.

Cannon C.P., Cannon P.J. (2012). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Science*. 336(6087), 1386-1387.

Caputo P., Cozzolino S. (1994). A cladistic analysis of Dipsacaceae (Dipsacales). *Plant systematics and evolution*. 189, 41-61.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Carballo J.L., Hernández-Inda Z.L., Pérez P., García-Grávalos M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology*. 2(1), 17.

Carlson S.E., Linder H.P., Donoghue, M.J. (2012). The historical biogeography of *Scabiosa* (Dipsacaceae): implications for old world plant disjunctions. *Journal of biogeography*. 39(6), 1086-1100.

Carocho M., Ferreira I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 51, 15-25.

Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie biologique*. 52(10), 607-616.

Cheeke P.R., Piacente S., Oleszek W. (2006). Anti-inflammatory and anti-arthritis effects of *Yucca schidigera*: a review. *Journal of inflammation*. 3(1), 6.

Cheesbrough M. (1991). Detection of bence jones protein in urine. *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. 2nd Edn., ELBS with Tropical Health Technology/Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, ISBN: 0, 7506(15206), 473-474.*

Chen C., Wang L., Wang R., Luo X., Li Y., Li J., Chen Z. (2018). Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food chemistry*. 239, 260-267

Chen Y., Miao Y., Huang L., Li J., Sun H., Zhao Y., Zhou W. (2014). Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an *in vivo* and *in vitro* evaluation. *BMC complementary and alternative medicine*. 14(1), 86.

Cheng L., Xia T.S., Wang Y.F., Zhou W., Liang X. Q., Xue J.Q., Ding Q. (2014). The apoptotic effect of D Rhamnose β -hederin, a novel oleanane-type triterpenoid saponin on breast cancer cells. *PLoSOne*. 9(3), e90848.

Chinese Pharmacopoeia Committee. (1998). Drug standards of Ministry of public health of China (Mongolian medicine Fascicule). *Chemical Industry Press, Beijing*. 67, 114-117.

Chisté R.C., Freitas M., Mercadante A.Z., Fernandes E. (2014). Carotenoids are effective inhibitors of *in vitro* hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized cellular antioxidant assay. *Journal of food science*. 79(9).

Christopoulou C., Graikou K., Chinou I., (2008). Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae). *Chemistry & Biodiversity*. 2, 318-323.

Ciobanu C.S., Iconaru S.L., Le Coustumer P., Constantin L.V., Predoi D. (2012). Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Research Letters*. 7(1), 324.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Clarkson C., Maharaj V.J., Crouch N.R., Grace O.M., Pillay P., Matsabisa M. G., Folb P.I. (2004). *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of ethnopharmacology*. 92(2-3), 177-191.

Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*. 11(3), 315-335.

Corne C. (2010). Etude des interactions entre protéines et lésions de l'ADN par résonance plasmonique de surface par imagerie (SPRI) (Thèse de Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).

Csányi, G., Miller, J. F. J. (2014). Oxidative stress in cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(4), 6002-6008.

D

D'Ascenzio M., Chimenti P., Gidaro M.C., De-Monte C., De-Vita D., Granese A., Scipione L., Costa G., Alcaro S., Yáñez M., Carradori S. (2015). (Thiazol-2-yl) hydrazone derivatives from acetylpyridines as dual inhibitors of MAO and AChE : synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 30(6), 908-919.

Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*. 23(2), 174-181.

Davies M.J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*. 473(7), 805-825.

Davoine F., Lacy P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity*. 5(570), 1-17.

Day R.O., Graham G.G. (2016). Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Overview. *Compendium of Inflammatory Diseases*. 986-993.

De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley M. (2017). Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 23(2), 48-61.

De S., Dey Y.N., Ghosh A.K. (2010). Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeoniifolius* (Araceae). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 1(5), 150-157.

Decker E.A., Welch B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 38(3), 674-677.

Del Carmen Recio M., Giner R.M., Manez S., Ríos J.L. (1994). Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica*. 60(03), 232-234.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Di Rosa M., Giroud J. P., Willoughby D. A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of pathology*. 104(1), 15-29.

Dianzani M.U. (2003). 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Molecular aspects of medicine*. 24(4-5), 263-272.

Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C., Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation : molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*. 135, 182-199.

Duecker R., Baer P., Eickmeier O., Strecker M., Kurz J., Schaible A., Schubert R. (2018). Oxidative stress-driven pulmonary inflammation and fibrosis in a mouse model of human ataxia-telangiectasia. *Redox biology*. 14, 645-655.

E

Elekofehinti O.O., Kamdem J.P., Meinerz D.F., Kade I.J., Adanlawo I.G., Rocha J.B.T. (2015). Saponin from the fruit of *Solanum anguivi* protects against oxidative damage mediated by Fe²⁺ and sodium nitroprusside in rat brain synaptosome P2 fraction. *Archives of pharmacal research*. 1-7.

Elhawary S.S., Eltantawy M.E., Sleem A.A., Abdallah H.M., Mohamed, N.M. (2011). Investigation of phenolic content and biological activities of *Scabiosa atropurpurea* L. *World Applied Sciences Journal*. 15(3), 311-317

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr V., Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2), 88-95.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*. 11(1), 81-128.

F

Farnsworth N.R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of pharmaceutical sciences*. 55(3), 225-276.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.

Fay N.S., Larson E.C., Jameson J.M. (2016). Chronic inflammation and $\gamma\delta$ T cells. *Frontiers in immunology*, 7, 210.

Fayaz M., Bhat M.H., Kumar A., Jain A.K. (2017). Comparative studies on different solvents used for the extraction of phytochemicals from the plant parts of *Arnebia*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

benthamii. (Wall Ex. G. Don) Johnston. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 9(1), 220-224.

Firdouse S., Alam P. (2011). Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytomedicine*. 3(1), 32-35.

Fitzpatrick A.M., Teague W.G., Holguin F., Yeh M., Brown L.A.S., Program S.A.R. (2009). Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. *Journal of Allergy et Clinical Immunology*. 123(5), 146-152.

Franceschi C., Campisi J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(1). S4-S9.

Francis G., Makkar H.P., Becker K. (2002). Dietary supplementation with a quillaja saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*. 203, 311-320.

Funaro A., Ortolan E., Bovino P., Lo Buono N., Nacci G., Parrotta R., Ferrero E., Malavasi, F. (2009). Ectoenzymes and innate immunity: the role of human CD157 in leukocyte trafficking. *Frontiers in Bioscience*. 14, 929-943.

Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Shimomura I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 114(12), 1752-1761.

G

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*. 102(3), 898-904.

Garaev E.A., Movsumov I.S., Isaev M.I., (2008). Flavonoids and oleanolic acid from *Scabiosa caucasica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 44, 520-521.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*. 91-96.

Gardiner S.J., Gavranich J.B., Chang A.B. (2015). Antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections secondary to *Mycoplasma pneumoniae* in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010(7), 1-32.

Getzoff E.D., Tainer J.A., Weiner P.K., Kollman P.A., Richardson J.S., Richardson D.C. (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 306, 287-290.

Ghosh A., Banik S., Islam M.A. (2015). *In vitro* thrombolytic, anthelmintic, anti-oxidant and cytotoxic activity with phytochemical screening of methanolic extract of *Xanthium indicum* leaves. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 10(4), 854-859.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Girard M., Bélanger J., ApSimon J.W., Garneau F.X., Harvey C., Brisson J.R. (1990). Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the *holothurian Cucumaria frondosa*. *Canadian journal of chemistry*. 68(1), 11-18.

Girre, L. (1980). *Connaître et reconnaître les plantes médicinales*. Rennes : Ouest-France. 333 p.

Glorieux C., Zamocky M., Sandoval J. M., Verrax J., Calderon, P.B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 87, 84-97.

Godic A., Poljšak B., Adamic M., Dahmane R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014.

Gowda S., Desai P.B., Kulkarni S.S., Hull V.V., Math A.A., Vernekar S.N. (2010). Markers of renal function tests. *North American journal of medical sciences*. 2(4), 170.

Granger M., Eck, P. (2018). Dietary Vitamin C in Human Health. In *Advances in food and nutrition research*. Academic Press. 83, 281-310.

Gülçin I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*. 86(3), 345-391.

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

Gull P., Babgi B.A., Hashmi A.A. (2017). Synthesis of Ni (II), Cu (II) and Co (II) complexes with new macrocyclic Schiff-base ligand containing dihydrazide moiety: Spectroscopic, structural, antimicrobial and antioxidant properties. *Microbial pathogenesis*. 110, 444-449.

H

Hajjaj G., Bahlouli A., Sayah K., Tajani M., Cherrah Y., Zellou A. (2017). Phytochemical screening and in vivo antipyretic activity of the aqueous extracts of three Moroccan medicinal plants. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*. 4(4), 188-192.

Halliwell B., Gutteridge J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*. 219(1), 1.

Halliwell B., Gutteridge J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hara K., Someya T., Sano K., Sagane Y., Watanabe T., Wijesekara R.G.S. (2018). Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data In Brief*. 17, 870-875.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A.E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. In *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 31-49.

Harborne A.J. (1998). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Springer Science & Business Media. 302 p.

Hartupée J., Mann D.L. (2016). Role of inflammatory cells in fibroblast activation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 93, 143-148.

Harwig J., Scott, P.M. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied microbiology*. 21(6), 1011-1016.

Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Vincieri F.F., Romani A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food chemistry*. 99(3), 464-469.

Hershberg R. (2017). Antibiotic-independent adaptive effects of antibiotic resistance mutations. *Trends in Genetics*. 33(8), 521-528.

Hisem D., Hrouzek P., Tomek P., Tomšičková J., Zapomělová E., Skácelová K., Kopecký J. (2011). Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*. 57(1), 76-83.

Hlila M.B., Omri A., Ben Jannet H., Lamari A., Aouni M., Selmi B. (2013). Phenolic composition, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of the Tunisian *Scabiosa arenaria*. *Pharmaceutical biology*. 51(5), 525-532.

Hlila^a M.B., Mosbah H., Majouli K., Msaada K., Jannet H.B., Aouni M., Selmi B. (2015). α -Glucosidase inhibition by Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. extracts. *International journal of biological macromolecules*. 77, 383-389.

Hlila^b M.B., Mosbah H., Msaada K., Jannet H.B., Aouni M., Selmi B. (2015). Acetyl-cholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Industrial Crops and Products*. 67, 62-69.

Hlila^c M.B., Mosbah H., Zanina N., Ben Nejma A., Ben Jannet H., Aouni M., Selmi B. (2016). Characterisation of phenolic antioxidants in *Scabiosa arenaria* flowers by LC-ESI-MS/MS and NMR. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 68(7), 932-940.

Horn M.M., Drewes S.E., Brown N.J., Munro O.Q., Meyer J.M., Mathekga A.D. (2001). Transformation of naturally-occurring 1,9-trans-9, 5-cis sweroside to all trans sweroside during acetylation of sweroside aglycone. *Phytochemistry*. 57(1), 51-56.

Hughes D., Andersson, D.I. (2017). Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. *Annual review of microbiology*. 71, 579-596.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ikuta A. (1991). *Akebia quinata* Decne (Akebi): *In vitro* culture and the formation of secondary metabolites. In Medicinal and Aromatic Plants III. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 107-118.

Itoh Y., Shinya K., Kiso M., Watanabe T., Sakoda Y., Hatta M., Sakabe, S. (2009). *In vitro* and *in vivo* characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 460 (7258), 1021.

Izcue A., Coombes J.L., Powrie F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual review of immunology*. 27, 313-338.

J

Jain N.C. (1986). *Schalm's veterinary hematology* (No. Edition 4). Lea & Febiger.

Jayesh K., Helen L.R., Vysakh A., Binil E., Latha M.S. (2017). *In vivo* toxicity evaluation of aqueous acetone extract of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. fruit. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 86, 349-355.

JI M., LI S.J., MA C.M. (2014). Chemical constituents of the inflorescence of *Scabiosa comosa* Fisch and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition)*. 4, 398-403.

Jomova K., Lawson M., Drostinova L., Lauro P., Poprac P., Brezova V., Valko M. (2017). Protective role of quercetin against copper (II)-induced oxidative stress: A spectroscopic, theoretical and DNA damage study. *Food and Chemical Toxicology*. 110, 340-350.

Jorgensen J.H., Turnidge J.D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. American Society of Microbiology. pp. 1253-1273

Joshi B.S., Singh K.L., Roy, R. (1999). Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of the pentacyclic triterpene hederagenin from *Nigella sativa* Linn. *Magnetic resonance in chemistry*. 37(4), 295-298.

Josuttis M., Verrall S., Stewart D., Krüger E., McDougall G.J. (2013). Genetic and environmental effects on tannin composition in strawberry (*Fragaria xananassa*) cultivars grown in different European locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(4), 790-800.

Junior V.T.G., Caporossi C., Molina, C.A.F. (2015). Glutamine, Total Antioxidant Systems and Damage in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. In *Glutamine in Clinical Nutrition*. Humana Press, New York, NY. pp 445-459.

K

Kabzinski J., Mucha B., Cuchra M., Markiewicz L., Przybyłowska K., Dziki A., Majsterek I. (2016). Efficiency of base excision repair of oxidative DNA damage and its

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

impact on the risk of colorectal cancer in the polish population. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016. 3125989.

Kahouadji M.S. (1995). Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Diplôme d'études supérieures de 3ème cycle. Université Mohamed Ier.

Kalam S., Gul M.Z., Singh R., Ankati S. (2015). Free radicals: Implications in etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals. *Pharmacologia*. 6(1), 11-20.

Kamal-Eldin A., Budilarto E. (2014). Antioxidant activities and interactions of α - and γ -tocopherols within canola and soybean emulsions. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 116(7), 781-782.

Kamal-Eldin A., Budilarto E. (2015). Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. In *Handbook of antioxidants for food preservation*. 141-159.

Kamiloglu S., Toydemir G., Boyacioglu D., Beekwilder J., Hall R.D., Capanoglu E. (2016). A review on the effect of drying on antioxidant potential of fruits and vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*. 56(1), 110-129.

Kar B., Kumar R.S., Karmakar I., Dola N., Bala A., Mazumder U.K., Hadar P.K. (2012). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2), S976-S980.

Karagözler A.A., Erdağ B., Emek Y.Ç., Uygun D.A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*. 111(2), 400-407.

Karthik K., Kumar B.R.P., Priya V.R., Kumar S.K., Rathore R.S.B. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. 1(5), 729.

Kehrer J.P., Klotz L.O., Roberts S.M. (2015). An overview of free radicals as causes and consequences of toxicity. In *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology*. Humana Press, Cham. pp. 21-27.

Kerboub H. (2018). Valorisation de certaines plantes sauvages : *Thymelaea hirsuta* Endl. (Metnane) et *Haloxylon scoparium* Pomel. (Remt). Bio-activité et Caractérisation des Composés Phénoliques.

Kerr S, Brosnan M.J., McIntyre M., Reid J.L., Dominiczak A.F., Hamilton C.A. (1999). Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. *Journal of Hypertens*. 33(5), 1353-1358.

Kessel L., Tendal B., Jørgensen K.J., Erngaard D., Flesner P., Andresen J.L., Hjortdal J. (2014). Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops: a systematic review. *Ophthalmology*. 121(10), 1915-1924.

Kevil C.G. (2017). Catalase as a regulator of reactive sulfur metabolism; a new interpretation beyond hydrogen peroxide. *Redox biology*. 12, 528.

Khatoun M., Islam E., Islam R., Abdur Rahman A., Khurshid Alam A.H.M., Khondkar P., Rashid M., Parvin S. (2013). Estimation of total phenol and in vitro antioxidant activity of Albizia procera leaves. *BMC research notes*. 6(1), 121.

Kibiti C.M., Afolayan A.J. (2016). Antifungal activity and brine shrimp toxicity assessment of *Bulbine abyssinica* used in the folk medicine in the Eastern Cape Province, South Africa. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11(2), 469-477.

Kifatullah M., Mustafa M.S., Sengupta P., Sarker M.M.R., Das A., Das S.K. (2015). Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *Journal of Acute Disease*. 4(4), 309-315.

Kim G.H., Kim J.E., Rhie S.J., Yoon S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*. 24(4), 325-340.

Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*. 96(3), 229-245.

Kourie J.I. (1998). Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 275(1), 1-24.

Kovacic P., Weston W. (2017). Phenolic antioxidants as drugs for Alzheimer's disease: oxidative stress and selectivity. *Novel Approaches in Drug Designing and Development*. 2(5), 555-598.

Kryscio R.J., Abner E.L., Caban-Holt A., Lovell M., Goodman P., Darke A.K., Schmitt F.A. (2017). Association of antioxidant supplement use and dementia in the prevention of Alzheimer's disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA neurology*. 74(5), 567-573.

Kryston T.B., Georgiev A.B., Pissis P., Georgakilas A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 711(1), 193-201.

Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C., Abdelly C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2083-2091.

Kumar G., Karthik L., Rao K.V.B. (2011). Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an *in vitro* study. *Elixir Applied Botany*. 40, 5534-5537.

Kumar S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013.

Kumar, A., Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 67(2), 195-203.

Kupeli E., Orhan I., Yesilada E. (2007). Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine for their anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Pharmaceutical biology*. 45(7), 547-555.

Kuril'chenko V.A., Zemtsova G.N., Bandyukova, V.Y. (1971). A chemical study of *Scabiosa bipinnata*. *Chemistry of Natural Compounds*. 7(4), 519-519.

Kwiecien S., Brzozowski T., Konturek S.J. (2002). Importance of aldehyde products of lipid peroxidation in the formation of gastric lesions induced by aspirin, ischemia-reperfusion and stress. *Gastroenterologia Polska*. 9(4), 273-280.

Kwiecien S., Jasnos K., Magierowski M., Sliwowski Z., Pajdo R., Brzozowski B., Brzozowski T. (2014). Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. *Journal of Physiological and Pharmacology*. 65(5), 613-622.

Kwiecien S., Pawlik M.W., Brzozowski T., Pawlik W.W., Konturek S.J. (2010). Reactive oxygen metabolite action in experimental, stress model of gastric mucosa damage. *Gastroenterol Polska*. 17, 234-243.

L

Lafon M. (2008). Vivre longtemps en bonne santé. Editions Michel Lafont.

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

Lee Y.Y., Park J.S., Lee E.J., Lee S.Y., Kim D.H., Kang J.L., Kim H.S. (2015). Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponin metabolite Rh3 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63(13), 3472-3480

Lehbili^a M., Magid A.A., Hubert J., Kabouche A., Voutquenne-Nazabadioko L., Renault J.H., Kabouche Z. (2018). Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities. *Fitoterapia*. 125, 41-48.

Lehbili^b M., Magid A.A., Kabouche A., Voutquenne-Nazabadioko L., Morjani H., Harakat D., Kabouche Z. (2018). Triterpenoid saponins from *Scabiosa stellata* collected in North-eastern Algeria. *Phytochemistry*. 150, 40-49.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Leinmüller E., Steingass H., Menke K.H. (1991). Tannins in ruminant feedstuffs. *Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through Animal Research*. 33, 9-62.

Letelier M.E., Sánchez-Jofré S., Peredo-Silva L., Cortés-Troncoso J., Aracena-Parks P. (2010). Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chemico-biological interactions*. 188(1), 220-227.

Levey A.S., Coresh J., Greene T., Stevens L.A., Zhang Y.L., Hendriksen S., Van Lente F. (2006). Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 145(4), 247-254.

Li X., Li N., Sui Z., Bi K., Li Z. (2017). An investigation on the quantitative structure-activity relationships of the anti-inflammatory activity of diterpenoid alkaloids. *Molecules*. 22(3), 363.

Liu F., Lai S., Tong H., Lakey P.S., Shiraiwa M., Weller M.G., Kampf C.J. (2017). Release of free amino acids upon oxidation of peptides and proteins by hydroxyl radicals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 409(9), 2411-2420.

Liu Q.L., Chen A.H., Tang J.Y., Ma Y.L., Jiang Z.H., Liu Y.P., Xu W. (2017). A new indole alkaloid with anti-inflammatory activity from *Nauclea officinalis*. *Natural product research*. 31(8), 2107-2112.

Lorrain B., Dangles O., Loonis M., Armand M., Dufour C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(36), 9074-9081.

Lu X., Zhen G., Liu Y., Hojo T., Estrada A.L., Li Y.Y. (2014). Long-term effect of the antibiotic cefalexin on methane production during waste activated sludge anaerobic digestion. *Bioresource technology*. 169, 644-651.

Lushchak V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 224, 164-175.

M

Ma J.N., Bolraa S., Ji M., He Q.Q., Ma C.M. (2016). Quantification and antioxidant and anti-HCV activities of the constituents from the inflorescences of *Scabiosa comosa* and *S. tschilliensis*. *Natural product research*. 30(5), 590-594.

Mahboubi A., Asgarpanah J., Sadaghiyani P.N., Faizi M. (2015). Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC complementary and alternative medicine*. 15(1), 366.

Mahjoub S., Masrou-Roudsari J. (2012). Role of oxidative stress in pathogenesis

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

of metabolic syndrome. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 3(1), 379:386.

Marco G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 45(9), 594-598.

Martin D., Bolling B. (2017). Anti-inflammatory Activity of Aronia Berry Polyphenols in Jurkat T Cells. *The FASEB Journal*. 31(1), 166-4.

Matsuda T., Tao H., Goto M., Yamada H., Suzuki M., Wu Y., Kurabe N. (2012). Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. *Carcinogenesis*. 34(1), 121-127.

Maurer-Jones M.A., Love S.A., Meierhofer S., Marquis B.J., Liu Z., Haynes C.L. (2013). Toxicity of nanoparticles to brine shrimp: An introduction to nanotoxicity and interdisciplinary science. *Journal of Chemical Education*. 90(4), 475-478.

Medini F., Fellah H., Ksouri R., Abdelly C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for science*. 8(3), 216-224.

Mégraud F. (2017). La résistance aux antibiotiques de Helicobacter pylori. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 24(2), 179-181.

Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.J., McLaughlin J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45(05), 31-34.

Michael A.S., Thompson C.G., Abramovitz M. (1956). *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science (New York, NY)*, 123(3194), 464.

Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakira C., (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of *seabuckthorn* (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*. 131(3). 754-760

Mohan, S. M., Pandey, B. (2016). Phytochemical Analysis Of Centella Asiatica L. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 5(8), 1342-1347.

Montezano A.C., Dulak-Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones A.M., Touyz, R.M. (2015). Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Canadian Journal of Cardiology*. 31(5), 631-641.

Moore P., Ginwala R., Revuri N., Kranz V.A., Houle J.D., Khan Z.K., Jain P. (2017). Nutraceutical Apigenin: mechanism of action associated with its anti-inflammatory activity and regulation of dendritic cell metabolism. *Journal of Immunology*. 198 (1), 219.

Moscatelli V., Hnatyszyn O., Acevedo C., Megías J., Alcaraz M.J., Ferraro G. (2006). Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-inflammatory activity. *Planta medica*. 72(01), 72-74.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mueller L., Boehm V. (2011). Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*. 16(2), 1055-1069.

Mukherjee P.K., Kumar V., Mal M., Houghton, P.J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14(4), 289-300.

Murata K., Matsumura S., Yoshioka Y., Ueno Y., Matsuda H. (2015). Screening of β -secretase and acetylcholinesterase inhibitors from plant resources. *Journal of natural medicines*. 69(1), 123-129.

Musci M., Yao S. (2017). Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 68(8), 913-918.

N

Nagano Y., Matsui H., Shimokawa O., Hirayama A., Nakamura Y., Tamura M., Hyodo I. (2012). Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 51(3), 196-203.

Najafi S. (2013). Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 4(10), 3274-3276.

Nassour J. (2015). Rôle du stress oxydant et des cassures de l'ADN dans l'émergence néoplasique post-sénescence (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).

Nelis H.J., Lavens P., Van Steenberge M.M., Sorgeloos P., Criel G.R., De Leenheer A.P. (1988). Qualitative and quantitative changes in the carotenoids during development of the brine shrimp *Artemia*. *Journal of lipid research*. 29(4), 491-499.

Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C., Van-Altana I.A., Scarlett C.J. (2017). Microwave-assisted extraction for saponins and antioxidant capacity from *Xao tam* phan (*Paramignya trimera*) root. *Journal of food processing and preservation*. 41(2), e12851.

Nichols J.A., Katiyar S.K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*. 302(2), 71-83.

Nicoletti M., Toniolo C., Venditti A., Bruno M., Ben Jemia M. (2015). Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Natural product research*. 29(3), 223-230.

Nilius A.M., Ma Z. (2002). Ketolides: the future of the macrolides?. *Current opinion in pharmacology*. 2(5), 493-500.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Noudeh G. D., Sharififar F., Khatib M., Behravan E., Afzadi M.A. (2010). Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane-permeabilizing and their surface properties. *African Journal of Biotechnology*. 9(1).

Nur Alam M.D., Bristi N.J., Rafiquzzaman M.D. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21, 143-152.

O

Oleszek W., Marston A. (2013). Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants (Vol. 45). Springer Science & Business Media (Eds.).

Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49(10), 4619-4626.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Japanese journal of Nutrition*. 44(6).

P

Panov D.A., Grishkovets V.I., Kachala V.V., Shashkov A.S. (2006). Triterpene glycosides from *Kalopanax septemlobum*. VI. glycosides from leaves of *Kalopanax septemlobum* VAR. *typicum* introduced to crimea. *Chemistry of natural compounds*. 42(1), 49-54.

Papalexandrou A., Magiatis P., Perdetzoglou D., Skaltsounis A.L., Chinou I.B., Harvala C. (2003). Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece. *Biochemical systematics and ecology*. 31(1), 91-93.

Pehlivan F.E. (2017). Vitamin C: An Antioxidant Agent. In *Vitamin C*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.69660.

Pelaia G., Vatrella A., Cuda G., Maselli R., Marsico S.A. (2003). Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life sciences*. 72(14), 1549-1561.

Peng C., Wang X., Chen J., Jiao R., Wang L., Li Y.M., Zuo Y., Liu Y., Lei L., Ma K.Y., Huang Y., Chen Z.Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed research international*. 2014 : 831841.

Perdetzoglou D., Skaltsa H., Tzakou O., Harvala C. (1994). Comparative phytochemical and morphological study of two species of the *Scabiosa* L. genus. *Feddes Repertorium*. 105, 157-165.

Pescheux J. (2016). L'implication de la vitamine C dans la thérapeutique parodontale (Doctorat dissertation, Université Paul Sabatier, Toulouse III. France).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Petchi R.R., Vijaya C., Parasuraman S. (2013). Anti-arthritic activity of ethanolic extract of *Tridax procumbens* (Linn.) in Sprague Dawley rats. *Pharmacognosy research.* 5(2), 113.

Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 30(1), 11-26.

Pisoschi A.M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry.* 97, 55-74.

Pisutthanan S., Plianbangchang P., Pisutthanan N., Ruanruay S., Muanrit O. (2004). Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST).* 12(2), 13-18.

Pober J.S., Sessa W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 7(10), 803.

Pochapski M.T., Fosquiera E.C., Esmerino L.A., dos Santos E.B., Farago P.V., Santos F.A., Groppo F.C. (2011). Phytochemical screening, antioxidant, and antimicrobial activities of the crude leaves' extract from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Pharmacognosy magazine.* 7(26), 165.

Polat E., Alankus-Caliskan Ö., Karayildirim T., Bedir E. (2010). Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* Arc. (L.). *Biochemical Systematics and Ecology.* 38(2), 253-255.

Poljsak B., Šuput D., Milisav I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity.* ID 956792, 1-11.

Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J., Valko M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences.* 38(7), 592-607.

Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry.* 269(2), 337-341.

Q

Quang T.H., Cong P.T., Yen D.T.H., Nhiem N.X., Tai B.H., Yen P.H., Van Minh C. (2018). Triterpenoid saponins and phenylpropanoid glycosides from the roots of *Polygala japonica* Houtt. with anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters.* 24, 60-66.

Quazi Sahely S., Anny F.C., Misbahuddin M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology.* 12(2), 5-2017.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Quezel P., Santa S. (1963). New flora of Algeria and the desert regions Meridional. Tome II. Paris. In: French National Center for Scientific Research, pp. 890-893.

R

Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Research International*, 7612-7627.

Rahman H., Eswaraiah M. C., Dutta A.M. (2015). *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 15(1), 115-121.

Rahmouni N^a., Pinto D.C., Santos S.A., Beghidja N., Silva A.M. (2018). Lipophilic composition of *Scabiosa stellata* L.: an underexploited plant from Batna (Algeria). *Chemical Papers*. 72(3), 753-762.

Rahmouni N^b., Pinto D.C., Beghidja N., Benayache S., Silva A. (2018). *Scabiosa stellata* L. Phenolic content clarifies its antioxidant activity. *Molecules*. 23(6), 1285.

Ramaiah S.K. (2011). Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clinics in laboratory medicine*. 31(1), 161-172.

Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. (2016). Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic Disease Clinics*. 42(1), 15-31.

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.

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

Reitman S., Frankel S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*. 28(1), 56-63.

Reitz C., Mayeux R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical pharmacology*. 88(4), 640-651.

Requena E.M., Rodriguez M.T.S., Gimenez, M.D.G. (1987). Contribution to a pharmacodynamic study of *Scabiosa atropurpurea* LI Analgesic and antipyretic activity. *Plant Medicine. Phytother.* 21, 47-55.

Rigat M., Bonet M.À., Garcia S., Garnatje T., Valles J. (2007). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*. 113(2), 267-277.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Riguera R. (1997). Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*. 5, 187-193.

Rizi M.M., Aghabarari B., Alizadeh M., Khanlarkhani A., Huerta M.M. (2017). The role of cobalt and copper nanoparticles on performance of magnetite-rich waste material in Fenton reaction. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 1-10.

Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*. 183, 235-258.

Ryan G. B., Majno G. (1977). Acute inflammation. A review. *The American journal of pathology*. 86(1), 183.

S

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

Saliba L.J., Krzyz R.M. (1976). Effect of heavy metals on hatching of brine-shrimp eggs. *Marine Pollution Bulletin*. 7(10), 181-182.

Sanchez, S. (Ed.). (2015). *Antibiotics*. Caister Academic Press. saponoside from *Scabiosa rotata*. J. Fac. Pharm. Gazi. Univ. 14, 31-36.

Sarikahya N.B., Nalbantsoy A., Top H., Gokturk R.S., Sumbul, H., Kirmizigul S. (2018). Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*. 38, 135-144.

Sarrafchi A., Bahmani M., Shirzad H., Rafieian-Kopaei M. (2016). Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants. *Current pharmaceutical design*. 22(2), 238-246.

Sayre L.M., Smith M.A., Perry G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry*. 8(13),721-738.

Schelterns P., Feldman H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. *The Lancet Neurology*. 2(9), 539-547.

Scott T.L., Rangaswamy S., Wicker C.A., Izumi T. (2014). Repair of oxidative DNA damage and cancer : recent progress in DNA base excision repair. *Antioxidants & redox signaling*. 20(4), 708-726.

Selkoe D.J. (2015). Alzheimer disease. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)* (pp. 753-768).

Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (2010) Fundamentals of inflammation. *Hardback*, USA, pp 13-14.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Serhan^a C.N., Chiang N., Dalli J. (2015). The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. In *Seminars in immunology*. Academic Press. 27 (3), pp 200-215.

Serhan^b C.N., Chiang N., Dalli J., Levy B.D. (2015). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7(2), a016311.

Sharma O.P., Kumar N., Singh B., Bhat T.K. (2012). An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins. *Food chemistry*. 132(1), 671-674.

Sies H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 4, 180-183.

Sies H. (2018). On the History of Oxidative Stress : concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*. 7, 122-126.

Sigel A. (2017). Metal ions in biological systems: volume 36: Interrelations between free radicals and metal ions in life processes. Routledge.

Silerme S. (2014). Etude des dommages de l'ADN impliquant des pontages ADN-protéines et ADN-polyamines (Thèse de Doctoral dissertation, Université de Grenoble).

Simkins A., Worth H.G.J. (1976). Determination of bilirubin in amniotic fluid: a comparison of some current methods. *Annals of clinical biochemistry*. 13(1-6), 510-515.

Singh D., Nainwani R., Sharma T., Gautam, R.K. (2013). *In-Vitro* Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activity of Hydroalcoholic Extract of Pongamia Pinnata (L.) Pierre Seed. *International Journal*, 2.

Singh, B.A., Sharma R. (2016). Anti-Inflammatory and antimicrobial effects of flavonoids from *Heliotropium ellipticum* Exudate. *Current Bioactive Compounds*, 12(2), 123-131.

Singh R., Sahore S., Kaur P., Rani A., Ray P. (2016). Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathogens and disease*. 74(6). DOI:10.1093/femspd/ftw056.

Singh R., Smitha M.S., Singh S.P. (2014). The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 14(7) : 4745-4756.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 16(3), 144-158.

Siti H.N., Kamisah Y., Kamsiah J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular pharmacology*. 71, 40-56.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sivanandham V. (2011). Free radicals in health and diseases-a mini review. *Pharmacologyonline*. 1, 1062-1077.

Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1502(1), 139-144.

Sorenson J.R. (2012). *Biology of copper complexes* (Vol. 16). Springer Science & Business Media.

Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H., Leonart M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*. 12(1), 376-390.

Speeckaert R., Dugardin J., Lambert J., Lapeere H., Verhaeghe E., Speeckaert M.M., Van-Geel N. (2018). Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 32 (7), 1089-1098.

Stadtman E.R., Levine R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 25, 207-218.

Stadtman, E.R. (2002). Importance of individuality in oxidative stress and aging 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(5), 597-604.

Štefanić I., Ljubić I., Bonifačić M., Sabljic A., Asmus K.D., Armstrong D.A. (2009). A surprisingly complex aqueous chemistry of the simplest amino acid. A pulse radiolysis and theoretical study on H/D kinetic isotope effects in the reaction of glycine anions with hydroxyl radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11(13), 2256-2267.

Stevens C.D. (2010) Clinical immunology and serology. Therd edition, F.A. Davis Company Philadelphia. pp 2-10.

Subedi N.K., Rahman S.M., Akbar M.A. (2016). Analgesic and Antipyretic Activities of Methanol Extract and Its Fraction from the Root of *Schoenoplectus grossus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 28(1),1-8.

Surai P. (2015). Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition*. 1(1).

Szwajgier D. (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids–interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22(4), 690-694.

T

Takebayashi J., Chen J., Tai A. (2010). A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* (pp. 287-296). Humana Press, Totowa, NJ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Takeuchi K. (2012). Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World journal of gastroenterology: WJG*. 18(18), 2147.

Tan, J.B.L., Lim, Y.Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food chemistry*. 172, 814-822.

Thanan R., Oikawa S., Hiraku Y., Ohnishi S., Ma N., Pinlaor S., Murata M. (2014). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*. 16(1), 193-217.

Thao N.P., Luyen B.T.T., Tai B.H., Woo M.H., Manzoor Z., Ali I., Kim Y.H. (2017). A new saponin from *Acanthopanax koreanum* with anti-inflammatory activity. *Archives of pharmacal research*. 40(3), 311-317.

Therond, P. (2006). Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). In *Annales pharmaceutiques francaises*, 64(6), 383-389.

Thomas A., South S., Lucero J., Prasad C., Imrhan V., Vijayagopal P., Juma S. (2017). Anti-Inflammatory effects of tart cherry polyphenols in RANKL-Stimulated RAW 264.7 murine macrophages. *The FASEB Journal*. 31(1), 972-14.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C., (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limonia strummon opetalum* leaves, *Food Science and Technology*. 43(4), 632-639.

Tramutola A., Lanzillotta C., Perluigi M., Butterfield D.A. (2017). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain research bulletin*. 133, 88-96.

Tucker P.S., Scanlan A.T., Dalbo V.J. (2015). Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015, 1-8.

Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*. 101(1), 267-273.

U

Usman H., Kaigama A.U., Ibisagba O.O., Fulata A.M., Ahmed I.A. (2018). Phytoconstituents evaluation and antimicrobial efficacy of the crude flavonoids and saponins rootbark extracts of *Terminalia avicennioides* and *Ficus polita*. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 7(2), 106-111.

V

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuča K., Musilek K. (2016). Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*. 90(1), 1-37.

Vane J.O.H.N., Botting R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *The FASEB journal*. 1(2), 89-96.

Vega N. M., Gore J. (2014). Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current opinion in microbiology*. 21, 28-34.

Verlaque R. (1977). Importance du fruit dans la détermination des Dipsacaceae. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 124(9), 515-527.

Verlaque R. (1984). A biosystematic and phylogenetic study of the Dipsacaceae. *Plant biosystematics*, 307-320.

Vincken J.P., Heng L., de Groot A., Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68(3), 275-297.

Vinegar R., Schreiber W., Hugo R. (1969). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 166(1), 96-103.

Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S.L., Pratiti D., Padmaja R., Deepak M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(2), 359-363.

Vo N.N.Q., Fukushima E.O., Muranaka T. (2017). Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins. *Journal of natural medicines*. 71(1), 50-58.

Vogel H.G. (2002). Drug discovery and evaluation : pharmacological assays. Springer Science & Business Media (Ed.).

Voutquenne L., Lavaud C., Massiot G., Men-Olivier L.L. (2002). Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical biology*. 40(4), 253-262.

W

Wang J., Liu K., Li X., Bi K., Zhang Y., Huang J., Zhang R. (2017). Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis* Grunning from different stages. *Journal of food science and technology*. 54(8), 2288-2295.

Wang J., Liu K., Xu D., Wang Q., Bi K., Song Y., Zhang L. (2013). Rapid micropropagation system in vitro and antioxidant activity of *Scabiosa tschiliensis* Grunning. *Plant Growth Regulation*. 69(3), 305-310.

Wang J., Wang N., Yao X., Ishii R., Kitanaka S. (2006). Inhibitory activity of Chinese herbal medicines toward histamine release from mast cells and nitric oxide

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

production by macrophage-like cell line, RAW 264.7. *Journal of natural medicines*. 60(1), 73-77.

Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Wang M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(5), 1892-1897.

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., LaVoie E.J., Huang T.C., Ho C.T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(12), 4869-4873.

Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H.G., Zhu X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1842(8), 1240-1247.

Wannes W.A., Marzouk B. (2016). Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes. *Journal of Acute Disease*. 5(5), 357-363.

Weidinger A., Kozlov A.V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 5(2), 472-484.

Wellington E.M., Boxall A.B., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H., Hawkey P.M., Thomas C.M. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*. 13(2), 155-165.

Whitaker A.M., Schaich M.A., Smith M.S., Flynn T.S., Freudenthal B.D. (2017). Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 22, 1493.

Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 111(3), 544-547.

Wojdyło A., Oszmiański J. et Czemerzys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105, 940-949.

Wu P., Gao H., Liu J. X., Liu L., Zhou H., Liu Z.Q. (2017). Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activities from *Ilex pubescens* roots. *Phytochemistry*. 134, 122-132.

Y

Yamada Y., Kiyokawa S., Mizushima Y. (1987). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. 45(5), 1102-1108.

Yao Y., Yang X., Shi Z., Ren G. (2014). Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *Journal of food science*. 79(5), 1018-1023.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Yoshiki Y., Kudou S., OKuBo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from Soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62(12), 2291-2299.

Yu J.S., Kim J.H., Lee S., Jung K., Kim K.H., Cho, J.Y. (2017). Src/Syk-targeted anti-inflammatory actions of triterpenoidal saponins from Gac (*Momordica cochinchinensis*) seeds. *The American journal of Chinese medicine*. 45(03), 459-473.

Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(6), 1619-1624.

Z

Zemek F., Drtinova L., Nepovimova E., Sepsova V., Korabecny J., Klimes J., Kuca K. (2014). Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert opinion on drug safety*. 13(6), 759-774.

Zemtsova G.N., Bandyukova V.A., Shinkarenko A.L. (1968). Quercetin diglucoside from the yellow *Scabiosa*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2(12), 678-680.

Zhang G., He L., Hu M. (2011). Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities *in vitro*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12(1), 18-25.

Zhang Q., Mao Z., Zhang Q., Qiu J., Jia, Z. (2017). Acute and sub-chronic toxicological studies of the iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 92, 315-323.

Zhang H., Tsao R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*. 8, 33-42.

Zheng Q., Koike K., Han L.K., Okuda H., Nikaido T., (2004). New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. *Journal of Natural Product*. 67, 604-613.

Zhou M., Huang L., Li L., Wei Y., Shu J., Liu X., Huang H. (2017). New furostanol saponins with anti-inflammatory and cytotoxic activities from the rhizomes of *Smilax davidiana*. *Steroids*. 127, 62-68.

Zhou N., Tang Y., Keep R.F., Ma X., Xiang J. (2014). Antioxidative effects of *Panax notoginseng* saponins in brain cells. *Phytomedicine*. 21(10), 1189-1195.

Zhou Q., Lin F.F., Liu S.M., Sui X.F. (2017). Influence of the total saponin fraction from *Dioscorea nipponica* Makino on TLR2/4-IL1R receptor signal pathway in rats of gouty arthritis. *Journal of ethnopharmacology*. 206, 274-282.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zong J., Wang R., Bao G., Ling T., Zhang L., Zhang X., Hou R. (2015). Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *Camellia oleifera* Abel. show anti-proliferative activity against tumor cells. *Fitoterapia*. 104, 7-13.

Zorofchian Moghadamtousi S., Abdul Kadir H., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S., Zandi K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed research international*, 2014.



Annexes

I- Produits chimiques

Tous les solvants utilisés dans les expériences (éther de pétrole, acétate d'éthyle, *n*-butanol, chloroforme, méthanol et éthanol) ont été achetés auprès de PROLAB, MERK EUROLAB. 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), acide chlorhydrique (HCl), persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), β -carotène, acide linoléique, tween 40, acide trichloroacétique (TCA), ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$), chlorure ferrique (FeCl_3), réactif de Folin-Ciocalteu, acide sulfurique (H_2SO_4), hydroxyde de sodium (NaOH), chlorure d'aluminium (AlCl_3), vanilline ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$), carbonate de sodium (Na_2CO_3), chlorure de cuivre [III] (CuCl_2), néocuprine ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$), ferène ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$), molybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ont été achetés de Sigma-Alderich Chemie et FlukaChemie. Quercétine ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), catéchine ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$), hydroxytoluène butylé (BHT) ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$), acide tannique ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), acide gallique ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$), chlorure de fer (II) (FeCl_2), ferrozine ($\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2$), l'hydroxyanisole butylé (BHA) ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$), l'acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) ont été achetés auprès de Sigma-Alderich Co., ST Louis, MO.

II- Gammes d'étalonnage

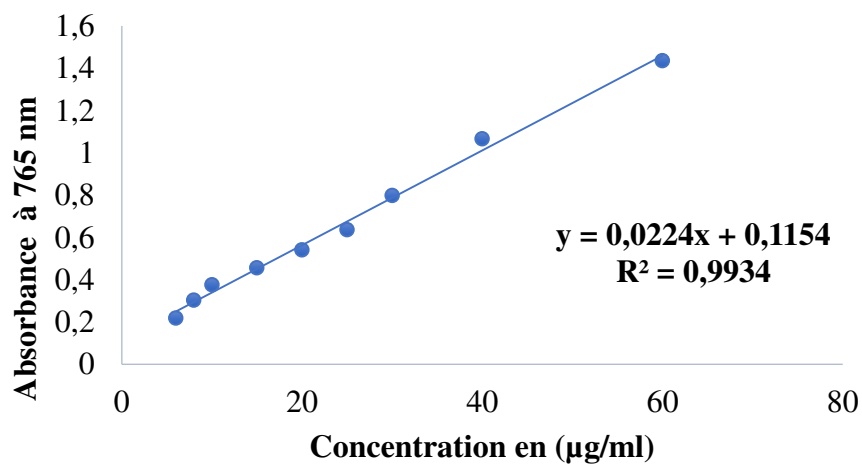


Figure30 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

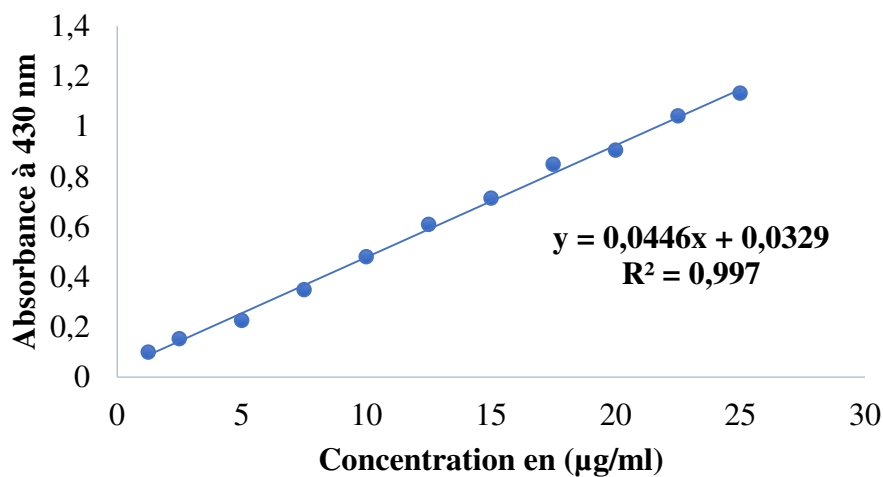


Figure31 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

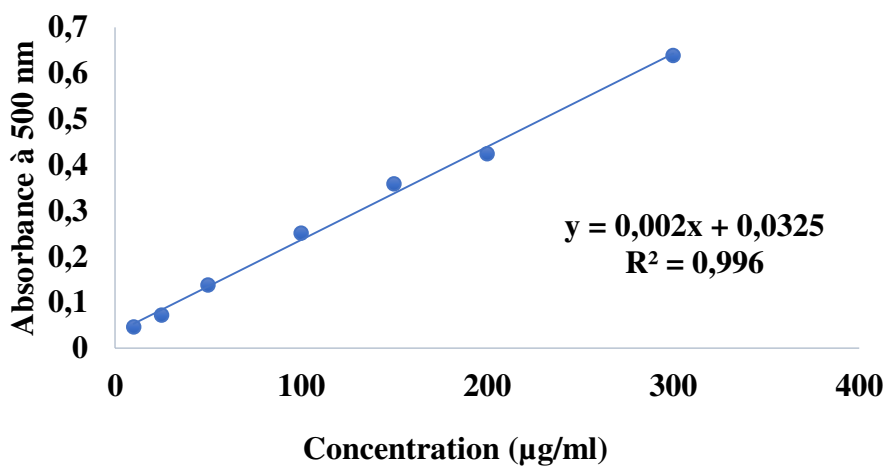


Figure 32 : Droite d'étalonnage de la catéchine.



**Communications
et publications**

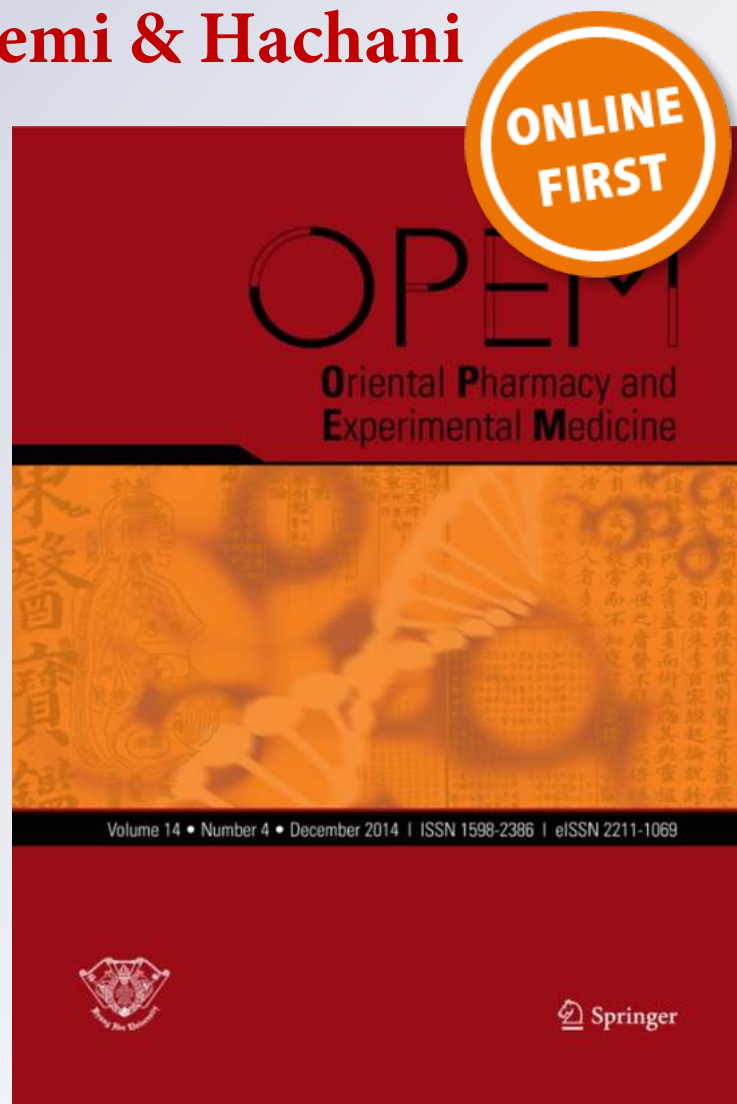
Acute toxicity and in vivo anti-inflammatory effects and in vitro antioxidant and anti-arthritic potential of Scabiosa stellata

Chaima Mouffouk, Leila Hambaba, Hamada Haba, Soumia Mouffouk, Chawki Bensouici, Sara mouffouk, Messaoud Hachemi & Hachani

Oriental Pharmacy and Experimental Medicine

ISSN 1598-2386

Orient Pharm Exp Med
DOI 10.1007/s13596-018-0320-3



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University and Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Acute toxicity and in vivo anti-inflammatory effects and in vitro antioxidant and anti-arthritis potential of *Scabiosa stellata*

Chaima Mouffouk^{1,2} · Leila Hambaba^{1,2} · Hamada Haba³ · Soumia Mouffouk³ · Chawki Bensouici⁴ · Sara mouffouk² · Messaoud Hachemi² · Hachani Khadraoui⁵

Received: 20 January 2018 / Accepted: 24 May 2018

© Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University and Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract

This study is devoted to the estimation of total bioactive contents and the evaluation of acute toxicity and in vivo anti-inflammatory effects and the assessment of in vitro antioxidant and anti-arthritis potential of the species *Scabiosa stellata*. The anti-arthritis activity was performed by bovine serum albumin denaturation method and the antioxidant activity was evaluated by eight different methods. Furthermore, the acute oral toxicity and the anti-inflammatory activity using the model of carrageenan-induced paw edema were tested on male Wistar rats. The ethyl acetate extract recorded the highest content of polyphenols, flavonoids and tannins. All the crude extracts (PE, EtAOc and *n*-BuOH) had antioxidant activities in various assays and prevent the denaturation of bovin serum albumin in dose depending manner. The oral administration of the ethyl acetate extract at various concentrations (500, 1000 and 2000 mg/kg), does not induce any toxic symptoms or mortalities in all the treated animals. No significant changes in biochemical and hematological parameters compared to the control group were observed. Thus, the approximate acute lethal dose 50 of this extract was higher than 2000 mg/kg. In addition, the administration of ethyl acetate extract at doses of 50 and 75 mg/kg prevents a significant acute paw edema and present a higher anti-inflammatory activity than Diclofenac as a positive control.

Keywords Acute toxicity · Anti-inflammatory · Antioxidant · Anti-arthritis · Phytochemical screening · *Scabiosa stellata*

Introduction

Inflammation is a defense reaction of the body to various attacks that can be physical, chemical or infectious (Vane and Botting 1987) leading to pathological complications such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis and chronic obstructive pulmonary diseases (Hansson 2005; Gan et al. 2004). The current treatment for inflammation is based on the use of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs. These molecules are effective but their prolonged use can lead to serious adverse effects such as gastrointestinal bleeding and peptic ulcers (Yamada et al. 1987). The human body is also exposed to oxidative stress resulting from the disruption between oxidative and antioxidant systems (Birben et al. 2012) causing multiple metabolic dysfunctions and damaging biological macromolecules including lipids, proteins and DNA (Therond 2006; Mahjoub and Masrou-Roudsari 2012). These later induce many diseases such as cancer (Sosa et al. 2013), cardiovascular disorders (Csányi and Miller 2014), hypertension (Kerr et al. 1999) and neurodegenerative diseases (Sayre et al. 2001). Therefore, it is

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13596-018-0320-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Hamada Haba
haba.hamada@yahoo.fr

- ¹ Laboratory of Chemistry of Materials and Living: Activity and Reactivity (LCMVAR), University of Batna-1, Batna, Algeria
- ² Laboratory of Biotechnology of Bioactive Molecules and Cell Physiopathology, University of Batna-2, Batna, Algeria
- ³ Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Batna, Algeria
- ⁴ Centre de Recherche en Biotechnologie, Ali Mendjli Nouvelle Ville UV 03, BP E73, Constantine, Algeria
- ⁵ Laboratoire d'Anapathologie Centre Anticancéreux (CAC) Batna, Département de médecine, Université de Batna-2, Batna, Algeria



necessary to develop new therapeutic agents with few side effects to prevent the occurrence of oxidative and inflammatory diseases. In this context, many researchers are interested in medicinal plants as an alternative natural source of secondary metabolites with therapeutic effects. But since the prolonged administration of bioactive molecules at high or low doses produces adverse or toxic effects on health, the toxicity of the plants extracts must be evaluated to determine the lethal dose 50.

The family Dipsacaceae is represented by three tribes and comprises nine genera. The genus *Scabiosa* is the most important of this family with about 100 species (Verlaque 1984). The plants of this genus are distributed mainly in the temperate region of Eurasia, Mediterranean basin, and mountains of the East and South Africa (Boulos 1997). Species of this genus are widely used in folk medicine for the treatment of various diseases such as dermatitis and ulcers (Hotta et al. 1989), for menstrual regulation (Bussmann et al. 2010) and they are also recommended for their diuretic effects (Bonet and Valles 2007). *Scabiosa stellata* L. is an annual plant with bluish flowers, distributed in North Africa (Quezel and Santa 1963) and used in Moroccan popular medicine against heel cracks (Bammi and Douira 2002) and for the treatment of various respiratory diseases (Wannes and Marzouk 2016). The aim of this study is the determination of polyphenol, flavonoid and tannin contents, the evaluation of acute toxicity and in vivo anti-inflammatory effects, and the assessment of in vitro antioxidant and anti-arthritis potential of the crude extracts from the species *S. stellata*.

Materials and methods

Chemicals

All solvents used in the experiments (petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol, chloroform, methanol and ethanol) were purchased from PROLAB, MERK EUROLAB. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4), hydrochloric acid (HCl), potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), β -carotene, linoleic acid, tween 40, trichloroacetic acid (TCA), potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$), ferric chloride (FeCl_3), Folin-Ciocalteu reagent, sulfuric acid (H_2SO_4), sodium hydroxide (NaOH), aluminum chloride (AlCl_3), vanillin ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$), sodium carbonate (Na_2CO_3), copper[II]chloride (CuCl_2), neocuprine ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$), ferene ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$), ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie and Fluka Chemie. Quercetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), catechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$), butylated hydroxytoluene (BHT) ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$), tannic acid ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), gallic acid ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$), iron chloride (II) (FeCl_2), ferrozine ($\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2$), butylate

hydroxyanisole (BHA) ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$), ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), bovine serum albumin (BSA) and carrageenan were purchased from Sigma-Aldrich Co., ST Louis, Mo.

Plant material

The species *Scabiosa stellata* L. was collected from the Aures region (Bellezma, Algeria) during spring season (May 2014) and identified by Professor Bachir Oudjehih, Agronomic Institute of the University of Batna-1, under the identification number 2224/LCCE.

Animals

Adult Wistar rats of both sexes (150–200 g), aged 2–3 months, were used to test acute toxicity and anti-inflammatory activity of the ethyl acetate extract. The rats are produced by the Pasteur Institute of Algiers and raised at the animal department of the “Department of Biology, University of Batna-2, Algeria” under standard experimental conditions, where temperature varies between 20 and 25 °C with a photoperiodic cycle (light/darkness) of 12 h.

Preparation of extracts

500 g of the whole plant *Scabiosa stellata* L. (aerial and root parts) were macerated twice (5 L \times 2) in the solvent mixture (Ethanol- H_2O /70:30) for 48 h at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated under vacuum to give 200 mL. The resulting aqueous phase was subjected to liquid–liquid fractioning using organic solvents: petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol (50 mL \times 5 for each solvent). Then, the organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to provide dryness extracts PE (1.03 g), EtOAc (6.52 g) and *n*-BuOH (30.38 g).

Phytochemical screening

The presence of many secondary metabolites namely (steroids, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, quinones and carotenoids) in the plant material was tested in the crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) obtained from the species *S. stellata* using diverse methods described previously in the literature (Fransworth 1966).

Total bioactive contents

Total phenolic content

The total phenolic content of crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) was estimated spectrophotometrically using Folin–Ciocalteu method (Le et al. 2007). Two hundred microliters of each extract were added to 1 mL of

Folin–Ciocalteu reagent (10%). After 4 min, a volume of eight hundred microliters of sodium carbonate solution (75 g/L) was added. The mixture was allowed to react for 2 h in darkness at room temperature. After incubation, the absorbance was recorded at 765 nm using UV–Vis spectrophotometer (VIS-7220G). Gallic acid (5–200 µg/mL) was used as reference to establish the calibration curve from which the concentration of polyphenols was calculated and the results were expressed in microgram equivalents of gallic acid per milligram of extract (µg GA/mg of extract).

Total flavonoid content

The quantification of the total flavonoid content was performed by the trichloroaluminum method (Turkoglu et al. 2007). 1 mL of AlCl₃ (2%) solution was added to 1 mL of the plant extracts. The mixture was vigorously stirred and incubated for 10 min at room temperature, and then the absorbance of each sample was read at 430 nm. Quercetin (1.25–25 µg/mL) was used to realize the calibration curve to estimate the concentration of flavonoids found in the crude extracts and the results have been given in micrograms equivalent of quercetin per milligram of extract (µg EQ/mg of extract).

Condensed tannins content

The quantitative analysis of the condensed tannins present in the organic extracts was carried out by the method described previously (Heimler et al. 2006). 1.5 mL of vanillin solution (4%) was added to 25 µL of each tested extract and 750 µL of concentrated hydrochloric acid (HCl). The obtained reaction mixture was agitated and incubated for 15 min and then the absorbance of each sample was measured at 500 nm. Catechin (10–300 µg/mL) was the standard used to determine the calibration curve in order to calculate the concentration of condensed tannins presents in the extracts. The results were expressed in micrograms of catechin equivalent per milligram of extract (µg EC/mg extract).

Antioxidant activity

DPPH free radical-scavenging assay

The antiradical activity of crude extracts obtained from the species *S. stellata* was evaluated by the free radical DPPH (Blois 1958). 25 µL of different dilutions of the extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) or standards (BHT, BHA, ascorbic acid, tannic acid and α-tocopherol) were added to 975 µL of DPPH (0.025 mg/mL) prepared in methanol. The obtained mixture was incubated for 30 min in obscurity. Then, the absorbances were measured using a UV–VIS spectrophotometer at 517 nm and the percentage of DPPH

radical-scavenging activity of each extract was calculated as follows:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

A_{control} is the absorbance of blank and A_{Sample} is the absorbance of positive control or sample.

ABTS scavenging activity

The ABTS scavenging activity of the obtained extracts was performed spectrophotometrically (Re et al. 1999). 2 mL of the diluted ABTS cation solution was added to 1 mL of sample solution: extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) or standards (tannic acid, ascorbic acid, α-tocopherol, BHT and BHA) at different concentrations (0.0156–1 mg/mL). After 30 min of incubation, the absorbances of the tested samples were measured at 734 nm and the percentage of inhibition was calculated using the following equation:

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

A_{control} is the absorbance of blank and A_{Sample} is the absorbance of positive control or sample.

Reducing power assay

The reducing power of different crude extracts was examined according to the previous method (Oyaizu 1986). One hundred microliters of sample solution (extracts or references) prepared at different concentrations were added to 0.5 mL of phosphate buffer (0.2 M pH 6.6) and 0.5 mL of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Then 500 µL of CCl₃COOH (10%) was added to the mixture, which was centrifuged (10 min/3000 rpm). A volume of 500 µL of the supernatant solution was mixed with 500 µL of distilled water and 125 µL of FeCl₃ (1%) freshly prepared. The absorptions were read at 700 nm and the results were calculated as $A_{0.5}$ (µg/mL), which indicates the concentration corresponding to the absorption at 0.50 nm. The reducing power of the various extracts was compared with those of BHA, BHT, ascorbic and tannic acids and α-tocopherol as standard.

Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

Fifty microliters of a solution of copper (II) chloride (10 mM) were added to 50 µL of the neocuprine solution (7.5 mM) and 60 µL of ammonium acetate buffer solution (1 M, pH = 7.0). Different concentrations of extracts and standards were added to the initial mixture to make a final volume of 200 µL. The samples were shielded from light and the absorbance was measured at 450 nm after 1 h of incubation. The results were calculated as $A_{0.5}$ (µg/mL) and the reduction capacity of the extracts was compared with

those of tannic acid, ascorbic acid, α -tocopherol, BHA and BHT as standards (Apak et al. 2004).

β -carotene bleaching inhibition activity

The β -carotene bleaching activity of crude extracts from *Scabiosa stellata* and references (BHA and BHT) was evaluated using the method previously described (Marco 1968). For the preparation of β -carotene emulsion 0.5 mg of β -carotene was mixed initially with two hundred mg of Tween 40 and 25 μ L of linoleic acid prepared in 1 mL of chloroform (CHCl_3). After the evaporation of the chloroform under vacuum, 100 mL of distilled water saturated with oxygen were then added to the mixture with vigorous stirring. 160 μ L of emulsion were added to 40 μ L of samples (extracts or standards) at different concentrations. The mixtures were incubated at 50 °C for 2 h and then the absorbances were measured at 470 nm and the percentage of the antioxidant activity (AA) was calculated using the following formula:

$$\text{AA\%} = \left(\frac{\text{Abs of } \beta\text{-carotene content after 2 h}}{\text{Abs of initial } \beta\text{-carotene content}} \right) \times 100$$

Total antioxidant capacity

To determine the total antioxidant activity of the extracts, nine hundred microliters of reagent solution composed of (0.6 M H_2SO_4 , 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate) were mixed with 100 μ L of crude extracts. The obtained solutions were incubated at 95 °C for 90 min. After incubation, the tubes are allowed to cool at room temperature and then the absorbance of each sample was read at 695 nm relative to a blank solution. The antioxidant activity of the extracts was expressed as microgram equivalents of ascorbic acid per milligram of crude extract ($\mu\text{g EAA/mg extract}$) (Prieto et al. 1999).

Chelation of ferrous iron

The chelation of ferrous iron of crude extracts was tested using the Ferrozine (Le et al. 2007). Five hundred microliters of the samples (extracts and EDTA) were initially mixed with one hundred microliters of FeCl_2 (0.6 mM) and nine hundred microliters of methanol. After 5 min, one hundred microliters of Ferrozine (5 mM) prepared in the methanol were added. The obtained mixture was agitated vigorously and incubated for 10 min at room temperature, the absorbance of each sample was measured at 560 nm and the results of ferrous iron chelation were transmitted as a percentage of inhibition (%) according to the equation:

$$\text{Activity (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \right] \times 100$$

A_{Control} is the absorbance at 560 nm of the control and A_{sample} is the absorbance of positive control or sample.

Chelation of the metal ions

According to Decker and Welch (1990), the chelation of metal ions was assessed. 400 μ L of prepared sample (extracts and EDTA) at different concentrations were added to 400 μ L of FeCl_2 (0.2 mM) and 400 μ L of ethanol. The reaction was initiated by the addition of 800 μ L of ferene solution (0.5 mM). After a vigorous stirring, the obtained samples were incubated for 10 min at room temperature and then their absorbances were measured at 562 nm. The results were given as a percentage of inhibition using the following formula:

$$\text{Activity (\%)} = \left(\frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

A_{Control} is the absorbance at 562 nm of the control and A_{sample} is the absorbance of positive control or sample.

In vitro anti-arthritic activity

The anti-arthritic activity of *S. stellata* extracts was achieved by bovine serum albumin denaturation method (Karthik et al. 2013). 500 μ L of sample solutions or standard drug (Ibuprofen) at different concentrations (125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) were added to 500 μ L of BSA solution (0.2%) prepared in Tris Buffer Saline (pH 6.6). A control tube contains a volume of 0.5 mL of BSA and 0.5 mL of ethanol was also prepared. The tested tubes were incubated at 37 °C for 10 min then heated at 72 °C for 5 min. After cooling, the absorbances of these solutions were read at 660 nm. Each experiment was performed in triplicate and the average absorbance was recorded. The percentage of inhibition of denaturation was determined as follows:

$$\text{Inhibition of denaturation (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \right] \times 100$$

A_{Control} is the absorbance at 660 nm of the control and A_{sample} is the absorbance of positive control or sample.

Acute toxicity assay

The acute oral toxicity of the ethyl acetate extract of *S. stellata* was evaluated on albino Wistar rats, according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guideline 423. Healthy adult males rats were divided randomly into 4 groups ($n = 5$) and placed under standard conditions. After 18 h of a fast with a free excess of water, the body weight of each animal was determined and the dose was calculated according to the body weight. The first group (control group) received orally saline (10 mL/kg). Groups 2, 3 and 4 were orally treated with EtOAc extract in

doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg, respectively as a single dose. The animals were observed to detect any sign of toxicity (Behavioral changes, body weight, food and water intakes, respiration, convulsion, constipation and urination) continuously for 2 h, 4 h, 24 h to 14 days after the treatment and to notice any mortality on 14th day and after an overnight fasting (18 h). The blood samples were collected into test tubes including EDTA for the estimation of hematological parameters and without anticoagulant to obtain serum used for the determination of biochemical parameters. After collecting the blood, all the animals were sacrificed and the vital organs (liver, kidney, and lungs) were separated. These organs were excised and examined macroscopically. Then, they are preserved in buffered formalin solution (10%) for histopathological examinations by standard techniques.

Carrageenan-induced paw edema in rats

The anti-inflammatory effects of EtOAc extract were examined according to the method of carrageenan-induced paw edema (Winter et al. 1962). The Wistar rats divided into four homogeneous groups of five rats each. After a fast of 18 h, the rats of each group received the tested samples orally. Witness group received saline solution (10 mL/kg). Groups 2 and 3 were orally treated with EtOAc extract in doses of 50 and 75 mg/kg, respectively and the positive control received an anti-inflammatory drug (Diclofenac) in a dose of 50 mg/kg. One hour after the different treatments, 100 μ L of λ -carrageenan (0.5%) was injected into each rat under the footpad of the left hind paw. The right hind paw was not treated. The evaluation of edema was followed and the diameter of the inflamed paw was recorded at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 24 h, after the injection of the λ -carrageenan (Alaoui et al. 1998). The percentage of inhibition of edema was calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[\text{M(DLH-DRH) control group} - \text{(DLH-DRH) treated group}]}{[\text{M(DLH-DRH) control group}]} \times 100$$

M is the Mean, DLH is the diameter of left hind and DRH is the diameter of the right hind.

Statistical analysis

The results were given as the mean \pm SD ($p < 0.05$) for three replicates for each sample. The $A_{0.5}$ (reducing power and CUPRAC assay) and IC_{50} (DPPH, ABTS, β -carotene bleaching inhibition and the anti-arthritic activities), EC_{50} (chelation of ferrous iron, chelation of the metal ions) values were calculated by linear regression analysis. For the in vivo study the results were expressed as the mean \pm SEM and were tested for significance using Student's t test.

Probability values ($p < 0.05$) were used to indicate statistical significance.

Results

Phytochemical screening

The phytochemical screening of crude extracts (PE, EtOAc and n -BuOH) from the plant *Scabiosa stellata* L. reveals the presence of various types of bioactive compounds such as steroids, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, quinons and carotenoids.

Total bioactive contents

The results of total phenolic, flavonoid and tannin contents of *S. stellata* extracts indicated differences in their total contents. The highest phenolic, flavonoid and tannin contents were found in the EtOAc extract (117.66 ± 0.52 μ g GAE/mg, 72.90 ± 0.76 μ g QE/mg and 32.05 ± 0.15 μ g EC/mg of plant extract) respectively, followed by n -butanolic extract (77.12 ± 0.29 μ g GAE/mg, 57.83 ± 0.25 μ g QE/mg and 0.95 ± 0.015 μ g EC/mg of plant extract) respectively. The petroleum ether extract exhibited the lowest contents (30.33 ± 0.15 μ g GAE/mg, 13.83 ± 0.45 μ g QE/mg and 0.07 ± 0.02 μ g EC/mg of plant extract) respectively.

Antioxidant activities

In the DPPH free radical scavenging activity (Table 1), all extracts possessed an antioxidant activity with a dose dependent manner. The n -BuOH extract exhibited higher antioxidant activity than the BHT, which is very close to EtOAc extract but this activity is relatively lower compared to the BHA, ascorbic acid, tannic acid and α -tocopherol as standards. The ability of the crude extracts to scavenge $ABTS^+$ radical was expressed as IC_{50} (μ g/mL) and the results are expressed in Table 1. The maximum scavenging activity was found in EtOAc extract, followed by the n -butanolic and PE extracts. The results of ferric reducing power ability of all the tested samples (Table 1) were affected in a dose-dependent manner. The $A_{0.5}$ of the EtOAc extract was higher than the values of ascorbic acid, α -tocopherol and BHA as common standards. The n -BuOH extract showed a close activity to ascorbic acid as a standard followed by the PE extract. The results of CUPRAC assay are compared with those of BHA, BHT, α -tocopherol, ascorbic and tannic acids as standards (Table 1). The activity was increased linearly with the increasing amount of extracts. EtOAc extract exhibited the highest activity among the investigated extracts, followed by n -BuOH and PE extracts. Moreover, all the crude

Table 1 Antioxidant activities of the species *S. stellata*

Extracts and standards	DPPH assay ^a	ABTS assay ^a	CUPRAC assay ^a	Reducing power assay ^a	β -carotene assay ^a	Phosphomolybdate assay ^a	Chelation in ferrous iron assay ^a	Chelation in metal chelate assay ^a
	IC ₅₀ (μ g/mL)	IC ₅₀ (μ g/mL)	A _{0.50} (μ g/mL)	A _{0.50} (μ g/mL)	IC ₅₀ (μ g/mL)	μ g EAA/mg ex	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (μ g/mL)
EtOAc	25.15 \pm 0.68	14.00 \pm 0.8	28.50 \pm 1.24	6.54 \pm 0.48	10.34 \pm 0.35	0.0660 \pm 0.003	5.026 \pm 0.073	> 200
<i>n</i> -BuOH	21.22 \pm 0.30	24.99 \pm 0.36	42.16 \pm 3.06	12.13 \pm 0.52	50.01 \pm 0.89	0.03 \pm 0.015	1.652 \pm 0.014	145.35 \pm 0.34
PE	171.61 \pm 0.12	64.10 \pm 0.38	100.95 \pm 8.06	> 50	11.18 \pm 0.01	0.0885 \pm 0.005	ND	ND
BHA ^b	6.82 \pm 0.49	1.81 \pm 0.10	3.64 \pm 0.19	8.41 \pm 0.67	1.05 \pm 0.01	NT	NT	NT
BHT ^b	22.32 \pm 0.02	1.29 \pm 0.30	9.62 \pm 0.87	> 50	0.90 \pm 0.02	NT	NT	NT
Tannic acid ^b	7.74 \pm 0.19	1.01 \pm 0.16	3.76 \pm 0.73	4.57 \pm 0.30	NT	NT	NT	NT
Ascorbic acid ^b	3.1 \pm 0.002	1.74 \pm 0.10	12.43 \pm 0.09	9.01 \pm 0.46	NT	NT	NT	NT
α -Tocopherol ^b	13.02 \pm 0.17	7.59 \pm 0.53	19.92 \pm 1.46	34.93 \pm 0.38	NT	NT	NT	NT
EDTA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.0627 \pm 0.0113	8.57 \pm 0.14

^aValues expressed are mean \pm SD of three measurements ($p < 0.05$)

^bReference compounds, *ND* not determined because the inhibition at highest screened concentration (200 μ g/mL) was less than 50%, *NT* not tested

extracts did not show a good antioxidant activity compared to the standards.

The total antioxidant activity of extracts by inhibition of lipid peroxidation in the β -carotene–linoleic acid system is shown in Table 1. The EtOAc extract displayed the highest antioxidant activity with a value of IC₅₀ 10.3 \pm 0.3 μ g/mL, followed by the PE and *n*-BuOH extracts. In phosphomolybdate assay, the highest antioxidant power (Table 1) was observed in PE extract. The results of the ferrous ion-chelating and chelation of the metal ions tests (Table 1) revealed that the *n*-BuOH extract has a moderate metal chelating activity compared to EDTA as a positive control.

In vitro anti-arthritic activity

All the crude extracts and the standard drug (Ibuprofen) prevent the denaturation of bovin serum albumin in concentration dependent manner (Table 2). Ibuprofen showed the maximum percentage of inhibition (100%) at the concentration of 1000 PPM. For the extracts, the maximum percentage of inhibition at the same concentration was observed in EtOAc (78.86%) extract followed by PE (16.02%) and *n*-BuOH (3.21%) extracts.

Acute toxicity

The results of the acute toxicity showed that no toxic symptoms were observed in any animals treated with the EtOAc extract at various concentrations (500, 1000 and 2000 mg/kg). The morphological appearances and

Table 2 Effect of *Scabiosa stellata* extracts on protein denaturation

Extracts/standard	Concentration (PPM)	Inhibition of denaturation (%)
Ibuprofen	1000	100.0 \pm 0.3
	500	100.0 \pm 0.1
	250	92.0 \pm 0.2
	125	61.0 \pm 0.2
	62.5	37.0 \pm 0.3
PE	1000	16.0 \pm 0.1
	500	5.6 \pm 0.1
	250	4.0 \pm 0.1
	125	0.4 \pm 0.2
	62.5	-1.6 \pm 0.3
EtOAc	1000	78.8 \pm 0.4
	500	69.5 \pm 0.1
	250	58.9 \pm 0.1
	125	47.6 \pm 0.2
	62.5	20.3 \pm 0.0
<i>n</i> -BuOH	1000	3.2 \pm 0.3
	500	1.8 \pm 0.1
	250	-1.7 \pm 0.6
	125	-2.4 \pm 0.4
	62.5	-5.8 \pm 0.1

the behavior of the treated animals were normal. The body weight of all the rats increased normally after the administration of the ethyl acetate extract in various

concentrations after 14 days. In fact, the food intake and water consumption were not affected by the treatment indicating that this latter did not promote any appetite suppression. In addition, the treatment with EtOAc extract at different doses did not significantly alter serum biochemical parameters (Table 3) such as ALT, AST, total

bilirubine, urea, glycemia, cholesterol, triglycerides and creatinine levels compared to the control group and no significant changes in hematological parameters (Table 4) were observed during this study. Therefore, the approximate acute lethal dose (LD50) of the ethyl acetate extract was estimated to be higher than 2000 mg/kg.

Table 3 Effect of administration of the ethyl acetate extract of *Scabiosa stellata* on biochemical parameters of rats in acute toxicity (mean ± SEM, n=5)

Parameter	Unit	Control group	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
ALT	(UI/l)	25.33 ± 0.05	25.22 ± 0.2	21.11 ± 0.5	20.67 ± 0.3
AST	(UI/l)	14.67 ± 0.1	14.11 ± 0.05	13.78 ± 0.8	12.44 ± 0.6
Urea	(g/l)	0.38 ± 0.12	0.37 ± 0.3	0.39 ± 0.26	0.38 ± 0.9
Creatinine	(mg/l)	7.19 ± 0.5	7.69 ± 2.1	7.06 ± 1.2	7.98 ± 3.5
Glucose	(g/l)	0.98 ± 0.09	0.96 ± 0.1	1.02 ± 0.3	0.99 ± 0.2
Cholesterol	(g/l)	0.46 ± 0.3	0.43 ± 0.3	0.49 ± 0.2	0.50 ± 0.21
Triglycerides	(g/l)	0.29 ± 1.2	0.31 ± 0.07	0.32 ± 0.19	0.28 ± 0.33
Total Bilirubin	(mg/l)	1.52 ± 0.3	1.39 ± 0.2	1.22 ± 0.4	1.5 ± 0.9

Values expressed as mean ± SEM, Significance with Tukey's test following one way ANOVA is evaluated as $p < 0.05$

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase

Table 4 Hematological parameters of animals treated orally with the ethyl acetate extract of *Scabiosa stellata* at different doses compared to control group in acute toxicity test (mean ± SEM, n=5)

Parameters	Unit	Control group	Doses of ethyl acetate extract		
			500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
WBC	(10 ⁹ /l)	4.47 ± 0.65	3.98 ± 0.15	4.38 ± 0.55	4.20 ± 0.25
LYM	(10 ⁹ /l)	2.85 ± 0.74	2.30 ± 0.14	2.73 ± 0.38	2.20 ± 0.15
LYM	%	64.73 ± 1.2	62.15 ± 2.4	61.85 ± 2.4	66.43 ± 2.6
MID	(10 ⁹ /l)	0.67 ± 0.1	0.57 ± 0.21	0.48 ± 0.15	0.60 ± 0.14
MID	%	18.03 ± 1.6	18.30 ± 4.2	9.8 ± 3.34	18.03 ± 2.31
GRA	(10 ⁹ /l)	0.60 ± 0.05	0.85 ± 0.18	1.18 ± 0.25	0.50 ± 0.07
GRA	%	14.23 ± 4.2	19.55 ± 4.05	28.35 ± 4.05	18.05 ± 0.43
HGB	(g/dL)	15.00 ± 0.55	15.48 ± 0.15	15.28 ± 0.19	14.95 ± 0.15
MCH	pg	18.73 ± 0.35	18.48 ± 0.5	18.78 ± 0.63	18.68 ± 0.3
MCHC	g/dl	34.80 ± 0.5	32.90 ± 0.8	34.23 ± 0.75	33.38 ± 1.15
RBC	(10 ¹² /l)	8.02 ± 0.15	8.40 ± 0.3	7.95 ± 0.15	8.00 ± 0.15
MCV	(fL)	54.00 ± 1.4	56.25 ± 0.61	56.25 ± 0.8	55.95 ± 1.2
HCT	(%)	43.33 ± 1.55	47.25 ± 1.23	42.50 ± 2.8	45.24 ± 1.8
RDW	(%)	11.80 ± 1.2	13.85 ± 0.85	17.05 ± 0.83	15.43 ± 2.25
PLT	(10 ⁹ /l)	644.67 ± 7.2	6.96 ± 2.56	626 ± 2.56	672.89 ± 2.59
MPV	(fL)	6.63 ± 0.35	6.80 ± 0.2	6.13 ± 0.06	6.13 ± 0.3
PDW	(fL)	11.27 ± 1.8	12.93 ± 1.6	9.18 ± 0.07	10.68 ± 1.8
PCT	%	0.49 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.02

Values expressed as mean ± SEM, Significance with Tukey's test following one-way ANOVA is evaluated as $p < 0.05$

Cells: RBC Red blood cells, WBC Wight blood cells, LYM Lymphocytes, PLT Platelets, GRA granulocytes, MID Mid-sized cel; Means: MCV Mean cell volume, MCHC Mean corpuscular hemoglobin concentration, MPV Mean platelets volume, MCH Mean corpuscular volume; Red cell parameters: RDW Red cell distribution width, Hct Haematocrit, HGB Hemoglobin; Platelet parameters: PDW Platelet distribution width, PCT Platelet crit, PCV Packed cell volume

Carrageenan-induced paw edema in rats

Injection of carrageenan under the paws of the rats treated with a solution of NaCl (0.9%) causes a gradual increase in the volume of the edema throughout the duration of the experiment. The anti-inflammatory effect of the ethyl acetate extract and Diclofenac appeared in the first hour of the experiment. Indeed, the EtOAc extract have the highest anti-inflammatory effect after 2 h of the treatment with a percentage of inhibition 72.73% at a dose of 50 mg/kg. The maximal anti-inflammatory activity of the reference drug (Diclofenac) was observed at the third hour of the experiment (61.59%), the ethyl acetate extract showed a close percentage of inhibition to Diclofenac for the two doses tested, but the lowest dose (50 mg/kg) was more effective (58.33%) than that of 75 mg/kg having a percentage inhibition (54.52%). The anti-inflammatory effect of Diclofenac decreases after the 3rd hour (4 h = 47.08% and 5 h = 37.80%), after 24 h of treatment Diclofenac inhibits only 15.68% of inflammation. But the anti-inflammatory activity of the EtOAc extract become greater than that of Diclofenac after the 3rd hour of treatment and the anti-inflammatory effect persists until 24 h.

This result shows that the elimination of molecules having an anti-inflammatory effect present in EtOAc extract requires more than 24 h (Fig. 1).

Discussion

The phytochemical screening of crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) from the plant *Scabiosa stellata* L. reveals the presence of various types of bioactive compounds such as steroids, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, quinons and carotenoids, known for their antioxidant and anti-inflammatory activities. Indeed, several studies carried out on *Scabiosa* species have shown the presence of different classes of secondary metabolites. The flavonoids were isolated previously from many species like *Scabiosa prolifera* (Al-Qudah et al. 2017), *S. ochroleuca* (Zemtsova et al. 1968), *S. caucasica* (Garaev and Movsumov 2008), *S. tenuis* and *S. argentea* (Perdetzoglou et al. 1994). Triterpenoids and saponins have been found in the species *Scabiosa tschiliensis* (Zheng et al. 2004), *S. bipinnata* (Kuril'chenko et al. 1971) and *S. rotata* (Baykal et al. 1998). Many

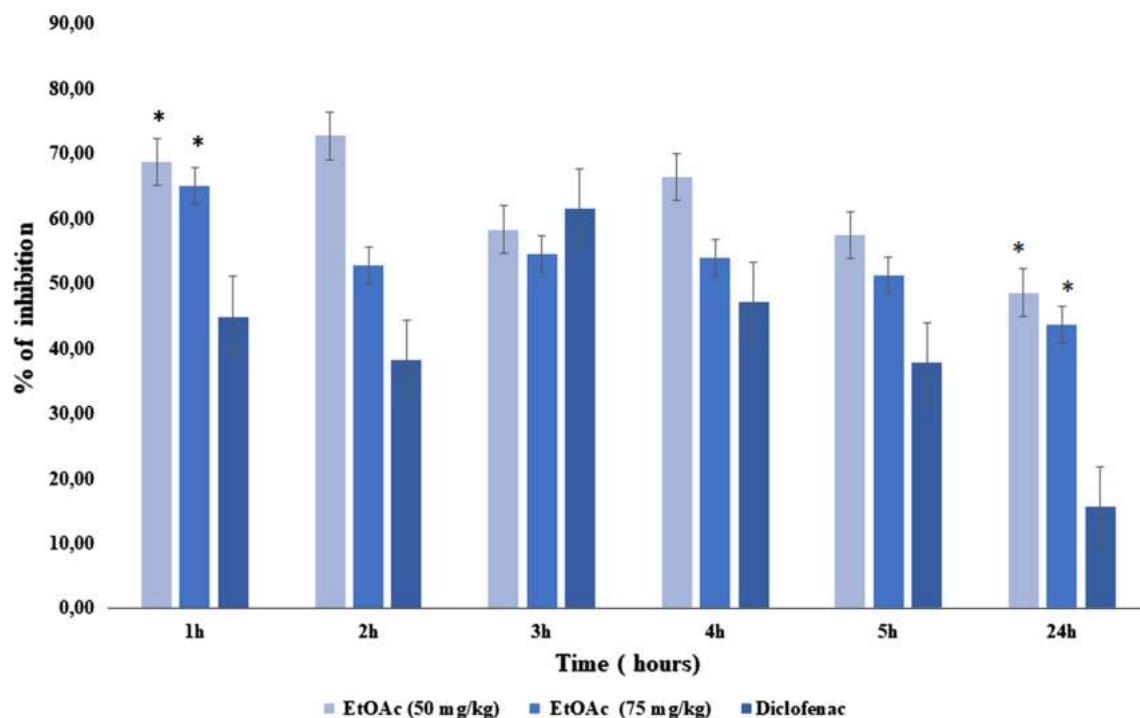


Fig. 1 Effect of oral administration of crude extract of *S. stellata* on rat paw edema induced by carrageenan (n=5 animals). Values expressed as mean \pm STD; Significance with Tukey's test following one way ANOVA is evaluated as * $p < 0.05$

phenolic compounds were identified in *S. atropurpurea* (Elhawary et al. 2011) and *S. comosa* (Ji et al. 2014). Alkaloids were purified from *S. bipinnata* (Kuril'chenko et al. 1971). Iridoid glucosides were isolated from *Scabiosa stellata* (Lehbili et al. 2017), *S. atropurpurea* (Polat et al. 2010), *S. columbaria* (Horn et al. 2001) and coumarins were found in *S. hymettia* (Christopoulou et al. 2008), while sterols were detected in *S. comosa* (Ji et al. 2014).

In this study, moderate contents of polyphenols and flavonoids with a very low concentration of condensed tannins were also estimated. All the crude extracts exhibit an interesting antioxidant activity at different systems including: DPPH and ABTS radicals scavenging activities, reducing power, CUPRAC assay, β -carotene bleaching inhibition activity, total antioxidant capacity by phosphomolybdate assay, ferrous ions and metal chelating assay.

Previous research conducted on the species *S. tschiliensis* (Wang et al. 2013) and *S. arenaria* (Hlila et al. 2015) indicated lower levels of polyphenol and flavonoid contents compared to the results of the present study. The results of the antioxidant activity by DPPH of the methanolic extract of the plant *S. stellata* showed a lower value of $IC_{50} = 86 \mu\text{g/mL}$ (Lehbili et al. 2017) compared to our results. The antioxidant activity of some *Scabiosa* species (Al-Qudah et al. 2017; Hlila et al. 2015; Wang et al. 2013; Elhawary et al. 2011) are in good agreement with our results. The variation of results regarding the antioxidant tests could be explained by the difference in the reactivity of extracts due to their chemical complexity, the variation in polarities and the position of functional groups in the active secondary metabolites with potential antioxidant activities.

The scavenging power of ABTS was higher than that of DPPH radical. Indeed, many studies reported that the solubility of the tested extract regarding different test systems and the stereoselectivity of radicals affect the capacity of extracts to react against different radicals (Yu et al. 2002). The reducing power of extracts which is strongly correlated with their antioxidant activities is probably due to the presence of specific phytochemicals that can be served as an electron donor. The important total antioxidant activity of PE extract in β -carotene–linoleic acid system could be attributed to molecules with low polarities which react in these non-polar systems. The low metal chelating activities could be due to the absence of compounds that reduce the concentration of the transition metal and stimulate lipid peroxidation.

All the crude extracts showed the ability to prevent the denaturation of bovin serum albumin in concentration dependent manner. This result indicated in one hand the

ability of the crude extracts to prevent the alteration of the electrostatic, hydrogen, hydrophobic and disulfide bonds leading to maintain the three-dimensional structure of the proteins, and in the other hand the capability of various extracts to control the production of self-antigen in case of rheumatoid arthritis disease. However, the ethyl acetate extract was the most effective against protein denaturation which indicated that this extract may be a source of compounds with powerful anti-inflammatory effects. These compounds could be used for the treatment of rheumatoid arthritis. The interesting anti-inflammatory and antioxidant activities of EtOAc extract on different systems can be attributed to the phenolic and flavonoid contents. In fact, several studies noticed that phenolic compounds constitute the most powerful antioxidant agents isolated from plants (Medini et al. 2014). Phenolic secondary metabolites possess interesting biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogen, and antiapoptosis and cell proliferation activity (Singh et al. 2007).

The richness of EtOAc extract in polyphenols and flavonoids, its powerful antioxidant activities and the significant results of the in vitro anti-inflammatory activity motivated us to study the acute toxicity of this extract in order to estimate the DL50, used for the choice of the therapeutic dose for evaluating the in vivo anti-inflammatory effect and confirming the results obtained in vitro. Several studies performed previously have shown that intoxications induce an increase in hepatic enzyme activity, in particular catalase and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), which are biomarkers of liver cell viability (Ramaiah 2011). Poisoning is also associated with degeneration and structural changes in hepatocytes. Our results indicated that administration of EtOAc extract orally at the doses of 500, 100 and 2000 mg/kg, did not significantly increase plasma concentrations of AST and ALT compared to the control group.

Histological examination of the liver confirmed these results (Fig. 2). In fact, no structural alteration of hepatocytes, focal necrosis and vacuolization were observed in all treated rats. The high levels of cholesterol and triglyceride are a common sign of intoxications. This alteration is due to an increase of lipid peroxidase levels and unsaturated fatty acids resulting from biological disorders and the loss of structural integrity of the membrane inducing the disruption of hepatic metabolism in rats. However, treatment with EtOAc extract did not interfere with these parameters (cholesterol and triglycerides), confirming the absence of hepatotoxicity.

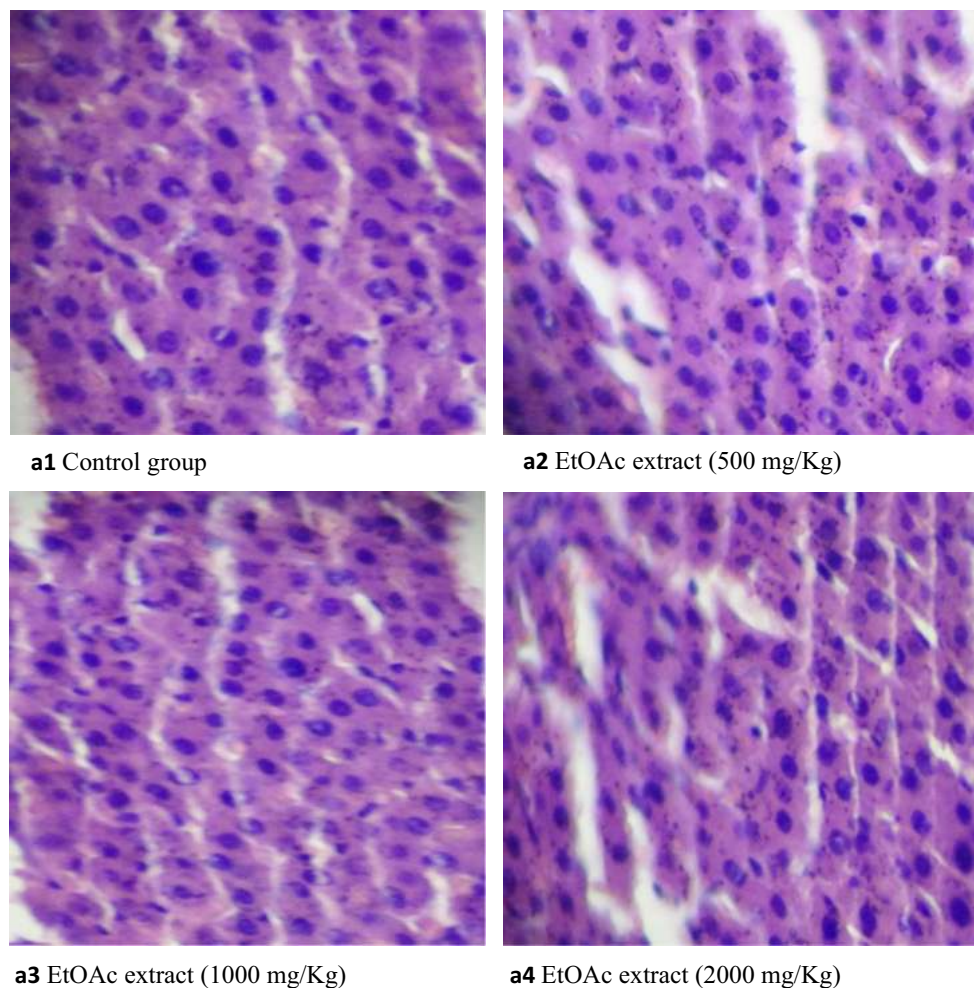


Fig. 2 Representative photomicrographs of histological preparation (0.5 μm), stained with hematoxylin and eosin of liver (magnification $\times 20$)

In addition, oral administration of the EtOAc extract did not cause an increase in serum creatinine and urea. These parameters are important markers of renal dysfunction (Levey et al. 2006; Gowda et al. 2010). Therefore, this extract did not induce any increase of protein catabolism and did not cause any damage to the renal filtration mechanism. The histological examination of the kidney (Fig. 3) confirmed these results. In fact, no structural alterations in the cortical zone or bowman's capsules were observed in all the treated rats with this extract at different doses. This treatment did not induce the change of the respiratory rate, and the histological examination did not show any structural alterations in lungs (Fig. 4).

Many studies recorded that the poisoning is associated with risks of anemia and inflammatory reactions due to the

stimulation of the immune system (Hossein Zadeh et al. 2013; Yakubu et al. 2007; Yagminas et al. 1990). The analysis of the hematological parameters indicates no significant decrease in MCH, MCV, MCHC, hemoglobin, hematocrit and red blood cell counts in all the treated rats at different doses was observed. Furthermore, no increase in lymphocytes, granulocytes, platelets, MID, PDW and PCT was noticed. These results suggest that the ethyl acetate extract has no effect on erythropoiesis mechanism and did not cause anemia or any inflammatory reaction.

The injection of carrageenan induces a biphasic reaction: during the first hour, carrageenan induces the synthesis of chemical mediators (histamin and serotonin) that maintain the inflammation. But after the first hour and up to the fourth-hour, carrageenin promotes the production of

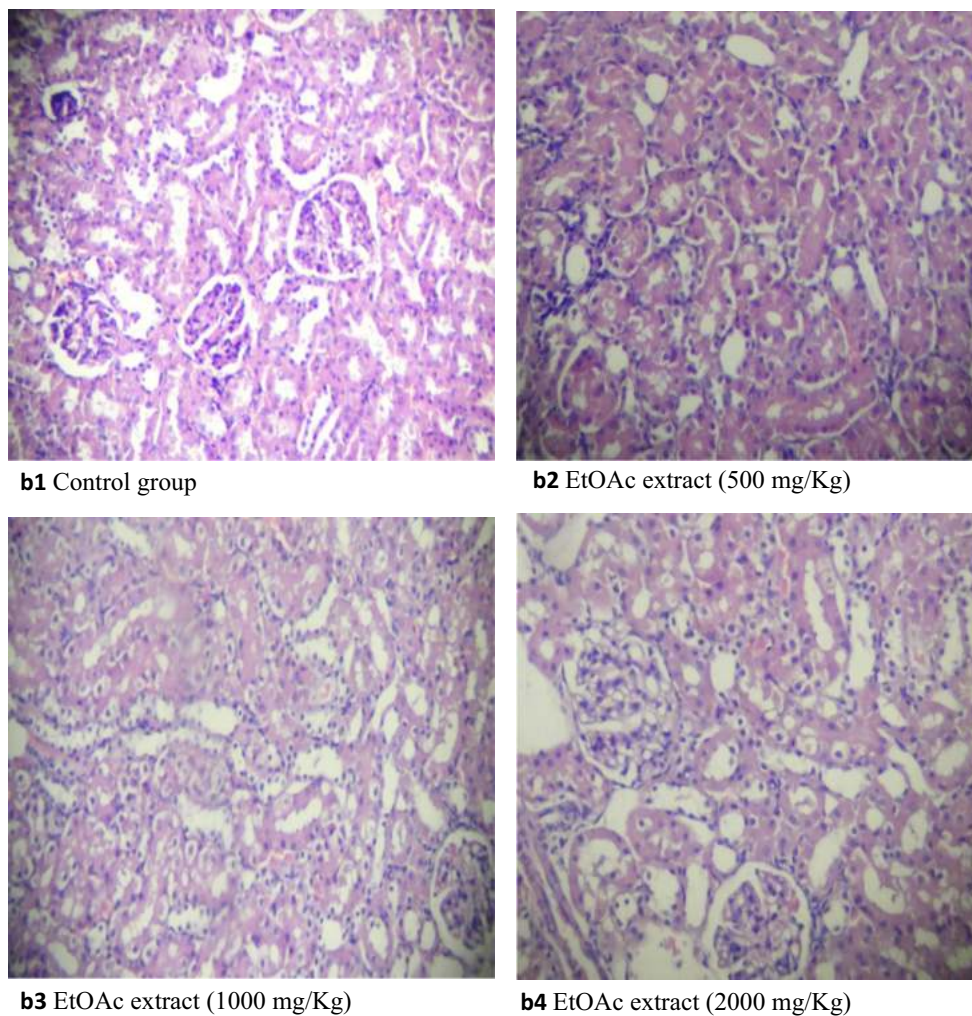


Fig. 3 Representative photomicrographs of histological preparation (0.5 μm), stained with hematoxylin and eosin of kidneys (magnification $\times 20$)

prostaglandins, proteases and lysosomes. This phase is sensitive to natural and synthetic anti-inflammatories such as glucocorticoids (Vinegar et al. 1969).

The EtOAc extract administrated at the doses of (75 and 50 mg/kg) showed high anti-inflammatory activity during the first two hours of the treatment. This result indicated that this extract contains natural anti-serotonic and anti-histaminic molecules. After 3 h of treatment, the ethyl acetate extract has a very close percentage of inhibition to that of Diclofenac which showed the ability of this extract to inhibit the production of prostaglandins. The lowest dose (50 mg/kg) is more effective, showing that the EtOAc extract is more active at low doses. After the third hour of treatment, the EtOAc extract exhibited a higher anti-inflammatory effect than Diclofenac and this effect continues until 24 h after the

treatment, indicating that the elimination of the molecules having an anti-inflammatory effect present in this extract required more than 24 h. The effectiveness of the EtOAc extract could be related to its chemical composition, particularly the presence of flavonoids which showed previously important anti-inflammatory effects (Noreen et al. 1998; Yoon and Baek 2005).

Conclusion

The present study reported the biological evaluation of *Scabiosa stellata* L. The phytochemical screening of crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) indicates the presence of various types of bioactive compounds known

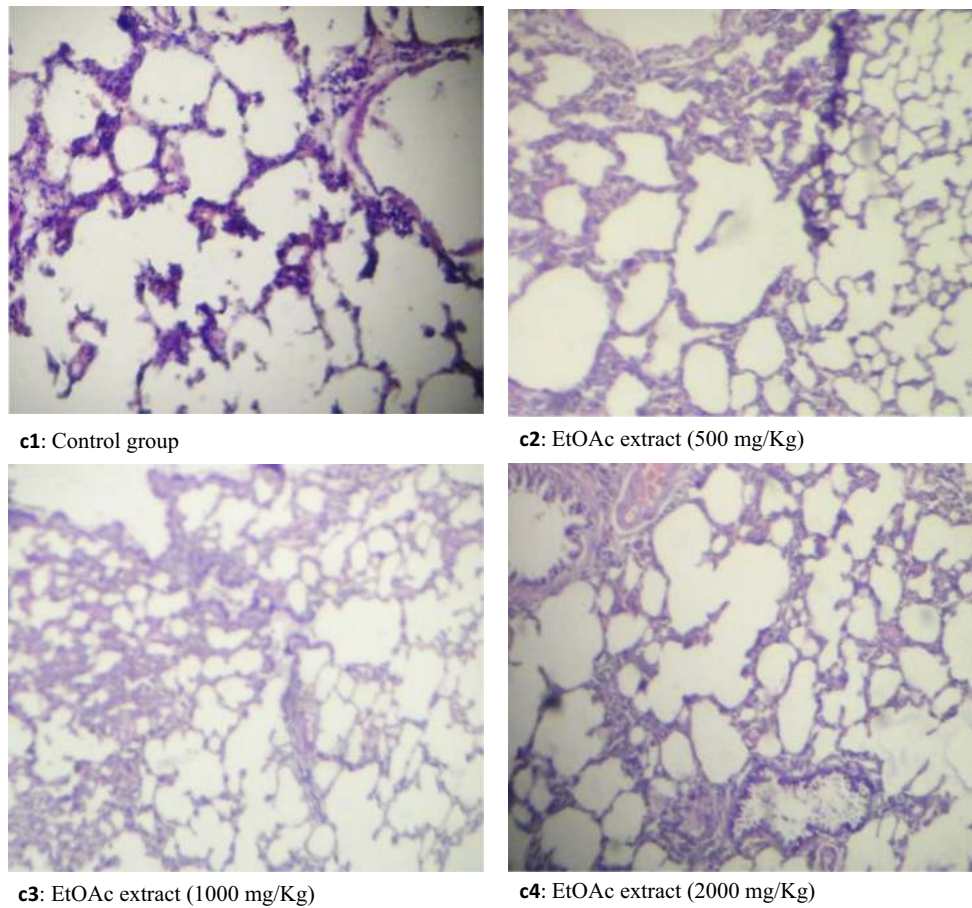


Fig. 4 Representative photomicrographs of histological preparation (0.5 μ m), stained with hematoxylin and eosin of lung (magnification $\times 20$)

for their antioxidant and anti-inflammatory activities. The ethyl acetate extract shows a height in vitro antioxidant and anti-arthritis activities and in vivo anti-inflammatory effect, whereas this extract did not produce any significant toxic effect. Furthermore, it can be concluded that *S. stellata* extracts could be used as a good source of alternative natural antioxidants helpful in preventing or slowing the progress of various oxidative stress-related diseases. These antioxidants could have pharmaceutical or dietetics applications and as a source of anti-inflammatory and anti-proliferative compounds. The ethyl acetate extract from *Scabiosa stellata* could be used safely for therapeutic use in pharmaceutical formulations.

Acknowledgements The authors wish to express thanks to the DGRSDT of the Algerian ministry of higher education and scientific research for providing a research grant (Project 8/u05/853).

Compliance with ethical standards

Ethical statement The experimental protocol was approved by the Biology Discipline, Life Science of University of Batna-2, Algeria.

Conflict of interest The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Alaoui K, Lagorce JF, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H, Roquebert J (1998) Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*. *Ann Pharm Fr* 56(5):220–228
- Al-Qudah MA, Ootom NK, Al-Jaber HI, Saleh AM, Abu Zarga MH, Afifi FU, Abu Orabi ST (2017) New flavonol glycoside from *Scabiosa prolifera* L. aerial parts with in vitro antioxidant and cytotoxic activities. *Nat Prod Res* 31(24):2865–2874

- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 52(26):7970–7981
- Bammi J, Douira A (2002) Medicinal plants in the forest of Achach (central plateau, Morocco). *J Acta Bot Mal* 27:131–145
- Baykal T, Panayir T, Tasdemir D, Sticher O, Çalis I (1998) Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry* 48(5):867–873
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1):9
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617):1199–1200
- Bonet MÀ, Valles J (2007) Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): plants used in veterinary medicine. *J Ethnopharmacol* 110(1):130–147
- Boulos L (1997) Endemic flora of the middle east and North Africa. *Rev Ecol Desert Conserv Dev* 1:229–260
- Bussmann RW, Glenn A, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A (2010) Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnobiol Ethnomed* 6(1):10
- Christopoulou C, Graikou K, Chinou I (2008) Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae). *Chem Biodivers* 5(2):318–323
- Csányi G, Miller FJJ (2014) Oxidative stress in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 15(4):6002–6008
- Decker EA, Welch B (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem* 38(3):674–677
- Elhawary SS, Eltantawy ME, Sleem AA, Abdallah HM, Mohamed NM (2011) Investigation of phenolic content and biological activities of *Scabiosa atropurpurea* L. *World Appl Sci J* 15(3):311–317
- Fransworth NR (1966) Biological and phytochemical screening of plants. *J Pharm Sci* 55(3):225–276
- Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD (2004) Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 59(7):574–580
- Garaev EA, Movsumov IS, Isaev MI (2008) Flavonoids and oleanolic acid from *Scabiosa caucasica*. *Chem Nat Compd* 44(4):520–521
- Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AA, Vernekar SN (2010) Markers of renal function tests. *N Am J Med* 2(4):170
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352(16):1685–1695
- Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A (2006) Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem* 99(3):464–469
- Hlila MB, Mosbah H, Mssada K, Ben Jannet H, Aouni M, Selmi B (2015) Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Ind Crops Prod* 67:62–69
- Horn MM, Drewes SE, Brown NJ, Munro OK, Meyer JM, Mathekgga AD (2001) Transformation of naturally-occurring 1,9-trans-9,5-cis-sweroside to all trans-sweroside during acetylation of sweroside aglycone. *Phytochemistry* 57(1):51–56
- Hossein Zadeh H, Shakib SS, Sameni AK, Taghiabadi E (2013) Acute and subacute toxicity of saffranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *IJPR* 12(1):93
- Hotta M, Ogata K, Nitta A, Hoshikawa K, Yanagi M, Yamazaki K (1989) Useful plants of the world. Heibonsha LTD, Tokyo
- Ji M, Li SJ, Ma CM (2014) Chemical constituents of the inflorescence of *Scabiosa comosa* Fisch and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *J Inner Mong Univ (Natural Science Edition)* 4:398–403
- Karthik K, Kumar BRP, Priya VR, Kumar SK, Rathore RSB (2013) Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in vitro method. *Indian J Res Pharm Biotechnol* 1(5):729
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominicczak AF, Hamilton CA (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 33(6):1353–1358
- Kuril'chenko VA, Zemtsova GN, Bandyukova VY (1971) A chemical study of *Scabiosa bipinnata*. *Chem Nat Compd* 7(4):519
- Le K, Chiu F, Ng K (2007) Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem* 105(1):353–363
- Lehbili M, Magid AA, Hubert J, Kabouche A, Voutquenne-Nazabadioko L, Renault JH, Nuzillard JM, Morjani H, Abedini A, Gangloff SC, Kabouche Z (2017) Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 125:41–48
- Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksens S et al (2006) Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 145(4):247–254
- Mahjoub S, Masrou-Roudsari J (2012) Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic syndrome. *Casp J Intern Med* 3(1):386
- Marco GJ (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 45(9):594–598
- Medini F, Fellah H, Ksouri R, Abdelly C (2014) Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *J Taibah Univ Sci* 8(3):216–224
- Noreen Y, Serrano G, Perera P, Bohlin L (1998) Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Med* 64(6):520–524
- Organization for Economic Co-operation and Development (2002) OECD guidelines for the testing of chemicals. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development [Online]. Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/2741541.pdf>
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction: anti-oxidative activity of products of browning reaction. *Jpn J Nutr* 44(6):307–315
- Perdetzoglou D, Skaltsa H, Tzakou O, Harvala C (1994) Comparative phytochemical and morphological study of two species of the *Scabiosa* L. genus. *Feddes Rep* 105(3–4):157–165
- Polat E, Alankus-Caliskan Ö, Karayildirim T, Bedir E (2010) Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* Arc (L.). *Biochem Syst Ecol* 38(2):253–255
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269(2):337–341
- Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vols 1–2. In: CNRS (Ed), Paris, pp 892
- Ramaiah SK (2011) Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin Lab Med* 31(1):161–172
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9):1231–1237
- Sayre LM, Smith MA, Perry G (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8(7):721–738
- Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007) Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A Cunn. *Food Chem Toxicol* 45(7):1216–1223
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013) Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12(1):376–390

- Therond P (2006) Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr* 64(6):383–389
- Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chem* 101(1):267–273
- Vane J, Botting R (1987) Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 1(2):89–96
- Verlaque R (1984) Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. I. Délimitation des Dipsacaceae à l'intérieur des Dipsacales, rapports avec les autres familles de l'ordre. *Rev Gén Bot* 91:81–121
- Vinegar R, Schreiber W, Hugo R (1969) Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 166(1):96–103
- Wang J, Liu K, Xu D, Wang Q, Bi K, Song Y, Li J, Zhang L (2013) Rapid micropropagation system in vitro and antioxidant activity of *Scabiosa tschiliensis* grunning. *Plant Growth Regul* 69(3):305–310
- Wannes WA, Marzouk B (2016) Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes. *J Acute Dis* 5(5):357–363
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *PSoc Exp Biol Med* 111(3):544–547
- Yagminas AP, Franklin CA, Villeneuve DC, Gilman AP, Little PB, Valli VE (1990) Subchronic oral toxicity of triethyl lead in the male weanling rat. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological effects. *Fundam Appl Toxicol* 15:580–596
- Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT (2007) Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. *Pharmacogn Mag* 3(9):34–38
- Yamada Y, Kiyokawa S, Mizushima Y (1987) Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nihon rinsho. Jpn J Clin Med* 45(5):1102–1108
- Yoon JH, Baek SJ (2005) Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J* 46(5):585–596
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J Agric Food Chem* 50(6):1619–1624
- Zemtsova GN, Bandyukova VA, Shinkarenko AL (1968) Quercetin diglucoside from the yellow *Scabiosa*. *Pharm Chem J* 2(12):180–678
- Zheng Q, Koike K, Han LK, Okuda H, Nikaido T (2004) New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. *J Nat Prod* 67(4):604–613

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of Cytotoxic Effect, Anti-cholinesterase, Hemolytic and Antibacterial activities of the Species *Scabiosa stellata* L.

Chaima Mouffouk^a, Leila Hambaba^a, Hamada Haba^{b*}, Soumia Mouffouk^b and Chawki Bensouici^c

^aBiotechnology's Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, Faculty of the Sciences of Nature and Life, University of Batna-2, Batna, Algeria; ^bLaboratory of Chemistry and Environmental Chemistry (LCCE), Department of Chemistry, Faculty of Matter Sciences, Batna-1 University, Batna, Algeria; ^cBiotechnology Research Center (CRBT), Ali Mendjli New Town UV 03, BP E73 Constantine, Algeria

Abstract: Objective: In this study, cytotoxic effect, anticholinesterase, hemolytic and antibacterial activities of crude extracts (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol) obtained from the plant *Scabiosa stellata* L. were evaluated.

Methods: The cytotoxicity of extracts was tested by Brine shrimp lethality method; the acetylcholinesterase inhibitory activity was performed using Ellman's colorimetric method and the hemolytic activity was assessed by spectrophotometric method towards human erythrocytes. Furthermore, the antibacterial activity was estimated by agar disk diffusion assay against ten bacterial strains.

Results: The phytochemical screening of the extracts revealed the presence of several types of secondary metabolites. A significant cytotoxic effect was observed for the *n*-butanolic extract with 57.2 ± 0.2 % of mortality at 80 $\mu\text{g/mL}$, the ethyl acetate extract had a moderate anticholinesterase activity at 200 $\mu\text{g/mL}$. The hemolytic assay exhibited that *n*-butanolic and ethyl acetate extracts induce hemolysis in dose-dependent manner with values of EC_{50} at 37.3 ± 0.5 and 106.6 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. All the crude extracts showed antibacterial activity against most tested strains, with zones of inhibition ranging from 9 to 20 mm.

Conclusion: The results indicate that the extracts obtained from *S. stellata* can be an important source of therapeutic agents against pathological damage due to free radicals inducing neurodegenerative and infectious diseases, while *n*-butanolic extract could be used as a good source of alternative natural anti-proliferative compounds.

Keywords: Cytotoxicity, anticholinesterase activity, hemolytic activity, antibacterial activity, phytochemical screening.

1. INTRODUCTION

The supplementation of the body by exogenous bioactive compounds is one of the new therapeutic strategies to prevent the appearance of cancers [1], oxidative, infectious and neurodegenerative diseases [2]. In this context, many researchers are interested in medicinal plants as an alternative and important source of natural compounds. But the use of plant extracts could affect the erythrocytes membrane inducing hemolytic anemia, which requires an evaluation of their hemolytic activity before their administration [3].

The genus *Scabiosa* belonging to the family Dipsacaceae comprises about 100 species [4]. Plants of this genus are widely used in traditional medicine for the treatment of various diseases including hypoglycemia [5], respiratory diseases and menstrual regulation [6] and for their diuretic

effects [7]. They are also recommended in dermatoses and against ulcers [8].

In fact, several studies carried out on *Scabiosa* genus demonstrated their biological activities such as analgesic and antipyretic [9], anti-inflammatory and antinociceptive [10], antidiabetic [11], anticholinesterase [12], antimicrobial [13], antiviral [14], and antioxidant activities [15].

The species *Scabiosa stellata* L. is an annual plant with bluish flowers [16]. It is distributed in North Africa [17] and used in folk medicine for the treatment of many human diseases as an expectorant, purifying, diaphoretic, stomachic, appetizer and digestive. It is also indicated in cases of bronchitis, bronchial pneumonia, influenza and asthma [18], and against cracks in the heel [19].

The present study investigates the evaluation of the cytotoxic effect, anticholinesterase, hemolytic and antibacterial activities of the petroleum ether (PE), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH) crude extracts obtained from the Algerian species *S. stellata*.

*Address correspondence to this author at the Batna-1 University; Faculty of Matter Sciences; Department of Chemistry. (L.C.C.E) Batna, Algeria; Tel/Fax: +213 33 31 90 09; E-mail: haba.hamada@yahoo.fr

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

The plant *Scabiosa stellata* L. was collected in May 2014 in the Aures region (Bellezma, Algeria) and was identified by Professor Bachir Oudjehih, Agronomic Institute of the University of Batna-1, under the number 2224/LCCE.

2.2. Preparation of Extracts

The whole plant *Scabiosa stellata* (500 g) was macerated twice (5 L \times 2 each 48h) with a solvent mixture of ethanol-H₂O (70:30) at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated under vacuum at room temperature to obtain a hydro-alcoholic extract (400 mL). This solution was submitted to liquid-liquid fractioning using organic solvents PE, EtOAc and *n*-BuOH successively (100 mL \times 5 of each organic extract) until the separation of both phases aqueous and organic. The obtained phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to give the corresponding crude extracts.

2.3. Phytochemical Screening

In order, to relate the pharmacological activities of crude extracts of *S. stellata* with their chemical composition, the phytochemical screening were performed using the methods of Farnsworth based on chemical reactions inducing the change of the initial mixture color or the formation of a precipitate [20] to reveal the presence of many secondary metabolites namely steroids, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, quinones and carotenoids.

2.4. Brine Shrimp Lethality Test

The cytotoxicity assay was evaluated on brine shrimp lethality [21]. Brine shrimp eggs were hatched in a shallow rectangular dish (150 mm \times 5 mm) filled with sea water. A plastic divider with several 2 mm holes was clamped in the middle of the dish to make two unequal compartments. The shrimp eggs (50 mg) were sprinkled into the larger compartment which was darkened, while the smaller compartment was illuminated. After 48 hours, the phototropic nauplii were collected using Pastor Pipette from the illuminated compartment. The test samples (crude plant extracts) in various concentrations (0.5, 1, 2, 4, 8 mg/mL) were prepared in DMSO. 100 μ L of each prepared solution was transferred into vial tubes containing 4.9 mL of seawater (38 g marine salts dissolved in 1000 mL distilled water) and ten larvae of brine shrimps (nauplii) to obtain final concentrations of 10, 20, 40, 80 μ g/mL. The vials were maintained under illumination. After 24 hours, the survived shrimps were counted and the total death and percentage mortality (death) at each dose level and control were determined.

2.5. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity

The inhibition of AChE by crude extracts was evaluated using the method described by Ellman *et al.* [22]. 750 μ L of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0) was added to 50 μ L of crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) at different concentrations and 100 μ L of AChE (5.32×10^{-3} U) solution was prepared in phosphate buffer saline pH = 8. The mixture was incubated at 25 °C for 15 minutes then 50 μ L of DTNB

(5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) (0.5 mM) was added with 50 μ L of acetylthiocholine iodide (0.71 mM). The absorbance of the mixture was read at 412 nm, after 5, 10, 15 and 20 min. Galantamine was used as a positive control. The percentage of inhibition was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = (E - S/E) \times 100$$

Where E is the activity of the enzyme without extract and S is the activity of the enzyme with the extract.

2.6. Hemolytic Activity

The *in vitro* hemolytic activity was performed using the method of Kumar [23]. In the first time, erythrocytes suspension was prepared, five milliliters of blood (group O positive) was collected from a healthy individual in tubes containing heparin. The collected blood was centrifuged at 1500 rpm for three minutes. Plasma (supernatant) was discarded and the pellet was washed three times with sterile phosphate buffer saline solution (pH = 7.2). The obtained erythrocytes were resuspended in normal saline to 0.5 % suspension.

A volume of 0.5 mL of the cell suspension was mixed with 0.5 mL of the crude extracts prepared in phosphate buffer saline at different concentrations (125, 250, 500 and 1000 μ g/mL). The mixtures were incubated for 30 min at 37 °C. After incubation, the mixture was centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The absorbances of the free hemoglobin in the supernatant were measured spectrophotometrically at 540 nm. Phosphate buffer saline and distilled water were used as minimal and maximal hemolytic controls. Each experiment was performed in triplicates at each concentration. The level of percentage hemolysis by the extracts was calculated according to the following formula:

$$[(At-An)/(Ac-An)] \times 100$$

Where At is the absorbance of the test sample, An is the absorbance of the positive control (Phosphate buffer saline) and Ac is the absorbance of the negative control (distilled water).

2.7. Antibacterial Activity

The antibacterial activity of the crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) was estimated by the agar disk diffusion assay [24] against ten bacterial strains including four Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus albus*, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* D) and six Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Typhimurium and *Enterobacter sakazaki*). The bacterial strains used were initially isolated from patient affected with infections, identified in the Laboratory of Microbiology University Hospital Center (Batna) by microscopic examination stain reaction according to their morphology, Gram character, colony aspect, oxygen requirement, physiological and biochemical characters and using serological methods and purified using the method of streaking the four quadrants in sterile conditions and at optimum temperatures according to the strain concerned for 24 h. One or several colonies from each pure culture were transferred into 5 mL of nutrient broth. The bacterial suspension was homogenized and incubated at 37

°C for 10-24 hours. After incubation, a reading of the optical density (OD) of 1 mL of inoculum was made by a spectrophotometer at 625 nm. Opacity must be equivalent to 0.5 McFarland. A sample from each inoculum was used to inoculate Petri disks containing Mueller Hinton by swabbing technique. Wathman paper disks (6 mm) were impregnated with 10 μ L of the extract solutions at different concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 mg/L) and filed carefully on the surface of the inoculated agar with sterile forceps. The discs of the negative controls were impregnated with DMSO. The Petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. The tests were performed in triplicate (three boxes for each concentration of extract and for each strain). The results were expressed by the diameters of zones of inhibition around the discs produced.

3. STATISTICAL ANALYSIS

The results were given as the means \pm S.D ($p < 0.05$) for three replicates for each sample. The IC₅₀ (anticholinesterase and hemolytic activities), and LC₅₀ (brine shrimp lethality test) values were calculated by linear regression analysis.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1. Phytochemical Screening

The results of the phytochemical screening of PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts from *S. stellata* are presented in Table 1. Various types of bioactive compounds were detected such as polyphenols (flavonoids, tannins and quinones) known for their antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities [25, 26], steroids, and saponins which have been previously isolated from this species with cytotoxic and antibacterial effects [27, 28].

Table 1. Phytochemical screening of *S. stellata* extracts.

Phytochemicals	Extracts		
	PE	EtOAc	<i>n</i> -BuOH
Tannins	-	+	+
Steroids	+	-	-
Flavonoids	-	+	+
Coumarins	-	-	-
Saponins	-	-	+
Carotenoids	+	-	+
Quinones	-	+	-
Cyanogenic glycosides	-	-	-
Alkaloids	-	-	-

(+) presence of phytochemicals, (-) absence of phytochemicals.

4.2. Brine Shrimp Lethality Test

The plant extract lethality correlates reasonably well with cytotoxic and anti-tumor properties. For this reason, all the extracts obtained from the plant *Scabiosa stellata* were subjected to Brine Shrimp lethality bioassay to evaluate any possible cytotoxic action. The results are given in Fig. (1).

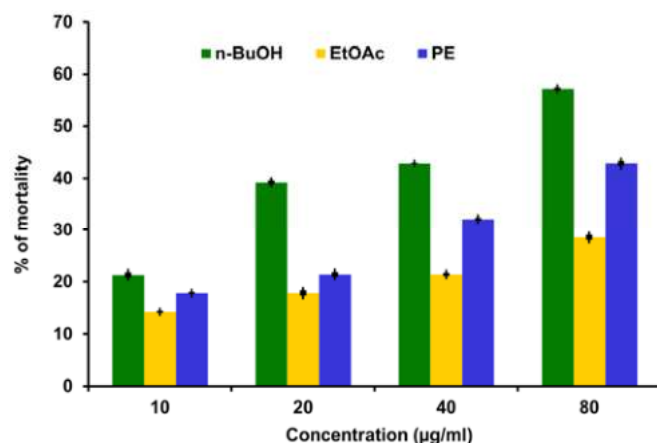


Fig. (1). Pourcentage of mortality observed after the treatment with crude extracts of *S. stellata* in Brine shrimp lethality bioassay.

The *n*-butanolic extract was the most toxic to Brine Shrimp nauplii, with 57.2 ± 0.2 % of mortality at 80 μ g/mL followed by the ethyl acetate extract (28.5 % of mortality) and the petroleum ether extract (42.8 % of mortality) at the same concentration (80 μ g/mL).

According to Clarkson's toxicity criterion [29], the ethyl acetate and petroleum ether extracts are moderately toxic while the *n*-butanolic extract is highly toxic. In fact, many researches demonstrated that extracts or compounds having cytotoxic effect could constitute effective antitumor agents helpful in the treatment of cancers [21]. The significant cytotoxicity of the *n*-butanolic extract can be explained by the presence of secondary metabolites with cytotoxic activity compared to EtOAc and PE extracts. Indeed, the result of the phytochemical screening indicates clearly that *n*-BuOH extract contains saponins which are absent in the other fractions. These compounds are well-known as secondary metabolites with apoptotic cytotoxic effects and antiproliferative activities [30, 31]. It is possible also that this cytotoxic effect is related to the lytic properties inducing membrane instability.

4.3. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder of the central nervous system that develops progressively. Presently, the only treatment for this disease is acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. Several synthetic inhibitors are used clinically, but they show limited effectiveness and some side effects, this is why the search of new biologically active agents from natural sources represents a promising area of investigation [32]. The crude extracts of *S. stellata* were tested for their AChE inhibitory activities by spectrophotometric Ellman method and the results are presented in Table 2.

According to Vinutha and collaborators [33], the extracts are classified as potent AChE inhibitors if they have the ability to inhibit more than 50% of the enzyme, the AChE inhibitory activity is moderate if the extract causes the inhibition of 30 to 50% and low if the extract inhibits less than 30%. The ethyl acetate extract has a moderate activity at the concentration of 200 μ g and *n*-BuOH extract has a low AChE inhibitory activity at the same concentration. The PE

extract did not show any AChE activity at all the tested concentrations.

Previous research conducted on the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the stems and leaves of the species *S. arenaria* [12] showed strong inhibition of AChE with values of IC₅₀ at 0.016 and 0.029 mg/mL respectively. Compared to the results of the present study, this variation in AChE activities among the species of the same genus could be explained by the difference in their chemical composition especially in polyphenols and flavonoids known for their anticholinesterase activities [34].

4.4. Hemolytic Activity

The erythrocyte model has been widely used to verify the direct indication of membrane toxicity. Because blood is available and cells are easy to isolate from the blood; moreover, erythrocyte membrane has similarities with other cell membranes [35]. The results of hemolytic activity of crude extracts obtained from *S. stellata* on red blood cells are represented in Table 3.

The results showed that the hemolytic activity of the crude extracts increased in a dose-dependent manner. The butanolic extract exhibited a high hemolytic effect toward human erythrocytes with a value of EC₅₀ reported at 37.3 ± 0.5 µg/mL, the EtOAc extract has a moderate hemolytic activity with an EC₅₀ of 106.6 ± 0.3 µg/mL while the PE extract did not display any hemolysis of red blood cells at all the tested concentrations. The hemolytic activity of crude extracts is related to their chemical composition. Several studies showed that the ability to induce the lysis of erythrocytes is one of the most important characteristics of saponins [36] which have been previously found in the *n*-butanolic extract. The origin of the phenomenon is generally ascribed

to the amphiphilic properties of saponins, but there is a lack of knowledge of the intimate molecular requirements for this activity [37]. It is very important to notice that iridoids were previously isolated from the ethanolic extract of *S. stellata* and could constitute the main cause of the hemolysis observed in the *n*-BuOH and EtOAc extracts. Indeed, many studies reported that iridoid glycosides induce hemolytic anemia and a significant decrease of red blood cells and hemoglobin [38].

4.6. Antibacterial Activity

The results of the antibacterial activity are presented in Tables 4 and 5. All the tested extracts showed inhibition of bacterial growth against at least two strains. The strains *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas aregionosa* (ATCC 15442) and *Salmonella* Typhimurium are the most resistant strains to all plant extracts. The ethyl acetate extract was found to be the most effective extract against the following strains *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* D, *E. coli* ATCC 35218, *A. baumannii* and *P. mirabilis*. The greatest zone of inhibition was observed against the clinical strain *P. mirabilis* which is considered as a common cause of nosocomial and urinary infections and one of the most resistant strains [39]. The *n*-BuOH extract has an antibacterial activity against two Gram-negative bacteria *A. baumannii* and *E. sakazaki*. While the petroleum ether extract exhibited an inhibitory effect against *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 35218). The results obtained in previous study on the antibacterial activity of the hydro-alcoholic extract (EtOH-H₂O:70%) of *S. stellata* against 18 microorganisms including 17 Gram-positive and one Gram-negative bacteria different than those used in this study, showed a moderate to low antimicrobial activity [26] which is in agreement with the results of the present study.

Table 2. Results of acetylcholinesterase inhibitory activity.

Extracts	Acetylcholinesterase Inhibitory Activity						
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
PE	Na	Na	Na	Na	Na	Na	> 200
EtOAc	2.1 ± 0.1	5.3 ± 0.4	14.9 ± 0.2	17.8 ± 0.1	23.9 ± 0.2	30.8 ± 0.1	> 200
<i>n</i> -BuOH	Na	Na	Na	3.2 ± 0.2	7.1 ± 0.1	10.9 ± 0.2	> 200
Galantamine ^a	43.8 ± 0.1	68.5 ± 0.3	80.7 ± 0.4	85.8 ± 1.6	91.8 ± 0.2	94.8 ± 0.3	6.3 ± 1.2

Values expressed are means ± SD of three measurements (p < 0.05). ^aReference compounds. Na: no absorbance.

Table 3. Results of hemolytic activity of crude extracts obtained from *S. stellata*.

Extracts	Concentration (µg/mL)				
	62.5	125	250	500	EC ₅₀
PE	Na	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.4	3.0 ± 0.2	> 500
EtOAc	35.3 ± 0.8	55.7 ± 0.3	64.5 ± 0.4	71.0 ± 0.6	106.6 ± 0.3
<i>n</i> -BuOH	58.0 ± 0.9	63.4 ± 0.3	74.6 ± 0.1	80.9 ± 0.2	37.3 ± 0.5

Values expressed are means ± SD of three measurements (p < 0.05). Na: no absorbance.

Table 4. Diameter of the zones of inhibition (mm) against Gram-positive strains.

Inhibition Zone (mm)					
Extracts	Dilution*	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus albus</i>	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Streptococcus</i> D
PE	1/1	18 ± 0.2	-	9 ± 0.1	-
	1/2	15 ± 0.1	-	-	-
	1/4	12 ± 0.3	-	-	-
	1/8	9 ± 0.1	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-
EtOAc	1/1	13 ± 0.2	-	9 ± 0.3	9 ± 0.1
	1/2	10 ± 0.1	-	-	-
	1/4	9 ± 0.1	-	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-
n-BuOH	1/1	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-

Values expressed are means ± SD of three measurements ($p < 0.05$). (-) No zones of inhibition around the discs. * Stock solution had the concentration of 1 g/L.

Table 5. Diameter of the zones of inhibition (mm) against Gram-negative strains.

Inhibition Zone (mm)							
Extracts	Dilution*	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Enterobacter sakazaki</i>
PE	1/1	12 ± 0.1	-	-	-	-	-
	1/2	10 ± 0.2	-	-	-	-	-
	1/4	9 ± 0.2	-	-	-	-	-
	1/8	8 ± 0.1	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-	-	-
EtOAc	1/1	10 ± 0.1	-	14 ± 0.1	20 ± 0.1	-	-
	1/2	9 ± 0.2	-	10 ± 0.3	18 ± 0.4	-	-
	1/4	-	-	9 ± 0.1	17 ± 0.1	-	-
	1/8	-	-	-	17 ± 0.3	-	-
	1/16	-	-	-	16 ± 0.2	-	-
	1/32	-	-	-	14 ± 0.1	-	-
n-BuOH	1/1	-	-	10 ± 0.1	-	-	10 ± 0.1
	1/2	-	-	9 ± 0.1	-	-	9 ± 0.1
	1/4	-	-	8 ± 0.5	-	-	8 ± 0.1
	1/8	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-
	1/32	-	-	-	-	-	-

Values expressed are means ± SD of three measurements ($p < 0.05$). (-) No zones of inhibition around the discs. * Stock solution had the concentration of 1 g/L.

Previous studies conducted on the antibacterial activity of some species of the genus *Scabiosa* indicate that essential oils could be more active than crude extracts. The essential oils from *S. arenaria* were tested against 16 bacterial strains, and the results showed a moderate activity against *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* Enteritidis, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus* and *A. baumannii* [13], while the crude extracts obtained from *S. columbaria* have no antimicrobial activity on all the tested strains [40]. The antibacterial activity observed in the tested extracts could be due to different classes of secondary metabolites purified and identified previously including flavonoids, saponins, triterpenoids and sterols, known for their antimicrobial activities [41-43].

CONCLUSION

The present study reported the biological evaluation of *Scabiosa stellata* L. growing in Algeria. The phytochemical screening of crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) of this species indicates the presence of various classes of bioactive compounds known for their antibacterial, anticholinesterase, hemolytic and cytotoxic activities. *n*-BuOH and EtOAc extracts contain chemical compounds with hemolytic effect on human erythrocytes that may have serious adverse effects on health by inducing hemolytic anemia. Therefore, the prudent use of the species *S. stellata* is recommended.

However, more detailed phytochemical investigation is required to isolate and identify the pure bioactive compounds present in the different extracts of the species *S. stellata* (PE, EtOAc and *n*-BuOH), and to elucidate their mechanism of action. Furthermore, it can be concluded that *S. stellata* extracts could be used as a good source of alternative natural products helpful in preventing or slowing the neurodegenerative diseases and as a source of antibacterial and antiproliferative compounds

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express thanks to the DGRSDT of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant (Project 8/u05/853) and the CRBT Constantine for providing research facilities and technical support.

REFERENCES

- [1] Nobili, S.; Lippi, D.; Witort, E.; Donnini, M.; Bausi, L.; Mini, E.; Capaccioli, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.*, **2009**, *59*, 365-378.
- [2] Uttara, B.; Singh, A.V.; Zamboni, P.; Mahajan, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr neuropharmacol.*, **2009**, *7*, 65-74.
- [3] Mohammedi, Z.; Atik, F. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *Int J Pharm Sci Res.*, **2014**, *5*, 8495-8504.
- [4] Carlson, S.E.; Linder, H.P.; Donoghue, M.J. The historical biogeography of *Scabiosa* (Dipsacaceae): implications for Old World plant disjunctions. *J. Biogeogr.*, **2012**, *39*, 1086-1100.
- [5] Bonet, M.À.; Parada, M.; Selga, A.; Valles, J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.*, **1999**, *68*, 145-168.
- [6] Bussmann, R.W.; Glenn, A.; Meyer, K.; Kuhlman, A.; Townesmith, A. Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **2010**, *6*, 1-10.
- [7] Bonet, M.À.; Valles, J. Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *110*, 130-147.
- [8] Hotta, M.; Ogata, K.; Nitta, A.; Hoshikawa, K.; Yanagi, M.; Yamazaki, K. *Useful plants of the world*, 1st ed.; Tokyo: Heibonsha LTD, **1989**.
- [9] Marhuenda-Requena, E.; Saenz-Rodriguez, M.T.; Garcia-Gimenez, M.D. A contribution to the pharmacodynamic study of *Scabiosa atropurpurea* L.I. Analgesic and antipyretic activity. *Plant. Med. Phytoter.*, **1987**, *21*, 47-55.
- [10] Kupeli, E.; Orhan, I.; Yesilada, E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine for their anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Pharm. biol.*, **2007**, *45*, 547-555.
- [11] Hlila, M.B.; Mosbah, H.; Majouli, K.; Msaada, K.; Jannet, H.B.; Aouni, M.; Selmi, B. α -Glucosidase inhibition by Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. extracts. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *77*, 383-389.
- [12] Hlila, M.B.; Mosbah, H.; Msaada, K.; Jannet, H.B.; Aouni, M.; Selmi, B. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Ind. Crops. Prod.*, **2015**, *67*, 62-69.
- [13] Besbes, M.; Omri, A.; Cheraif, I.; Daami, M.; Jannet, H.B.; Mastouri, M.; Aouni, M.; Selmi, B. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Scabiosa arenaria* Forssk. growing Wild in Tunisia. *Chem. Biodivers.*, **2012**, *9*, 829-839.
- [14] Ma, J.N.; Bolraa, S.; Ji, M.; He, Q.Q.; Ma, C.M. Quantification and antioxidant and anti-HCV activities of the constituents from the inflorescences of *Scabiosa comosa* and *S. tschilliensis*. *Nat. Prod. Res.*, **2016**, *30*, 590-594.
- [15] Wang, J.; Liu, K.; Xu, D.; Wang, Q.; Bi, K.; Song, Y.; Li, J.; Zhang, L. Rapid micropropagation system *in vitro* and antioxidant activity of *Scabiosa tschilliensis* Grunning. *J. Plant. Growth. Regul.*, **2013**, *69*, 305-310.
- [16] Quezel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales; Paris: In CNRS (Ed), **1963**.
- [17] Boulos, L. Endemic flora of the middle east and North Africa. Review in ecology: *Desert Conservation and Development. Metropole, Cairo*, **1997**; pp. 229-260.
- [18] Wannes, W.A.; Marzouk, B. Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes. *J. Acute. Dis.*, **2016**, *5*, 357-363.
- [19] Bammi, J.; Douira, A. Medicinal plants in the forest of Achach (central plateau, Morocco). *J. Acta. Bot. Mal.*, **2002**, *27*, 131-145.
- [20] Farnsworth, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. *J. Pharm. Sci.*, **1966**, *55*, 225-276.
- [21] Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant. Res.*, **1982**, *45*, 31-34.
- [22] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, Jr.V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-95.
- [23] Kumar, G.; Karthik, L.; Rao, K.V.B. Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an *in vitro* study. *Elixir. Appl. Botany.*, **2011**, *40*, 5534-5537.

- [24] Medini, F.; Fellah, H.; Ksouri, R.; Abdelly, C. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *J. Taibah. Univ. Sci.*, **2014**, *8*, 216-224.
- [25] Bahadori, M.B.; Valizadeh, H.; Asghari, B.; Dinparast, L.; Bahadori, S.; Moridi, F.M. Biological activities of *Salvia santolinifolia* Boiss. A multifunctional medicinal plant. *Curr. Bioact. Compd.*, **2016**, *12*, 297-305.
- [26] Lehbili, M.; Magid, A.A.; Hubert, J.; Kabouche, A.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Renault, J.H.; Nuzillard, J.M.; Morjani, H.; Abedini, A.; Gangloff, S.C.; Kabouche, Z. Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities. *Fitoterapia.*, **2018**, *125*, 41-48.
- [27] Lehbili, M.; Magid, A. A.; Kabouche, A.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Morjani, H.; Harakat, D.; Kabouche, Z. Triterpenoid saponins from *Scabiosa stellata* collected in North-eastern Algeria. *Phytochemistry.*, **2018**, *150*, 40-49.
- [28] Rahmouni, N.; Pinto, D.C.; Santos, S.A.; Beghidja, N.; Silva, A.M.; Lipophilic composition of *Scabiosa stellata* L.: an underexploited plant from Batna (Algeria). *Chem. Pap.*, **2018**, *72*, 753-762.
- [29] Clarkson, C.; Maharaj V.J.; Crouch N.R.; Grace O.M.; Pillay, P.; Matsabisa, M.G.; Bhagwandin, N.; Smith, P.J.; Folb, P.I. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *J. Ethnopharm.*, **2004**, *92*, 177-191.
- [30] Zong, J.; Wang, R.; Bao, G.; Ling, T.; Zhang, L.; Zhang, X.; Hou, R. Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *camellia oleifera* abel. show anti-proliferative activity against tumor cells. *Fitoterapia.*, **2015**, *104*, 7-13.
- [31] Cheng, L.; Xia, T.S.; Wang, Y.F.; Zhou, W.; Liang, X.Q.; Xue J.Q.; Shi, L.; Wang, Y.; Ding, Q. The apoptotic effect of d rhamnose β -hederin, a novel oleanane-type triterpenoid saponin on breast cancer cells. *PLoS. One.*, **2014**, *9*, 90848.
- [32] Gidaro, M.C.; Alcaro, F.; Carradori, S.; Costa, G.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Alcaro, S. Eriocitrin and apigenin as new carbonic anhydrase VA inhibitors, from a virtual screening of Calabrian natural products. *Planta. Med.*, **2015**, *81*, 533-540.
- [33] Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S.L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*, 359-363.
- [34] Sz wajgier, D. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids—interaction testing in model solutions. *Ann. Agr. Env. Med.*, **2015**, *22*, 690-694.
- [35] Noudeh, G.D.; Shariffar, F.; Khatib, M.; Behravan, E.; Afzadi, M.A. Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane—permeabilizing and their surface properties. *Afr. J. Biotechnol.*, **2010**, *9*, 110-116.
- [36] Sharma, O.P.; Kumar, N.; Singh, B.; Bhat, T.K. An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins. *Food. chem.*, **2012**, *132*, 671-674.
- [37] Voutquenne, L.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Men-Olivier, L.L. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharm. Biol.*, **2002**, *40*, 253-262.
- [38] Zhang, Q.; Mao, Z.; Zhang, Q.; Qiu, J.; Jia, Z. Acute and sub-chronic toxicological studies of the iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2018**, *92*, 315-323.
- [39] Wang, M.; Guo, Q.; Xu, X.; Wang, X.; Ye, X.; Wu, S.; Hooper, D.C.; Wang, M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2009**, *53*, 1892-1897.
- [40] Benli, M.; Bingol, U.; Geven, F.; Guney, K.; Yigit, N. An investigation on the antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, **2008**, *7*, 1-5.
- [41] Najafi, S. Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. *Int. Res. J. Appl. Basic. Sci.*, **2013**, *4*, 3274-3276.
- [42] Singh, B.A.; Sharma, R. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of flavonoids from *Heliotropium ellipticum* exudate. *Curr. Bioact. Compd.*, **2016**, *12*, 123-131.
- [43] Popova, V.; Gochev, V.; Girova, T.; Iliev, I.; Ivanova, T.; Stoyanova, A. Extraction products from Tobacco—Aroma and bioactive compounds and activities. *Curr. Bioact. Compd.*, **2015**, *11*, 31-37.

ملخص

يهدف هذا البحث الى دراسة التركيب الكيميائي وتقييم الأنشطة البيولوجية لكافة المستخلصات العضوية (أثير البترول، خلات الايثيل والبولتانول) التي تم الحصول عليها انطلاقا من نبات *Scabiosa stellata* و ذلك من خلال اختبار كل من السمية الحادة، التأثيرات المضادة للالتهاب والحمى في الجسم الحي و تقييم النشاط المضاد للأكسدة، التأثير المضاد للالتهاب المفاصل، السمية الخلوية، النشاطات المضادة لإنزيم الكولينستريز، الأنشطة المحللة للدم والمضادة للبكتيريا في المختبر.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الخام بثمانية طرق مختلفة بينما تم تنفيذ النشاط المضاد للالتهاب المفاصل بواسطة طريقة فقدان بنية مصلى ألبومين الثور. اما بالنسبة للسمية الخلوية، النشاط المثبط لانزيم الكولينستريز و النشاط الانحلالي للدم فقد تم اختبارها بطرق Ellman، البرين شريمب اللونية و طريقة الطيف الضوئي باستعمال كريات الدم الحمراء البشرية على التوالي. علاوة على ذلك، فقد تم تقدير النشاط المضاد للبكتيريا ضد عشر سلالات بكتيرية مختلفة، اختبار السمية الحادة والنشاط المضاد للالتهاب وفق نموذج carrageenan-induced paw edema) اما النشاط الخافض للحرارة فقد اختبر بنموذج brewer's yeast induced pyrexia (method) على فئران من سلالة Wistar.

كشفت الفحص الكيميائي لكافة المستخلصات عن وجود عدة أنواع من مركبات الايض الثانوي. ولقد سجل مستخلص خلات الإيثيل أعلى محتوى إجمالي لمتعددات الفينول، الفلافونويد، والذوابغ. جميع المستخلصات الخام (أثير البترول، استات الاليثيل والبولتانول) لديها أنشطة مضادة للأكسدة في مختلف الاختبارات التي اجريت و كذا لها قدرة على منع فقدان بنية الألبومين. لوحظ وجود سمية خلوية في المستخلص البولتانولي بتركيز LC_{50} مقدر ب $0,5 \pm 35,7$ ميكروغرام/مل، وظهر مستخلص خلات الإيثيل نشاط معتدل ضد انزيم الكولينستراز عند تركيز 200 ميكروغرام/مل. لقد حفز كل من مستخلصي البولتانولي و خلات الإيثيل على انحلال الدم بقيم EC_{50} مقدرة ب 37,25 و 106,57 ميكروغرام/مل على التوالي. بالنسبة لاختبار النشاط المضاد للبكتيريا فقد أظهرت النتائج ان جميع المستخلصات لها فعالية ضد معظم السلالات المختبرة، مع مناطق تثبيط تتراوح بين 9 و 20 ملم.

بينت نتائج اختبار السمية الحادة لمستخلص خلات الإيثيل بالتراكيز (500، 1000 و 2000 ملغ / كغ) على عدم ظهور أي أعراض تسمم أو وفيات للجرذان المختبرة و لم تتم ملاحظة أي تغييرات معتبرة في التحاليل البيوكيميائية والدموية مقارنة مع مجموعة المراقبة. لذلك و وفقا لما سبق فقد قدر تركيز الجرعة المميته الحادة التقريبية 50 لهذا المستخلص على أنها أعلى من 2000 ملغ/كغ. لقد أدت معالجة الجرذان بالمستخلص البيتانولي بنفس التراكيز الى ظهور أعراض تسمم و وفاة كافة الحيوانات المعالجة بجرعة (2000 ملغ/كغ)، كما تم تسجيل زيادة معتبرة في نسب التحاليل البيوكيميائية بما في ذلك (ALAT، ASAT، الكوليسترول، الدهون الثلاثية الكرياتينين واليوريا) ولوحظ وجود تغير كبير في التحاليل الدموية مقارنة مع مجموعة المراقبة في كل من المجموعتين المعالجتين بالتراكيز 500 و 1000 ملغ/كغ. اكد الفحص النسيجي للكبد والكلى والرتنين على وجود علامات تسمم، لذلك قدرت الجرعة المميته الحادة التقريبية 50 من هذا المستخلص بأكثر من 500 ملغ/كغ.

أدى إعطاء مستخلص خلات الإيثيل بجرعات 50 و 75 ملغ/كغ الى نشاط مضاد للالتهابات أعلى من ديكلوفيناك كدواء مرجعي. كما أظهرت معالجة الجرذان بالمستخلص البولتانولي (50 و 75 ملغ/كغ) إلى خفض معتبر في درجة الحرارة خلال جميع مراحل الاختبار مقارنة بالدواء المرجعي (البراسيتامول).

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص البولتانولي الى عزل و تحديد البنية الهيكلية لاثنتان من الصابونينات، و ذلك من خلال استعمال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (VLC، CC و TLC) و كذلك بواسطة استخدام طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين النووي المغناطيسي بجميع أنواعها، مطيافية الكتلة و المقارنة مع الدراسات السابقة .

الكلمات المفتاحية: *Scabiosa stellata*، أنشطة مضادة للأكسدة، النشاط المضاد للالتهاب، السمية الحادة، النشاط المضاد للحمى،

السمية الخلوية، نشاط مضاد للجراثيم، النشاط المثبط لانزيم الكولينستريز، الصابونيات، RMN.

Résumé

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités biologiques des extraits bruts (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol) obtenus à partir de la plante *Scabiosa stellata*; *in vivo* (toxicité aiguë, l'activité anti-inflammatoire et antipyrétique) et *in vitro* (activité antioxydante, antiarthritique, cytotoxique, anticholinestérase, hémolytique et antibactérienne).

L'activité antioxydante a été évaluée par huit méthodes différentes, l'activité antiarthritique a été réalisée par la méthode d'inhibition de la dénaturation du sérum d'albumine bovine, la cytotoxicité a été testée par la méthode de *Brine shrimp*, l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase a été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman, l'activité hémolytique a été évaluée spectrophotométriquement vis-à-vis des érythrocytes humains et l'activité antibactérienne des extraits a été estimée par la méthode de diffusion sur disques agar contre dix souches bactériennes. Cependant, La toxicité aiguë, l'activité anti-inflammatoire par le modèle d'œdème de la patte induit par la carragénine et l'activité antipyrétique par la méthode de pyrexie induite par la levure de bière ont été testées sur des rats *Wistar*.

Le criblage phytochimique des extraits a révélé la présence de plusieurs types de métabolites secondaires. L'extrait acétate d'éthyle possède la teneur la plus élevée en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Tous les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont des activités antioxydantes dans divers systèmes et empêchent la dénaturation du sérum d'albumine bovine d'une manière dose-dépendante. Un effet cytotoxique significatif a été observé dans l'extrait *n*-BuOH avec une CL₅₀ de 35,7 ± 0,5 µg/mL, l'extrait acétate d'éthyle présentait une activité anticholinestérase modérée à 200 µg/mL. Le test hémolytique a montré que les extraits (*n*-BuOH et AcOEt) induisent une hémolyse d'une manière dose-dépendante avec des valeurs de CE₅₀ à 37,25 ± 0,52 et 106,57 ± 0,28 µg/mL respectivement. Tous les extraits bruts ont une activité antibactérienne contre la plupart des souches testées avec des zones d'inhibition allant de 9 à 20 mm.

L'administration par voie orale de l'extrait acétate d'éthyle à différentes concentrations (500, 1000 et 2000 mg/kg) n'entraîne aucun symptôme toxique ni mortalités chez tous les animaux traités. Aucune modification significative des paramètres biochimiques et hématologiques par rapport au groupe témoin n'a été observée. Par conséquent, la dose létale aiguë 50 approximative de cet extrait a été estimée supérieure à 2000 mg/kg. Toutefois, l'administration orale de l'extrait *n*-BuOH aux mêmes concentrations induit des symptômes toxiques et la mortalité de tous les animaux traités à la dose de 2000 mg/kg. Une augmentation significative des taux des paramètres biochimiques incluant (ALAT, ASAT, cholestérol, triglycérides, créatinine et urée) et une altération remarquable des paramètres hématologiques par rapport au groupe témoin ont été observés dans les deux groupes ayant survécu (500 et 1000 mg / kg). L'examen histologique du foie, des reins et des poumons a confirmé les signes toxiques observés. Par conséquent, la dose létale aiguë 50 approximative de cet extrait a été estimée supérieure à 500 mg/kg.

L'administration de l'extrait acétate d'éthyle à des doses de 50 et 75 mg/kg prévient l'œdème aigu de la patte et présente une activité anti-inflammatoire supérieure à celle du diclofénac en tant que contrôle positif. L'administration orale de l'extrait *n*-BuOH à des doses de 50 et 75 mg/kg a diminué significativement la température corporelle pendant toutes les phases du test par rapport au médicament standard (paracétamol) administré à 50 mg/kg.

L'étude phytochimique de l'extrait *n*-BuOH obtenu à partir de l'espèce *Scabiosa stellata* L. a conduit à l'isolement et l'élucidation structurale de deux composés saponosidiques à savoir : Hederagenine 3-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1'''→3'')-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1''→2')-*O*-α-L-arabinopyranosyl] (1) et Hederagenine 3-*O*-[β-D-glucopyranosyl-(1''''→4''')-β-D-xylopyranosyl-(1'''→3'')-*O*-α-L-rham-nopyranosyl-(1''→2')-*O*-α-L-arabinopyranosyl] (2). Leur structures ont été identifiées par analyses spectroscopiques : RMN 1D et 2D (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et TOCSY) et par comparaison avec les données de la littérature.

Mots-clés : *Scabiosa stellata*, Activité antioxydante, Activité anti-inflammatoire, Activité antipyrétique, cytotoxicité, Activité antibactérienne, Activité anticholinestérase, Activité hémolytique, toxicité aiguë et saponosides ,RMN.

Summary

This study is devoted to the phytochemical investigation and the evaluation biological activities of crude extracts (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol) obtained from the species *Scabiosa stellata* *in vivo* (acute toxicity, anti-inflammatory and antipyretic effects) and *in vitro* (antioxidant, antiarthritic, cytotoxic, anti-cholinesterase, hemolytic and antibacterial activities).

the antioxidant activity was evaluated by eight different methods, the anti-arthritic activity was performed by bovine serum albumin denaturation method, cytotoxicity of crude extracts was tested by Brine shrimp lethality method; acetylcholinesterase inhibitory activity was performed using Ellman's colorimetric method and the hemolytic activity was evaluated spectrophotometrically towards human erythrocytes. Furthermore, the antibacterial activity was estimated by agar disk diffusion assay against ten bacterial strains. The acute oral toxicity, anti-inflammatory activity by the model of carrageenan-induced paw edema and antipyretic activity by brewer's yeast induced pyrexia method were tested on Wistar rats.

The phytochemical screening of crude extracts revealed the presence of several types of secondary metabolites. The ethyl acetate extract recorded the highest content of polyphenols, flavonoids, and tannins. All the crude extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) had antioxidant activities in various assays and prevent the denaturation of bovine serum albumin in dose depending manner. A significant cytotoxic effect was observed in the *n*-butanolic extract with an LC₅₀ of 35.7 ± 0.5 µg/mL, the EtOAc extract had a moderate anticholinesterase activity at 200 µg/mL. The hemolytic assay showed that the *n*-BuOH and EtOAc extracts induce hemolysis in dose dependent manner with values of EC₅₀ at 37.25 ± 0.52 and 106.57±0.28 µg/mL respectively. All the crude extracts showed antibacterial activity against most tested strains, with zones of inhibition ranging from 9 to 20 mm.

The oral administration of EtOAc at various concentrations (500, 1000 and 2000 mg/kg), does not induce any toxic symptoms or mortalities in all the treated animals. No significant changes in biochemical and hematological parameters compared to the control group were observed. Therefore, the approximate acute lethal dose 50 of this extract was estimated to be higher than 2000 mg/kg. However, the oral administration of the *n*-butanolic extract at the same concentrations, induce toxic symptoms and the mortality of all the treated animals with the dose of 2000 mg/kg. A significant increase in biochemical parameters including (ALAT, ASAT, cholesterol, triglycerides creatinine and uremia) and important alteration in the hematological parameters compared to the control group were observed in both survived groups (500 and 1000 mg/kg). The histological examination of the liver, kidney, and lungs confirmed the observed toxic signs. Therefore, the approximate acute lethal dose 50 of this extract was estimated to be higher than 500 mg/kg.

The administration of ethyl acetate extract at the doses of 50 and 75 mg/kg prevents significantly acute paw edema and presents a higher anti-inflammatory activity than diclofenac as a positive control. The oral administration of the *n*-butanolic extract at the doses of 50 and 75 mg/kg decreased significantly the body temperature during all phases of the test compared to the standard drug (Paracetamol) administered at 50 mg/kg.

The chemical composition of *n*-BuOH extract obtained from the species *Scabiosa stellata* L. led to the isolation and structural elucidation of two saponins namely Hederagenine 3-O-[β-D-xylopyranosyl-(1'''→3'')-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1''→2')-O-α-L-arabinopyranosyl] (1) and Hederagenine 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1''''→4''')-β-D-xylopyranosyl-(1'''→3'')-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1''→2')-O-α-L-arabinopyranosyl] (2). Their structures were identified by spectroscopic analysis: 1D and 2D NMR (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY) and by comparison with the literature data.

Keywords : *Scabiosa stellata*, Antioxidant activity, anti-inflammatory activity, acute toxicity, antipyretic activity, cytotoxicity, antibacterial activity, cholinesterase inhibitory activity, saponins, NMR.