



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

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité
Biologique

MEMOIRE

En vue de l'obtention du
Diplôme de MASTER EN BIOLOGIE

Option : Biochimie

Présenté par :

Lakhal Hafsa

Thème

**Etude phytochimique et recherche d'activité
antioxydante des extraits enrichis en polyphénols des
feuilles d'*Inula viscosa***

Soutenu le : 21 / 06 / 2020 devant le jury :

Président	Mr. LAHFA Farid Boucif	Pr.	Université de Tlemcen
Examinatrice	M ^{elle} MEZOUAR Dounia	MCB	Université de Tlemcen
Encadreur	Mr. AZZI Rachid	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Au début je remercie Allah, le tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience.

*Je voudrais dans un premier temps remercier, mon encadreur **Mr. Azzi Rachid**, maître de conférence classe «A », au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, pour sa disponibilité, sa patience, ses grands efforts et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à réussir ce travail .*

Je remercie également, les membres de jury :

***Mr Lahfa Farid Boucif**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

***M^{elle} Mezouar Dounia**, maitre de conférences classe « B » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid , d'avoir acceptée d'examiner ce mémoire.*

*Un grand remerciement à **M^{elle} Abbou Fayza**, doctorante en biologie, pour ses précieux conseils, qui ont m'aider à réaliser la pratique de ce travail.*

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui ma doté d'une éducation digne, son amour a faite de moi ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement à ma mère, je voudrais remercier pour ton amour, ton soutien, ta compréhension...

A mon cher père et mes frères Mohammed et Youcef .

A mes amis : Samira, Wafaa, Ahlem, Imene et Bouchra.

الملخص

تعتبر *Inula viscosa*، من عائلة النجمية واحدة من أكثر النباتات الطبية استخداما في الطب التقليدي في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط (الجزائر، المغرب..). تعرف شعبيا باسم ماقرامان.

يهدف هذا العمل إلى الدراسة الكيميائية النباتية، معايرة المركبات الفينولية و تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبارات تثبيط الجذر الحر DPPH، تثبيط الجذر الحر الموجب ABTS⁺ وإرجاع الحديد FRAP للمستخلص الخام مائي ميثانولي، جزؤه أسيتات الإيثيل العضوي و الجزء المائي المتبقي. المحضرة بطريقة النقع الساخن متبوعة بالنقع لأوراق الماقرامان .

أظهرت نتائج الفحص الكيميائي وجود التانينات، الفلافونويد، الكينونات الحرة، التربينويد و القلويدات، و غياب السابونين و الأنثراكينونات.

كما وضحت معايرة المركبات الفينولية وجود مركبات الفلافونويد و البوليفينول في جميع المستخلصات المدروسة بكميات مختلفة من مستخلص إلى آخر. حيث سجلت أعلى محتويات البوليفينول و الفلافونويد بواسطة جزء أسيتات الإيثيل على التوالي 47±518 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ميليغرام مستخلص و 104,2±491,9 ميكروغرام مكافئ كاتشين لكل ميليغرام مستخلص.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للجذور الحرة من خلال اختبار DPPH و اختبار ABTS أن مستخلصات هذا النبات تمتلك نشاط مضاد للجذور الحرة جد مهم مع قيم CI_{50} على التوالي $0,015 \pm 0,25$ ملغ / مل بالنسبة لتثبيط DPPH و $0,012 \pm 0,16$ ملغ / مل بالنسبة لتثبيط ABTS⁺.

تم تسجيل أفضل قدرة لإرجاع الحديد (FRAP) بواسطة الجزء المائي المتبقي مع EC_{50} بحوالي $0,006 \pm 0,248$ ملغ / مل. لا يزال هذا النشاط أقل بكثير مقارنة بحمض الأسكوربيك ($EC_{50}=0,002$ ملغ / مل).

الكلمات المفتاحية: *Inula viscosa*، DPPH، ABTS، FRAP، الفحص الكيميائي، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

L'Inule visqueuse (*Inula viscosa*), de la famille des astéracées, est considérée comme l'une des plantes médicinales les plus fréquentes et les plus utilisées en médecine traditionnelle dans la région du bassin méditerranéen (Algérie, Maroc..). Elle est connue populairement sous le nom de Magramane.

Ce travail porte sur l'étude des tests phytochimiques, dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*, par les tests du piégeage du radical libre DPPH[·], piégeage du radical cation ABTS^{·+} et le pouvoir réducteur de fer FRAP, d'extrait brut eau-méthanol, sa fraction organique acétate d'éthyle et la phase aqueuse résiduelle, préparés par infusion suivi d'une macération des feuilles d'*Inula viscosa*.

Les résultats de screening phytochimique, ont révélé la présence des tanins, des flavonoïdes, des quinones libres, des terpénoïdes et des alcaloïdes, et l'absence des saponines et des anthraquinones.

Le dosage des composés phénoliques, a montré la présence des flavonoïdes et des polyphénols dans tous les extraits étudiés avec des quantités variables d'un extrait à un autre. Les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes, ont été enregistrées par la fraction acétate d'éthyle ($518 \pm 47 \mu\text{g EAG/ mg E}$ et $491,9 \pm 104,2 \mu\text{g EC / mg E}$, respectivement).

L'étude de l'activité anti-radicalaire par le test de DPPH[·] et le test d'ABTS^{·+}, a montré que les extraits de cette plante présente une activité anti-radicalaire importante avec des CI_{50} d'ordre de $0,25 \pm 0,015 \text{ mg/ml}$ pour l'inhibition du DPPH[·] et d'ordre de $0,16 \pm 0,012 \text{ mg/ml}$ pour l'inhibition d'ABTS^{·+}.

Un meilleur pouvoir réducteur de fer (FRAP) a été enregistré par la phase résiduelle aqueuse avec une EC_{50} d'ordre de $0,248 \pm 0,006 \text{ mg/ml}$. Cette activité reste largement inférieure par rapport à l'acide ascorbique ($EC_{50} = 0,002 \text{ mg/ml}$).

Mots clés : *Inula viscosa*, DPPH, ABTS, FRAP, Screening phytochimique, composés phénoliques, Activité antioxydante.

Abstract

Sticky fleabane (*Inula viscosa*), of the asteraceae family, is considered to be one of the most frequent and most used medicinal plants in traditional medicine in the region of the Mediterranean basin (Algeria, Morocco, etc.). It is popularly known as Magramane.

This work concerns the study of phytochemical tests, dosage of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity, *in vitro*, by scavenging of the free radical DPPH \cdot , by scavenging of the cation radical ABTS $^{+\cdot}$ and iron-reducing power FRAP tests, of crude water-methanol extract, its organic ethyl acetate fraction and the residual aqueous phase, prepared by infusion followed by maceration of the leaves of *Inula viscosa*.

The results of phytochemical screening revealed the presence of tannins, flavonoids, free quinines, terpenoids and alkaloids, and the absence of saponins and anthraquinones.

The dosage of phenolic compounds has shown the presence of flavonoids and polyphenols in all extracts studied with varying amounts from one extract to another. The highest contents of polyphenols and flavonoids were recorded by the ethyl acetate fraction ($518 \pm 47 \mu\text{g EAG/mg E}$ and $491,9 \pm 104,2 \mu\text{g EC / mg E}$, respectively).

The study of the anti-radical activity by the DPPH test and the ABTS test, showed that the extracts of this plant has an important anti-radical activity with IC₅₀ of the order of $0,25 \pm 0,015 \text{ mg/ml}$ for the inhibition of DPPH \cdot and in the order of $0,16 \pm 0,012 \text{ mg/ml}$ for the inhibition of ABTS $^{+\cdot}$.

Better iron-reducing power (FRAP) was recorded by the residual aqueous phase with an EC₅₀ of about $0,248 \pm 0,006 \text{ mg/ml}$. This activity remains largely lower compared to ascorbic acid (EC₅₀ = $0,002 \text{ mg/ml}$).

Key words: *Inula viscosa*, DPPH, ABTS, FRAP, phytochemical screening, Phenolic compounds, Antioxidant activity.

Table de matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Stress oxydant	
1. Les radicaux libres.....	03
2. Les oxydants (pro-oxydants)	03
2.1. Les espèces réactives de l'oxygène « ERO »	03
2.2. Les espèces réactives de l'azote « ERN »	05
2.3. Les oxydants chlorés « HOCl »	05
3. Le stress oxydant	06
4. Les antioxydants	07
5. Classification des antioxydants	07
5.1. Les antioxydants enzymatiques	07
5.2. Les antioxydants non enzymatiques	08
6. Les composés phénoliques	09
6.1. Les acides phénoliques	10
6.2. Les flavonoïdes	10
6.3. Les tanins	11
Chapitre 2 : Plante étudiée (<i>Inula viscosa</i>)	
1. Description botanique	13
2. Noms vernaculaires	13
3. Classification botanique	14
4. Distribution	14
5. Usages thérapeutiques	14
6. Composition chimique	15

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal	16
2. Préparation des extraits	16
2.1. Extrait brut hydrométhanolique	16
2.2. Fractionnement par acétate d'éthyle	17
2.3. Le rendement d'extraction	17
3. Screening phytochimique	17
3.1. Les composés azotés	18
3.2. Les composés phénoliques	18
3.3. Les composés terpéniques	19
4. Dosage des composés phénoliques	19
4.1. Dosage des polyphénols totaux	19
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	20
5. Recherche d'activité antioxydante des extraits des feuilles <i>d'Inula viscosa</i>	21
5.1. Piégeage du radical DPPH	21
5.2. Test d'ABTS	22
5.3. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)	23
6. Analyses statistiques	24
Résultats et interprétations	
1. Caractéristiques des extraits étudiés	25
2. Screening phytochimique	25
3. Dosage des composés phénoliques	26
4. Recherche de l'activité antioxydante des extraits des feuilles <i>d'Inula viscosa</i>	28
4.1. Piégeage du radical DPPH	28
4.2. Test d'ABTS	31
4.3. Pouvoir réducteur de fer FRAP	34
Discussion	37
Conclusion et perspectives	40
Références bibliographiques	41

Liste des abréviations

8-OH-dG : La 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.

ABTS : acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

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

EB : Extrait brut.

EC50(CI₅₀) : Concentration inhibitrice à 50%.

ERN : Espèces réactives de l'azote.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FAE : Fraction acétate d'éthyle.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HOCL : Hypochlorite.

NO[·] : Oxyde nitrique.

O₂^{·-} : Superoxyde.

OH[·] : Hydroxyle.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

PR : Phase résiduelle.

ROO[·] : Radicaux peroxydes.

SOD : Superoxydes dismutases.

v/v : volume sur volume.

µg EAG/ mg E : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

µg EC / mg E : Microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait.

Liste des figures

Figure 1: Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO), de l'azote (ERN) et du chlore (HOCl).	06
Figure 2: Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.	10
Figure 3: Squelette de base des flavonoïdes.	11
Figure 4: Structure des tanins hydrolysables et des tanins condensés	12
Figure 5: Les feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	13
Figure 6: Tiges et feuilles d' <i>Inula viscosa</i> séchées.	16
Figure 7 : Feuilles d' <i>Inula viscosa</i> découpées et séchées.	16
Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	27
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.	27
Figure 10 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.	29
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait brut eau- méthanol des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	29
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	30
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de phase aqueuse résiduelle des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	30
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS ^{·+} en fonction des différentes concentrations du Trolox.	31
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS ^{·+} en fonction des différentes concentrations d'extrait brut eau- méthanol des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	32
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS ^{·+} en fonction des différentes concentrations de la fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	32
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS ^{·+} en fonction des différentes concentrations de la phase résiduelle aqueuse des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	33
Figure 18 : Pouvoir réducteur de fer en présence de l'acide ascorbique.	34
Figure 19 : Pouvoir réducteur de fer d'extrait brut eau- méthanol des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	34
Figure 20 : Pouvoir réducteur de fer de la fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	35
Figure 21 : Pouvoir réducteur de fer de la phase résiduelle aqueuse des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	25
Tableau 2 : Le screening phytochimique des trois extraits préparés des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	26
Tableau 3 : Teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	28
Tableau 4 : Valeurs CI ₅₀ des extraits préparés des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	31
Tableau 5 : Valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	33
Tableau 6 : Les valeurs d'EC ₅₀ des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	36

Introduction

Depuis quelques années, nous observons un regain d'intérêt pour la phytothérapie, ce qui explique l'importance des plantes médicinales pour le traitement de différentes pathologies (**OMS, 2007**). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 11% sur 252 médicaments considérés comme essentiels, sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales (**Rates, 2001**). Elles sont utilisées par ingestion interne ou application externe sous forme de gélules, teintures, alcoolats, tisanes, et d'extraits (**Létard et al., 2015**).

Le monde végétal est considéré comme la source majeure de médicaments, grâce à la richesse en molécules dites métabolites secondaires (**Eddouks et al., 2007**). Ce sont des composés synthétisés naturellement par les végétaux (**Guillaume et Charrouf, 2005**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins..) sont parmi ces principaux métabolites secondaires, qui se trouvent partout dans le règne végétale. Ce sont des substances ayant un ou plus d'un groupe hydroxyle phénolique, lié à un ou plusieurs systèmes cycliques benzéniques. Ils possèdent plusieurs activités biologiques dont l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne (**Vermerris et al., 2006 ; Zillich et al., 2015**).

De plus, de nombreuses études ont démontré que ces composés sont des piègeurs efficaces des espèces réactives d'oxygène (**Duthie et Crozier, 2000**).

Le stress oxydant est un déséquilibre, entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes. Il survient soit par une production de radicaux libres accrue par rapport aux capacités antioxydantes intactes, soit par un état déficient des antioxydants, soit ces deux situations cumulées (**Ahmad, 1995**).

Inula viscosa L. Ait, de la famille des astéracées, est une plante vivace distribuée dans le bassin méditerranéen (**Brullo et Marco, 2000**). En médecine traditionnelle, cette plante a de nombreuses utilisations : anthelminthiques (**Al-Qura'n, 2009**), anti-inflammatoires (**Barbetti, 1985**), antipyrétiques, activités antiphlogistiques et antiseptiques (**Lauro et Rolih, 1999 ; Lev et Amar, 2000**). De plus, leurs extraits possèdent des propriétés antioxydantes et antivirales (**Abad et al., 2000 ; Schinella et al., 2002**).

De notre part, nous nous sommes intéressés, aux screening phytochimiques, dosages des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) et la recherche d'activité antiradicalaire (piégeage du radical DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl, et piégeage du radical cationique ABTS⁺ : acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et antioxydante (pouvoir réduction du Fer : FRAP), d'extrait hydrométhanolique, sa fraction

Introduction

organique d'acétate d'éthyle et la phase aqueuse résiduelle enrichis en polyphénols, des feuilles séchées d'*Inula viscosa* L., récoltées dans la région de Tlemcen.

Synthèse
bibliographique

Chapitre 1 :
Stress oxydant

1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des entités moléculaires ayant un électron célibataire au niveau de l'orbitale électronique périphérique d'un atome (**Kohen et Nyska, 2002 ; Klein et Ackerman, 2003**).

Ils sont fortement réactifs et instables et peuvent être neutres ou chargés. Ils sont caractérisés, également, par une durée de vie extrêmement courte (10^{-11} à 10^{-9} s) (**Yoshikawa et Naito, 2002 ; Carrière et al., 2006**).

Chaque jour environ 10 000 à 20 000 radicaux libres attaquent chaque cellule. Certains ayant des effets bénéfiques : ils aident le corps à contrôler les muscles lisses, à éliminer des bactéries et à combattre l'inflammation. D'autres, si leurs productions ne sont pas contrôlées, causent : le diabète sucré, le cancer, la maladie de parkinson, le vieillissement et l'Alzheimer (**Pala et Gurkan, 2008**).

Ces radicaux ont des sources internes qui peuvent être un produit des réactions enzymatiques, comme les réactions impliquées dans la phagocytose, dans la chaîne respiratoire, dans la synthèse de prostaglandine et dans le système du cytochrome P450. Certaines sources internes de production des radicaux libres sont la xanthine oxydase, mitochondrie, phagocytes, peroxyosomes, exercice, inflammations (**Kumar, 2011**). Ils ont également des sources exogènes comme les solvants organiques, les pesticides, la fumée de tabac, les anesthésiques et certains polluants (**Machlin et Bendin, 1987**).

2. Les oxydants (pro-oxydants)

Les pro-oxydants sont des molécules chimiques qui induisent un stress oxydant, soit en inhibant les systèmes antioxydants, soit en générant des espèces réactives de l'oxygène (**Puglia et al., 1984**). Ils sont très instables et attaquent toutes les substances chimiques qu'elles entrent en contact (**Agarwal et Allamaneni, 2004**).

On distingue 3 familles d'oxydants qui sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les espèces réactives de l'azote (ERN) et les oxydants chlorés (HOCl) (**Morena et al., 2002**).

2.1. Les espèces réactives de l'oxygène « ERO »

La réduction univalente de l'oxygène a pour conséquence la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont font partie les radicaux libres (radical hydroxyle, anion superoxyde) et le peroxyde d'hydrogène. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques

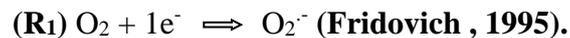
pour l'organisme car elles peuvent induire des cassures au sein de l'ADN, dégrader les sucres, et inactiver les protéines (Pincemail et al., 1999).

2.1.1. Types des ERO

- **Le superoxyde $O_2^{\cdot-}$**

L'oxygène a la capacité d'accepter un électron supplémentaire pour créer le superoxyde (Raha et Robinson, 2000) (R₁). C'est le précurseur de la plupart des autres espèces réactives de l'oxygène. Il est impliqué dans la propagation des réactions oxydantes en chaîne (Turrens, 2003).

Le superoxyde peut être formé lors du métabolisme de l'oxygène dans la chaîne respiratoire mitochondriale ou par voie enzymatique telle que : xanthine oxydase, NADPH oxydase, ou par les réactions d'auto-oxydation non enzymatiques (Jaisson et al., 2017).



- **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le H_2O_2 est plus stable que le superoxyde (Oueslati, 2017). Il résulte d'une dismutation spontanée ou enzymatique d' $O_2^{\cdot-}$. Il est très lipophile et a la capacité de traverser les biomembranes (Halliwell et al., 2000) (R₂).



- **L'hydroxyle OH^{\cdot}**

Le radical OH^{\cdot} est formé par réaction de H_2O_2 avec Fe^{++} (réaction de Fenton) ainsi que par radiolyse de l'eau (Mohan, 2010). Il est très réactif et réagit très rapidement avec presque toutes les molécules cellulaires tels que : les acides aminés, l'ADN, les sucres, et les phospholipides (Vergely et al., 2003).

2.1.2. Les cibles biologiques des ERO

➤ **L'ADN**

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) résulte de l'interaction entre l' OH^{\cdot} et la guanine. La (8-OH-dG), au lieu de s'apparier avec la cytosine, elle associera avec l'adénine, ce qui provoque des mutations au sein de l'ADN et conduit à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du vieillissement ainsi que du cancer (Haleng et al., 2007).

➤ Les protéines

Des dérivés protéiques carbonylés se forment à partir des altérations des structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par les ERO, par plusieurs mécanismes tels que l'oxydation et la fragmentation des acides aminés (Pincemail et al., 1999). La plupart des protéines oxydées sont rapidement éliminées par protéolyse sous l'action du protéasome (Friguet et al., 2000).

2.2. Les espèces réactives de l'azote ERN

• L'oxyde nitrique (NO[·])

Le NO[·] est un radical réactif abondant qui agit comme une molécule de signalisation biologique oxydante importante dans la neurotransmission, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses, etc (Bergendi et al., 1999). Il a des effets sur la transmission neuronale et sur la plasticité synaptique dans le système nerveux central (Valko et al., 2007).

Leur production dans les tissus biologiques, est assurée par des NO synthases spécifiques qui assurent le métabolisme de l'arginine en citrulline avec la formation de NO[·] via une réaction oxydative à 5 électrons (Ghafourifar et Cadenas, 2005).

• Le peroxyde nitrite ONOO[·]

Le peroxyde nitrite est un puissant oxydant formé à partir de superoxyde et d'oxyde nitrique. Il est plus réactif que ses précurseurs (NO[·], O₂^{·-}) (Bartosz, 1996 ; Alvarez et Radi, 2003).

Le peroxyde nitrite réagit avec différentes biomolécules appropriées et provoque une scission des brins d'ADN, induit la peroxydation des lipides, oxyde la cystéine, les résidus de méthionine, de lysine et de l'histidine (Koppenol et al., 1992 ; Kelm et al., 1997 ; Demirürek et al., 1998). Il est également impliqué dans plusieurs maladies tels que : les troubles neurodégénératifs, l'athérosclérose, etc (Alvarez et Radi, 2003).

2.3. Les oxydants chlorés « HOCl »

La production d'espèces activées du chlore, est assurée par les cellules impliquées dans la phagocytose (granulocytes et monocytes) contenant la myéloperoxydase qui utilise l'anion chlorure et le peroxyde d'hydrogène pour former l'hypochlorite HOCl (Vamecq et al., 2004).

HOCl, est un oxydant puissant. Il a la capacité de chlorer et d'oxyder plusieurs molécules (Klebanoff, 1999).

- Un stress léger qui induit l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion et de la prolifération cellulaire ;
- Un stress moyen qui facilite l'apoptose ;
- Un stress fort qui cause une nécrose ;
- Un stress violent qui induit une désorganisation de la membrane et provoque des lyses immédiates.

D'autres perturbations biologiques apparaîtraient à la suite d'un stress oxydatif : anomalies de récepteurs, diminution de la fluidité membranaire, perturbation de l'immunité cellulaire et affaiblissement musculaire. Il entraîne également plusieurs anomalies pathologiques : fibrose, carcinogénèse, mutations, malformations des fœtus... (**Favier et al., 1995**).

4. Les antioxydants

Un antioxydant est toute molécule capable de désactiver ou de stabiliser les radicaux libres avant d'attaquer les cellules (**Sisein, 2014**).

5. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs natures en :

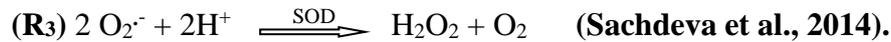
- Antioxydants enzymatiques : incluent la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase...
- Antioxydants non enzymatiques : On distingue 2 types :
 - Les antioxydants métaboliques : peuvent être produits à l'intérieur de l'organisme. Ils comprennent la bilirubine, la mélatonine, le coenzyme Q10, l'acide urique, le glutathion.
 - Les antioxydants nutritifs : sont des sources exogènes (alimentation) et qui ne peuvent pas être synthétisées dans le corps tels que les vitamines C et E, les flavonoïdes, les caroténoïdes, et les métaux (**Pham-Huy et al., 2008 ; Kabel, 2014**).

5.1. Les antioxydants enzymatiques

5.1.1. Les superoxydes dismutases SOD

Les superoxydes dismutases constituent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent une réaction de dismutation du superoxyde $O_2^{\cdot -}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène afin de l'éliminer (**R3**) (**Haleng et al., 2007**). Il existe 3 formes de SOD chez l'homme : la Cu/Zn-SOD-1

(cytosolique), la Mn-SOD-2 (mitochondriale) et une Cu/Zn SOD-3 extracellulaire produite en permanence (Castronovo, 2003).



L'enzyme a un rôle dans la prévention des changements cellulaires précancéreuses et peut servir d'anti-inflammatoire (Yasui et Baba, 2006). Elle est également utilisée comme ingrédient anti-âge et antioxydant en cosmétique et dans les produits de soins personnels en raison de sa capacité à réduire les dommages des radicaux libres sur la peau, prévenir ainsi des ridules, des rides, protéger contre les rayons UV, adoucir le tissu cicatriciel et réduire les autres signes de vieillissement (Luisa et al., 2002).

5.1.2. La glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases sont des enzymes antioxydantes contenant quatre cofacteurs de sélénium qui catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques (R₄) (Lobo et al., 2010).



5.1.3. La catalase

La catalase est une enzyme commune présente dans presque tous les organismes vivants aérobies. Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Chelikani et al., 2004).

5.2. Les antioxydants non enzymatiques

5.2.1. Les antioxydants métaboliques

a. La mélatonine

La mélatonine est une hormone naturelle présente chez les animaux et dans certains autres organismes vivants dont les algues (Caniato et al., 2003). Elle est également connue chimiquement sous le nom de N-acétyl-5-méthoxytryptamine (Nassar et al., 2007).

La mélatonine est un puissant antioxydant. Elle a la capacité de traverser facilement la barrière hémato-encéphalique et les membranes cellulaires (Reiter et al., 1997).

b. La bilirubine

La bilirubine est le produit terminal de la dégradation de l'hème issue du catabolisme de l'hémoglobine. C'est un composé non hydrosoluble capable de piéger l'oxygène singulet et ROO[·] (Haleng et al., 2007).

c. Le glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide de petite masse moléculaire, formé par la condensation de l'acide glutamique, de la glycine et de la cystéine. Il contient un groupement thiol libre apporté par la cystéine. Ce qui lui confère ses principales propriétés biochimiques.

Le glutathion c'est un puissant antioxydant qui protège les cellules de la peroxydation lipidique ainsi que des radicaux libres (**Chabory, 2009**).

5.2.2. Les antioxydants nutritifs

a. La vitamine C

La vitamine C est l'antioxydant hydrosoluble le plus important qui se trouve dans les liquides extracellulaires (**Sirmali et al., 2014**). Elle contribue chez les plantes à la régénération d'autres antioxydants puissants tels que la vitamine E et les caroténoïdes (**Forni et al., 2019**). En tant qu'agent réducteur, l'acide ascorbique peut réduire et neutraliser les espèces réactives d'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (**Padayatty et al., 2003**).

b. La vitamine E

La vitamine E naturelle comprend 4 tocophérols (α , β , γ , δ) et 4 tocotriénols (α , β , γ , δ) tous dérivé du 6- chromanol (**Herrera et Barbas, 2001**). Elle agit comme une première ligne de défense contre la peroxydation lipidique, protégeant ainsi les membranes cellulaires des attaques de radicaux libres (**Rizvi et al., 2014**).

c. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments responsables de bon nombre de teintes orange, jaune et rouge des fruits, des feuilles, et des fleurs des plantes. Elles ont un rôle majeur dans la protection des plantes contre les processus photooxydants et constituent également une partie du système antioxydant dans l'organisme humain (**Stahl et Sies, 2003**).

6. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes et sont impliqués dans la défense contre l'agression par des agents pathogènes ou l'UV (**Beckman , 2000**). Ces métabolites secondaires se trouvent partout : dans les tiges, les feuilles, les racines et les fleurs de tous les végétaux (**Edeas, 2007**). Ils se divisent en une dizaine de classes chimiques ayant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6

carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (**Hennebelle et al., 2004**).

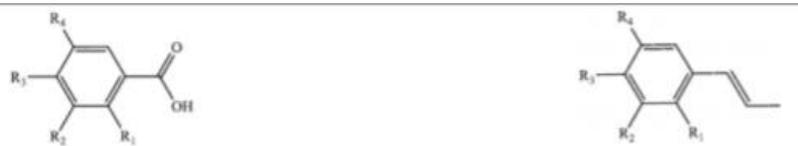
La phénylalanine c'est l'intermédiaire commun de formation de tous les composés phénoliques végétaux, mais ils proviennent également d'un précurseur proche qui est l'acide shikimique (**Kondratyuk et Pezzuto, 2004**).

L'activité antioxydante des polyphénols confère leur rôle dans la protection des constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs, ce qui limite le risque de différentes maladies dégénératives liées au stress oxydant (**Scalbert et al., 2005**).

Les principaux types de polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Scalbert et al., 2005**).

6.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se trouvent majoritairement dans les aliments et sont divisés en 2 classes : dérivés de l'acide cinnamique et dérivés de l'acide benzoïque (**Shahidi et Nacz, 1995 ; Pandey et Rizvi, 2009**).



Les acides benzoïques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Les acides cinnamiques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H	Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H	Ac. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H	H
Ac. <i>p</i> -hydroxy- benzoïque	H	H	OH	H	Ac. <i>m</i> -coumarique	H	OH	H	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH	Ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Ac. protocatéchique	H	OH	OH	H	Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 2 : Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (**Chaouche, 2014**).

6.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Marfak, 2003**). Ils sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (**Erlund, 2004**), et constituent les pigments responsables des colorations rouge, jaune et orange de différents organes végétaux (**Havsteen, 2002**). Ils sont couramment consommés sous forme de légumes, et fruits (**Ghedira, 2005**). Ils agissent dans les plantes comme antimicrobiens, photorécepteurs, antioxydants, nourrir les répulsifs, et également pour le dépistage de la lumière. D'après plusieurs études, les flavonoïdes présentent des actions antivirales,

vasodilatatrices, anti-allergéniques, et anti-inflammatoires (Pietta, 2000). Grâce à leur groupement hydroxyle (C₃-OH) fortement réactif, les flavonoïdes stabilisent et inactivent les radicaux libres (Nijveldt et al., 2001).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes : flavonols, flavanones, flavones, flavanols, isoflavones, anthocyanes et proanthocyanidines (Scalbert et al., 2005).

Leurs structures contiennent un squelette composé de deux cycles aromatiques A et B porteurs de plusieurs fonctions phénols et qui se réunissent par une chaîne de trois atomes de carbones. Ces atomes de carbones étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Figure 3) (Stoclet et Schini-Kerth, 2011).

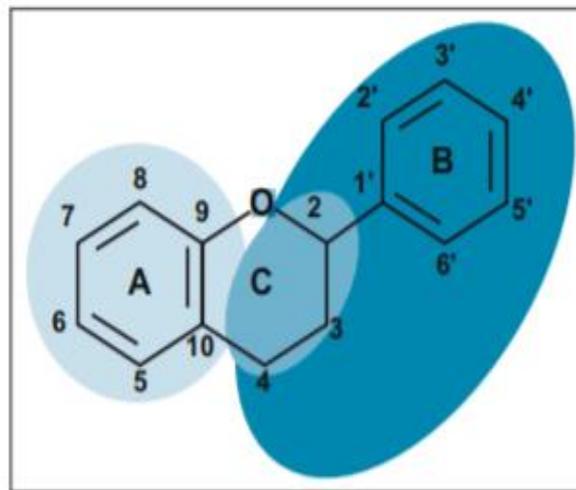


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes (Chira et al., 2008).

6.3. Les tanins

Les tanins constituent un groupe diversifié de composés phénoliques hydrosolubles. Ils sont répartis dans diverses parties des plantes, tels que : l'écorce, les feuilles et les fruits. Ils ont un rôle dans la protection des plantes contre les infections (Waterman et Mole, 1994 ; Vermerris et Nicholson, 2008).

Ces composés phénoliques sont capables de s'agréger avec la gélatine, les alcaloïdes et les protéines pour former des précipitations (**Chung, 1998**). Ils sont divisés selon leurs structures chimiques en 2 principaux groupes : tanins hydrolysables et tanins condensés (**Zucker, 1983**).

Les tanins sont utilisés pour traiter plusieurs maladies tels que les tumeurs du duodénum ou d'estomac, les diarrhées et ils sont utilisés également comme des antiseptiques et anti-inflammatoires en médecine naturelle chinoise et japonaise (**Khanbabae et Van Ree, 2001**).

L'activité de piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux de transition sont les mécanismes de base de l'activité antioxydante des tanins (**Koleckar et al., 2008**).

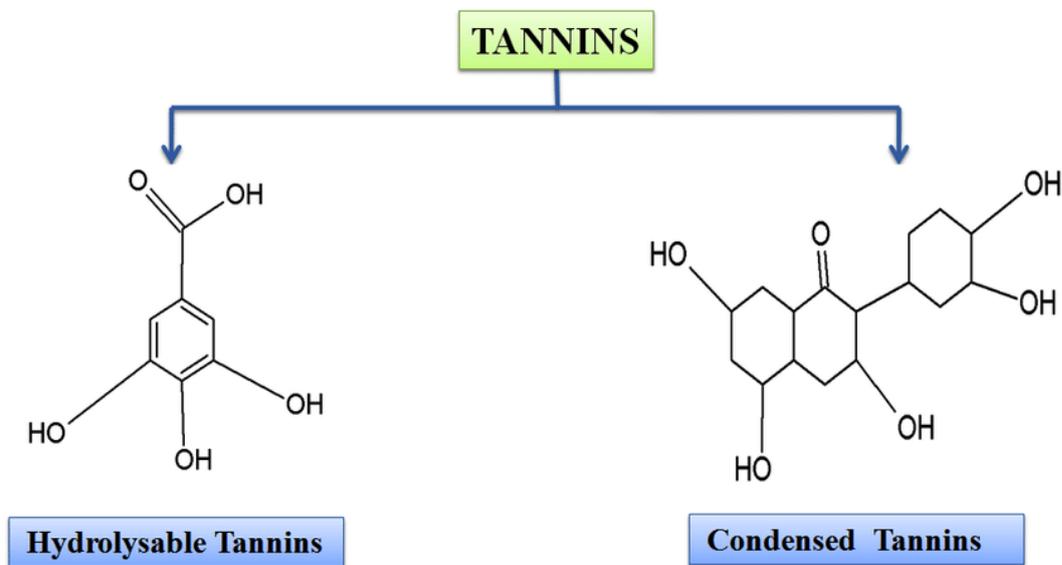


Figure 4 : Les unités de base des tanins hydrolysables et des tanins condensés (**Ghosh, 2015**).

Chapitre 2 :
Plante étudiée
(Inula viscosa)

Chapitre 2 : Plante étudiée *Inula viscosa*

Inula viscosa (L.) Aiton (*Dittrichia Viscosa* Greuter) est une herbe vivace annuelle qui évolue dans le bassin méditerranéen et appartient à la famille des Astéracées (Wang et al., 2004).

Cette espèce végétale présente une grande résistance aux conditions défavorables et se produit dans les environnements dégradés (Sinden et al., 2004 ; Dpiwe, 2011).

1. Description botanique

Inula viscosa c'est une plante visqueuse et ligneuse à la base, atteignant 1,5 m de haut (Lippert et podlech, 2008). Elle est caractérisée par des poils glandulaires, sécrétant une résine collante à l'origine du nom « *viscosa* », couvrant complètement la plante et conférant également sa forte odeur (Parolin et al., 2014). Les feuilles sont rugueuses et les fleurs sont jaunes (Figure 5) (Zeguerrou et al., 2013).

Floraison : Juillet- Novembre (Lippert et podlech, 2008).



Figure 5 : Les feuilles d'*Inula viscosa* (Photo personnel).

2. Noms vernaculaires :

En Arabe : Magramane (Araniti et al., 2017).

En Français : Inule visqueuse (Araniti et al., 2017).

En anglais : Sticky fleabane (Wang et al., 2004).

3. Classification botanique

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous Classe	Astérides
Ordre	Astérales
Famille	<i>Astéracées</i>
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>Viscosa</i> (Guignard ,2001)

4. Distribution

Inula viscosa est principalement répartie dans les zones méditerranéennes occidentales : Algérie, Albanie, Italie, France, Tunisie, Maroc, Portugal, Espagne...etc (Brullo et De-Marco, 2000). Elle pousse sur les bords de route, les habitats humides (Wang et al ., 2004) et le sable (Barrero et al ., 2008).

5. Usages thérapeutiques

Inula Viscosa c'est une plante riche en substances naturelles, ce qui lui confère plusieurs propriétés médicinales (Kattouf et al ., 2009). Elle est utilisée en médecine populaire comme anti-inflammatoire, anti-gale et pour favoriser la cicatrisation des plaies (Lauro et Rolih, 1990 ; Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib, 1999).

De nombreuses études ont démontré un ensemble d'activités biologiques de cette plante dont les plus intéressantes : antitumorale (Rozenblat et al., 2008), antifongique (Bssaibis et al., 2009 ; Franco-Mican et al., 2008), antivirale (Sassi et al., 2008), antioxydante (Albano et al ., 2012) et antibactérienne (Side Larbi et al., 2016).

Elle est utilisée également pour le traitement du diabète sucré (Haoui et al ., 2015), troubles gastroduodénaux et pulmonaires (Lastra et al.,1993 ; Al-Qura'n ,2009), l'anémie et la tuberculose (Al-Dissi et al ., 2001).

6. Composition chimique

Des études phytochimiques réalisées sur *I. viscosa* ont révélé la présence des composés phénoliques, des lactones et des Terpénoïdes (**Yegen et al., 1992 ; Ali-Shtayeh et al., 1998 ; Ali- Shtayeh et Abu Ghdeib ,1999 ; Cohen et al., 2002**).

En plus les parties aériennes de cette plante sécrètent une résine riche en composés phénoliques, ce qui a permis d'identifier 22 flavonoïdes (**Wollenweber et al., 1991**).

Les principaux composants de l'huile essentielle isolée à partir ses feuilles et ses fleurs sont : les Hydrocarbures, les cétones, les tétraterpènes, les sesquiterpènes, les monoterpènes, les phénols, les aldéhydes, les alcools et les diterpènes. Le composant majeur de cette huile est fortement composé de sesquiterpènes (**Haoui et al., 2015 ; Alalan et al., 2015**).

Partie

expérimentale

Matériel

et

méthodes

Notre travail est réalisé au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques (LAPSAB), Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd (Tlemcen).

Ce travail, est porté sur l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques et la recherche d'activité antioxydante des extraits enrichis en polyphénols des feuilles d'*Inula viscosa*.

1. Matériel végétal

Les feuilles d'*Inula viscosa* ont été récoltées dans la région de Mansourah, Wilaya de Tlemcen durant le mois du Juin-Juillet 2019.

Les feuilles ont été séchées dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière et découpées, ensuite, en petits morceaux à l'aide d'un mortier (**Figures 6,7**).



Figure 06 : Tiges et feuilles d'*Inula viscosa* séchées (photo personnel).



Figure 07: Feuilles d'*Inula viscosa* séchées et découpées (photo personnel).

2. Préparation des extraits

2.1. Extrait brut hydrométhanolique

Un extrait brut des feuilles d'*Inula viscosa* a été préparé par une extraction hydrométhanolique selon la méthode d'infusion suivie d'une macération :

- Sur 20 g des feuilles d'*Inula viscosa* séchées et découpées, verser 500 ml du mélange eau/méthanol bouillant : 30/70 (v/v) ;
- Laisser le mélange macéré pendant 48 h à une température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- Après macération, filtrer le mélange à l'aide d'un papier filtre ;
- Evaporer le méthanol, à l'aide d'un Rotavapor à 60°C ;
- Sécher complètement l'extrait dans une étuve à 37°C ;
- Récupérer et conserver l'extrait brut hydrométhanolique (**EB**).

2.2. Fractionnement par acétate d'éthyle

L'extrait brut hydrométhanolique, après élimination du méthanol, est soumis à une extraction liquide-liquide, par l'acétate d'éthyle (3 fois), à l'aide d'une ampoule à décanté.

La phase organique acétate d'éthyle récupérée est évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor à 60°C et la phase aqueuse résiduelle obtenue est séchée dans l'étuve à 37°C.

L'extrait brut hydrométhanolique (**EB**), la fraction acétate d'éthyle (**FAE**) et la phase résiduelle aqueuse (**PR**) sont récupérés et conservés à l'abri de la lumière, afin de réaliser des analyses phytochimiques et biologiques.

2.3. Le rendement d'extraction

Le rendement c'est le rapport entre la masse d'extrait après l'évaporation (M) du solvant et la masse du matériel végétal utilisé (M0), il est exprimé en pourcentage.

Pour chaque extrait, nous avons calculé ce pourcentage par la formule suivante :

$$\mathbf{R\ (\%) = M/M0 \times 100}$$

- ✓ R : Rendement en %
- ✓ M : Masse de l'extrait sec résultant (en gramme)
- ✓ M0 : Masse du matériel végétal de départ (en gramme)

3. Screening phytochimique

Pour mettre en évidence la présence des familles chimiques contenant dans les extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*, des tests phytochimiques qualitatifs ont été réalisés. Ces tests sont marqués par le changement de couleur, la formation d'un précipité et également par observation sous lumière UV.

Ces tests ont été effectués selon les procédures standards de **Trease et Evans (1989)** et **Harborne (1998)**.

L'évaluation des résultats c'est comme suit :

- : Négatif , + : faiblement positif , ++ : moyennement positif , +++ : fortement positif.

3.1. Les composés azotés

❖ Les alcaloïdes

Dans 2 tubes, introduire 0,5 ml d'extrait puis acidifier le milieu par HCl (1%). Ajouter 0,5ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif de Wagner dans l'autre tube.

L'apparition d'un précipité blanc ou brun respectivement, révèle la présence des alcaloïdes.

3.2. Les composés phénoliques

❖ Les tanins

Dans un tube, ajouter 0,25 ml de la solution aqueuse FeCl₃ (1%) à 1 ml d'extrait et incubé le mélange 15 min à une température ambiante.

L'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre révèle la présence des tanins.

❖ Les flavonoïdes

Dans un tube, ajouter à 1 ml d'extrait, 1ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium.

L'apparition d'une coloration rouge, rose ou jaune indique la présence des flavonoïdes.

❖ Les quinones libres

Dans un tube, ajouter à 1 ml d'extrait 0,1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1%).

L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet révèle la présence des quinones libres.

❖ Anthraquinones

Dans un tube, ajouter 1 ml de NH₄OH (10%) à 1 ml d'extrait puis agiter. L'apparition d'une coloration violette révèle la présence des anthraquinones.

3.3. Les composés terpéniques

❖ Les saponines (Test de mousse)

Introduire 10 ml d'extrait dans un tube, agiter pendant 15 secondes puis laisser le mélange au repos (15min). Une hauteur persistante supérieure à 1 cm de mousse indique la présence des saponines.

❖ Terpénoïdes: Test de Slakowski

Ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml de l'acide sulfurique concentré sur 1 ml d'extrait. La présence des terpénoïdes est indiquée par la formation de 2 phases avec une couleur marron à l'interphase.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

Le test de Folin- Ciocalteu est considéré comme l'une des méthodes les plus fréquentes pour le dosage des composés phénoliques. Il est basé principalement sur un transfert d'électrons en présence de carbonate de sodium Na_2CO_3 des composés phénoliques aux complexes d'acide phosphomolybdique / phosphotungstique ce qui induit à la formation des complexes blues qui sont déterminés à 725 nm (**Singleton et al ., 1965 ; Singleton et al., 1999**).

Nous avons déterminé la teneur en polyphénols totaux des extraits des feuilles *d'Inula viscosa* par la méthode décrite par **Ardestani et Yazdanparast (2007)**.

✓ Mode opératoire

- Mélanger 100 µl de chaque extrait (1mg/ml) avec 2000 µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ;
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 100 µl de réactif Folin-Ciocalteu (0,2 N) ;
- Incuber pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations de (0,05 – 0,45 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/ mg E}$).

4.2. Dosage des flavonoïdes

✓ Principe

Le dosage des flavonoïdes peut être réalisé par une méthode spectrophotométrique en utilisant la soude NaOH et le trichlorure d'aluminium AlCl_3 . Ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui devient rose en présence de NaOH. Cette couleur absorbe à 510 nm dans le visible (**Ardestani et Yazdanparast , 2007**).

✓ Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes contenant dans les feuilles d'*Inula viscosa* a été réalisé selon la méthode décrite par **Ardestani et Yazdanparast (2007)**.

- Mélanger 250 μl de chaque extrait (1mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée et 75 μl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 % ;
- Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, ajouter au mélange 75 μl de trichlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$) à 10 % ;
- Incuber l'ensemble pendant 6 minutes ;
- Ajouter aux tubes, 1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 %, et compléter le volume finale à 2,5 ml ;
- Agiter et incuber le mélange à l'obscurité pendant 30 minutes ;
- Mesurer l'absorbance à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle, en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05 -0,4 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC / mg E}$).

5. Recherche d'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

5.1. Piégeage du radical DPPH

✓ Principe

Ce test repose principalement sur la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée, qui se transforme en coloration jaunâtre en présence d'un antioxydant. Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (**Brand-Williams et al., 1995; Merouane et al., 2014**).

La recherche de l'activité antiradicalaire des extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa* a été réalisée selon le protocole de **Atoui et al., (2005)**.

✓ Mode opératoire

- 50 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations de (0,1 à 1mg/ ml) ont été ajoutées à 1950 µl DPPH (0,0025g fraîchement préparé dans du méthanol) ;
- Pour chaque concentration un blanc est préparé contenant 50 µl de chaque concentration d'extrait et 1950 µl du méthanol ;
- Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH ;
- La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante ;
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits ;

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

✓ Calcul des pourcentages d'inhibition

$$I (\%) = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$$

- I (%): Pourcentage d'inhibition
- A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif
- $A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé

✓ **Calcul des CI₅₀**

Le CI₅₀ signifie la concentration de l'extrait qui peut inhiber 50% du radical libre DPPH. Il est calculé graphiquement à partir des équations des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations des extraits testés. Ce paramètre détermine l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en CI₅₀.

5.2. Test d'ABTS: (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS⁺)

✓ **Principe**

L'oxydation de l'ABTS incolore avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), permet la formation du radical cationique ABTS⁺ de coloration bleu-vert. L'addition d'un antioxydant entraîne la réduction de ce radical (ABTS⁺) en ABTS.

Une décoloration de la solution révèle la présence d'une activité antiradicalaire. Cette dernière s'exprime par pourcentage d'inhibition « PI » de l'absorbance à 734 nm (**Osman et al., 2006 ; Moon et Shibamoto, 2009**).

✓ **Préparation de solution mère (ABTS⁺) (Rezaire, 2012)**

- mélanger 10 ml d'une solution éthanolique de persulfate de potassium à 4,9 mM et 10ml d'une solution éthanolique ABTS à 14 mM.
- Laisser le mélange réactionnel incuber pendant 16 h à l'obscurité et à température ambiante.

✓ **Préparation de la solution fille de travail (ABTS⁺) :**

- Diluer la solution mère précédemment préparée avec du éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ 0,700± 0.020 à 734 nm.

✓ **Mode opératoire**

Le test ABTS est réalisé selon le protocole décrit par **Re et al. (1999)** :

- 50 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations (0,1-0,7 mg/ml pour l'extrait brut et la fraction organique et 0,05-0,45 mg/ml pour la phase résiduelle) ont été ajoutées à 950µl solution de travail ABTS⁺ préparée;
- Pour chaque concentration un blanc est préparé contenant 50 µl de chaque concentration d'extrait et 950 µl du l'Ethanol ;

- Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de l'Ethanol avec 950 µl de la solution Ethanolique d'ABTS⁺ ;
- La lecture de l'absorbance est faite à 734 nm après 6 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante ;
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; le Trolox dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits ;

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition calculés selon la formule :

$$PI = (D.O \text{ contrôle} - D.O \text{ extrait} / D.O \text{ contrôle}) \times 100$$

PI: pourcentage d'inhibition

Les valeurs d'IC₅₀ (concentrations des extraits qui inhibent 50% du radical libre cationique ABTS⁺), sont calculées graphiquement à partir des équations des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations des extraits testés.

5.3. Pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power ; FRAP)

✓ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺) (**Karagözler et al., 2008**).

✓ Mode opératoire

- Mélanger 100 µl de l'extrait à différentes concentrations (0,1 - 1 mg/ml pour l'extrait brut et la fraction organique et 0,05 – 0,4 mg/ml pour la phase résiduelle), avec 250 µl d'une solution tampon phosphate 0,2 M (PH 6,6) et 250 µl d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ (1%) ;
- Incuber l'ensemble à 50° C pendant 20 minutes dans l'étuve ;
- Laisser le mélange refroidis ;
- Ajouter 250 µl de l'acide trichloracétique TCA (10%) pour stopper la réaction ;
- Centrifuger l'ensemble à 3000 rpm pendant 10 min ;
- Combiner 500 µl de surnageant avec 500 µl d'eau distillée et 100 µl d'une solution aqueuse de chlorure de fer (FeCl₃) (0,1 %) ;

- Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc, préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol ;

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

Le contrôle positif est représenté par une solution standard de l'acide ascorbique. Il est réalisé dans les mêmes conditions que les extraits, en mesurant l'absorbance dans différentes concentrations (0,01 à 0,4 mg/ml).

✓ Expression des résultats d'EC50

L'EC50 c'est la concentration efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale.

Ce paramètre est calculé graphiquement à partir des courbes de régressions linéaires d'absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés. Il détermine l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en EC50.

6. Analyses statistiques

❖ Moyenne

$$\bar{X} = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n)}{(n)} = \frac{1 \sum X_j}{n}$$

❖ Ecart-type

$$S = \sqrt{[\sum (xi - \bar{x})^2 / n - 1]}$$

Résultats
et
interprétations

1. Caractéristiques des extraits étudiés

L'extraction méthanol-eau (70/30, v/v), par une infusion et une macération (48h), suivie d'un fractionnement par acétate d'éthyle, des feuilles séchées et broyées d'*Inula viscosa*, nous a permis de récupérer trois extraits : un extrait brut eau méthanol (EB), une fraction acétate d'éthyle (FAE) et une phase résiduelle (PR).

Les rendements et les caractéristiques des différents extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Caractéristiques des différents extraits des feuilles

	Extrait brut Eau-méthanol (EB)	Fraction acétate d'éthyle (FAE)	Phase résiduelle aqueuse (PR)
Rendement (%)	22,34	6,90	12,87
Aspect	Cristaux	Cristaux	Cristaux
Couleur	Marron clair	Marron foncé	Marron clair
Solubilité	Méthanol	Méthanol	Méthanol

A la base des résultats obtenus, nous avons observé que l'extrait brut hydrométhanolique (EB) a le rendement le plus élevé (22,34 %) suivi respectivement par la phase résiduelle aqueuse (PR) (12,87 %) et la fraction organique acétate d'éthyle (FAE) (6,90 %).

Tous les extraits sont sous forme de cristaux de couleur marron. Ils sont tous solubles dans le méthanol.

2. Screening phytochimique

Des tests phytochimiques ont été réalisés afin de détecter la présence ou l'absence des métabolites secondaires dans les différents extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*. Les résultats obtenus sont mentionnés ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Screening phytochimique des trois extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*

Métabolites secondaires	Extrait brut Eau-méthanol (EB)	Fraction acétate d'éthyle (FAE)	Phase résiduelle aqueuse (PR)
Alcaloïdes « Mayer »	++	+	-
Alcaloïdes « Wagner »	-	-	-
Tanins	+++	+++	+++
Flavonoïdes	-	+	-
Quinones libres	+	+++	+++
Anthraquinones	-	-	-
Terpénoïdes « Slakowski »	+++	+++	+++
Saponines	-	-	-

- : Négatif , + : faiblement positif ,++ : moyennement positif , +++ : fortement positif

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que les tanins, les quinones libres et les terpénoïdes sont présents dans tous les extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*. Les flavonoïdes sont seulement présents dans la fraction acétate d'éthyle et les alcaloïdes ont révélé un test positif avec le réactif de Mayer pour l'extrait brut Eau-méthanol (EB) et sa fraction organique acétate d'éthyle (FAE).

Par contre, nous avons enregistré l'absence totale des anthraquinones et des saponines pour les trois extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*.

3. Dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes)

Les dosages des composés phénoliques d'extrait brut eau-méthanol (EB), sa fraction acétate d'éthyle (FAE) et la phase résiduelle aqueuse (PR) des feuilles d'*Inula viscosa*, ont été réalisés par des méthodes spectrophotométriques, en utilisant le réactif Folin- Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux et la réaction avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) en milieu alcalin pour le dosage des flavonoïdes.

Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées à partir des équations de régression linéaire de la courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux ($y = 1,916x$, $R^2 = 0,992$) (**Figure 8**) et de la courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes ($y = 2,995x$, $R^2 = 0,996$) (**Figure 9**).

Résultats et interprétations

Les teneurs sont exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/ mg E}$) pour les polyphénols totaux et en en microgramme équivalent Catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/ mg E}$) pour les flavonoïdes.

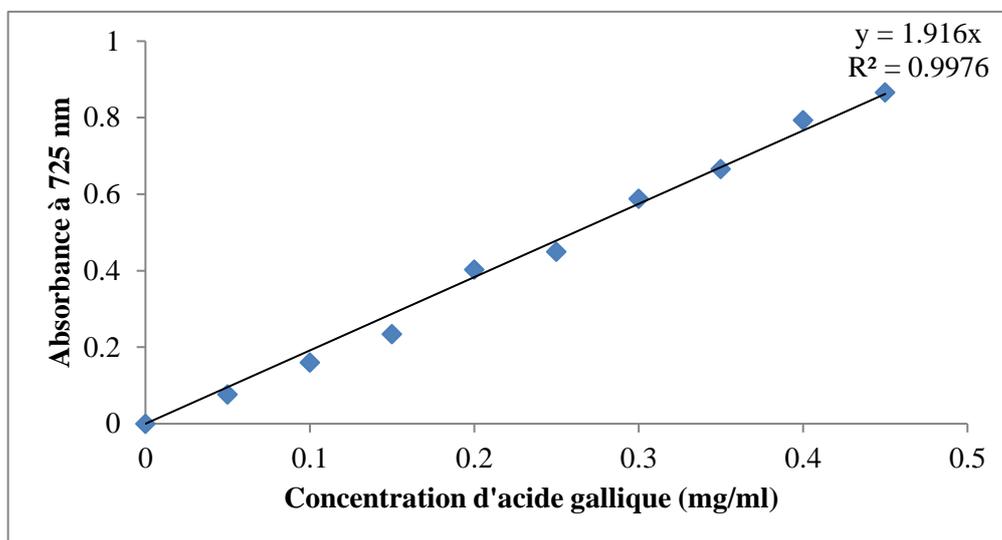


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

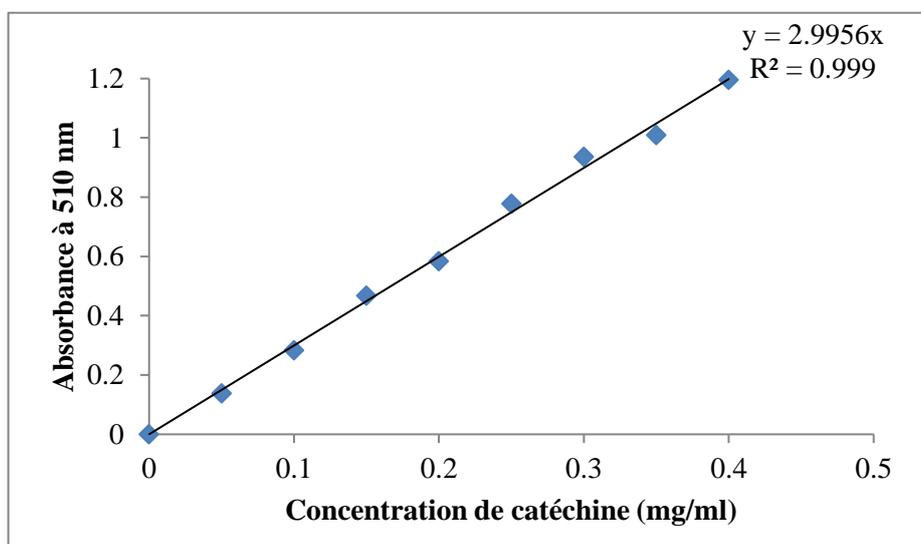


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Le **tableau 3** représente en moyennes, les teneurs en composés phénoliques dans l'extrait brut eau-méthanol préparé par une infusion suivie d'une macération et ses deux fractions récupérées : FAE et PR.

Tableau 3 : Teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

Extraits	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg E}$) \pm Ecart type (n=3)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EC / mg E}$) \pm Ecart type (n=3)
Extrait brut Eau-méthanol (EB)	248 \pm 8,1	187 \pm 18,7
Fraction organique acétate d'éthyle (FAE)	518 \pm 47	491,9 \pm 104,2
Phase résiduelle aqueuse (PR)	357 \pm 16	484 \pm 00,00

Les résultats mentionnés dans le **tableau 3**, ont montré que les différents extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa* contiennent des quantités en composés phénoliques avec des teneurs variables d'un extrait à un autre.

La fraction organique acétate d'éthyle contient les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes (518 \pm 47 $\mu\text{g EAG/ mg E}$ et 491,9 \pm 104,2 $\mu\text{g EC / mg E}$, respectivement).

Des quantités de polyphénols totaux et de flavonoïdes (357 \pm 16 EAG/ mg E et 484 \pm 00,00 $\mu\text{g EC / mg E}$, respectivement) ont été enregistrées dans la phase résiduelle aqueuse (PR) récupérée après l'extraction liquide-liquide. Ce qui explique l'existence toujours des quantités des polyphénols dans cette phase.

4. Recherche de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

4.1. Piégeage du radical DPPH

Les figures **10**, **11**, **12** et **13** représentent les courbes des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa* ou de l'acide ascorbique.

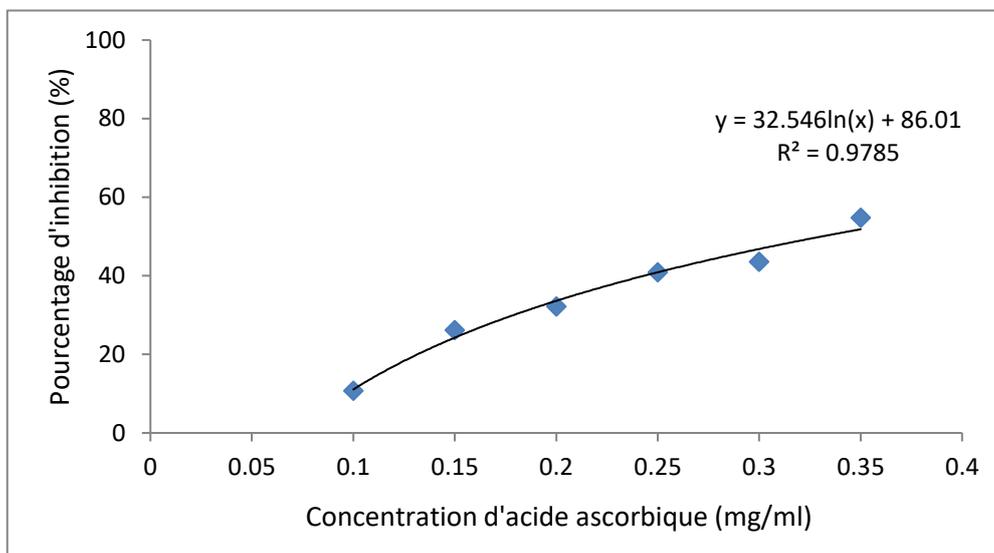


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH· en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.

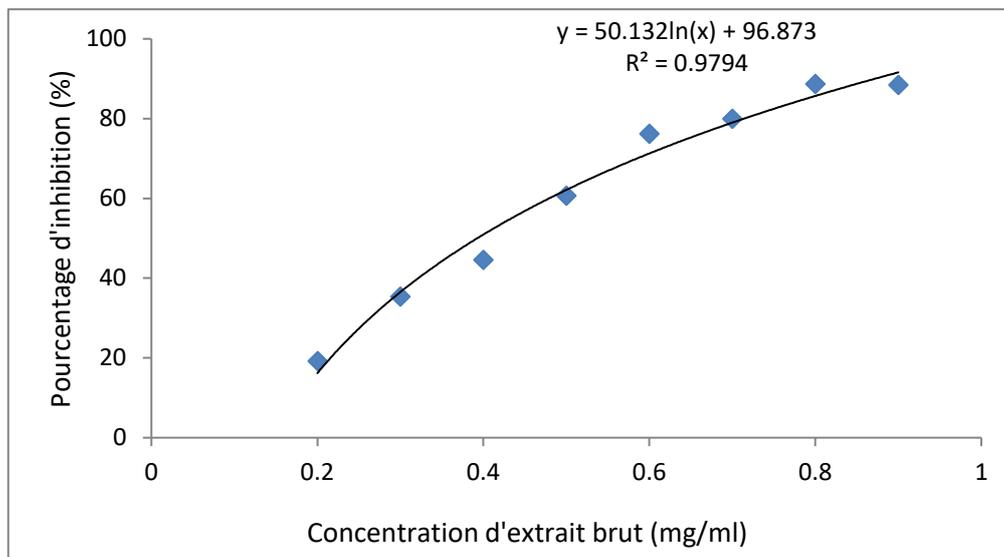


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH· en fonction des différentes concentrations d'extrait brut eau-méthanol des feuilles d'*Inula viscosa*.

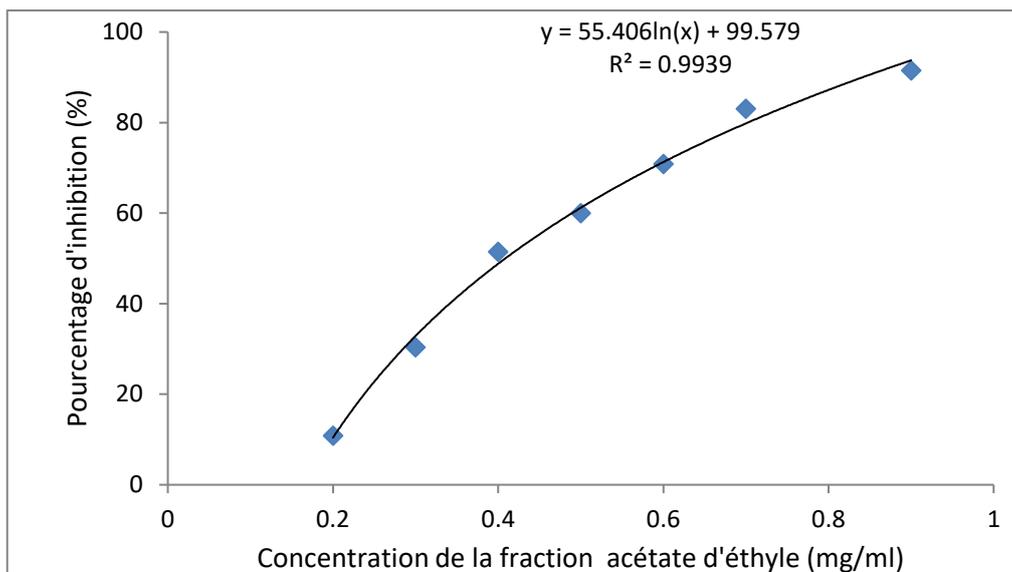


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH· en fonction des différentes concentrations de fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d'*Inula viscosa*.

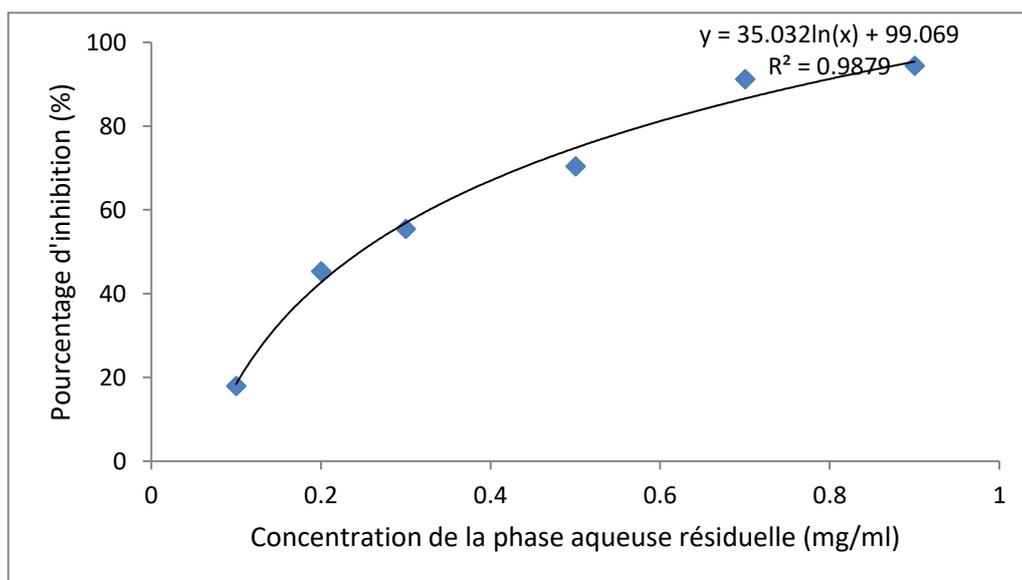


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH· en fonction des différentes concentrations de phase aqueuse résiduelle des feuilles d'*Inula viscosa*.

A partir des équations des courbes logarithmiques obtenues, nous avons déterminé les CI50 (concentrations qui inhibent 50% du radical libre DPPH·) de chaque extrait étudié d'*Inula viscosa* et l'acide ascorbique.

Les différents résultats sont regroupés dans le **tableau 4** :

Tableau 4 : Valeurs CI_{50} des extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*

Extraits	CI_{50} (mg/ml) \pm Ecart type (n=3)
Acide ascorbique (témoin)	0,33 \pm 0,012
Extrait brut Eau-méthanol (EB)	0,39 \pm 0,030
Fraction acétate d'éthyle (FAE)	0,41 \pm 0,014
Phase résiduelle aqueuse (PR)	0,25 \pm 0,015

A la base des résultats obtenus, nous avons remarqué que la fraction résiduelle aqueuse présente la meilleure activité anti-radicalaire ($CI_{50} = 0,25 \pm 0,015$) suivi respectivement par le contrôle positif : l'acide ascorbique ($CI_{50} 0,33 \pm 0,012$), l'extrait brut Eau-méthanol ($CI_{50} = 0,39 \pm 0,030$) et la fraction organique acétate d'éthyle ($CI_{50} = 0,41 \pm 0,014$).

4.2. Test d'ABTS

Les résultats d'inhibition du radical cationique $ABTS^{+}$ en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa* et de Trolox. Sont représentés dans les **figures 14, 15, 16 et 17**.

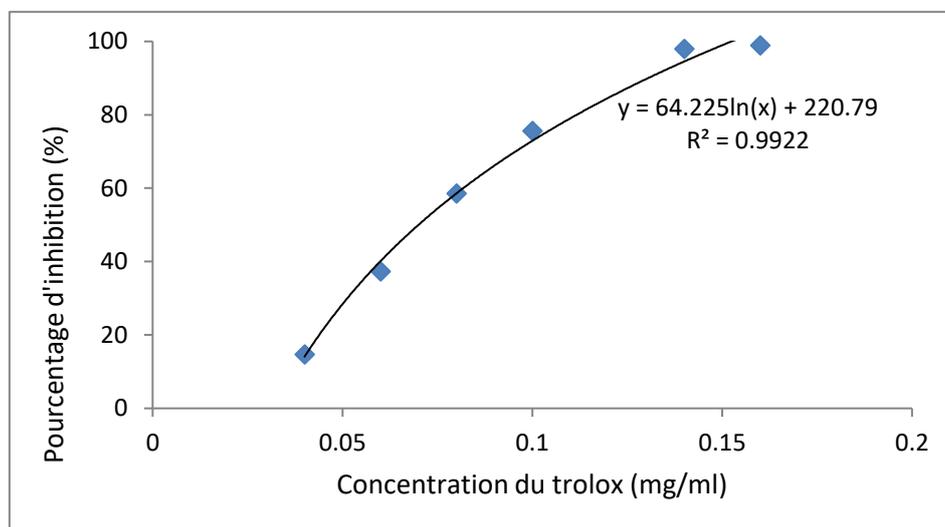


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre $ABTS^{+}$ en fonction des différentes concentrations du Trolox.

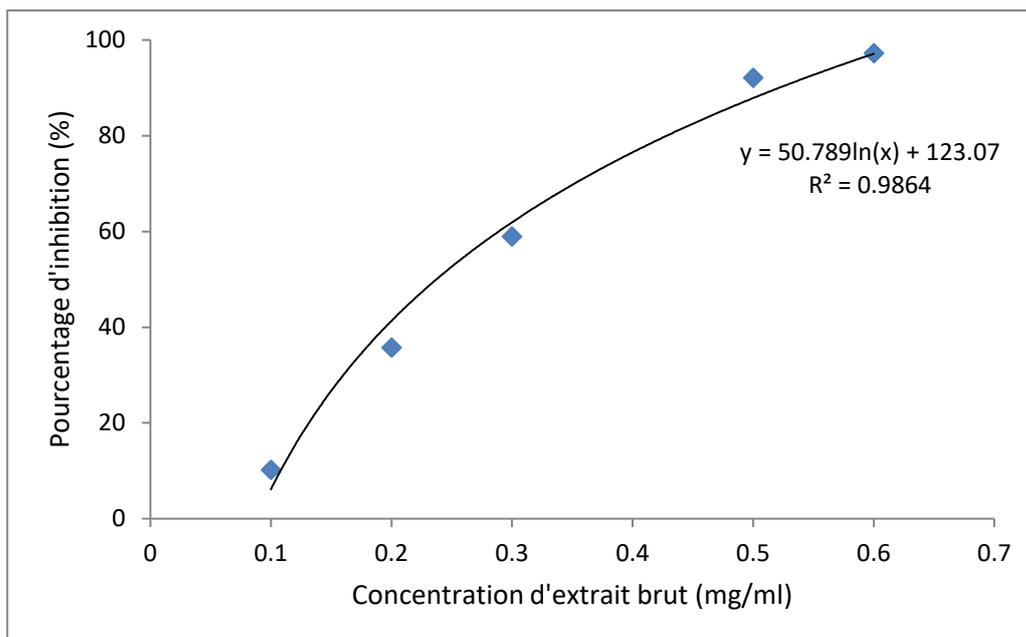


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS⁺ en fonction des différentes concentrations d'extrait brut eau-méthanol des feuilles d'*Inula viscosa*.

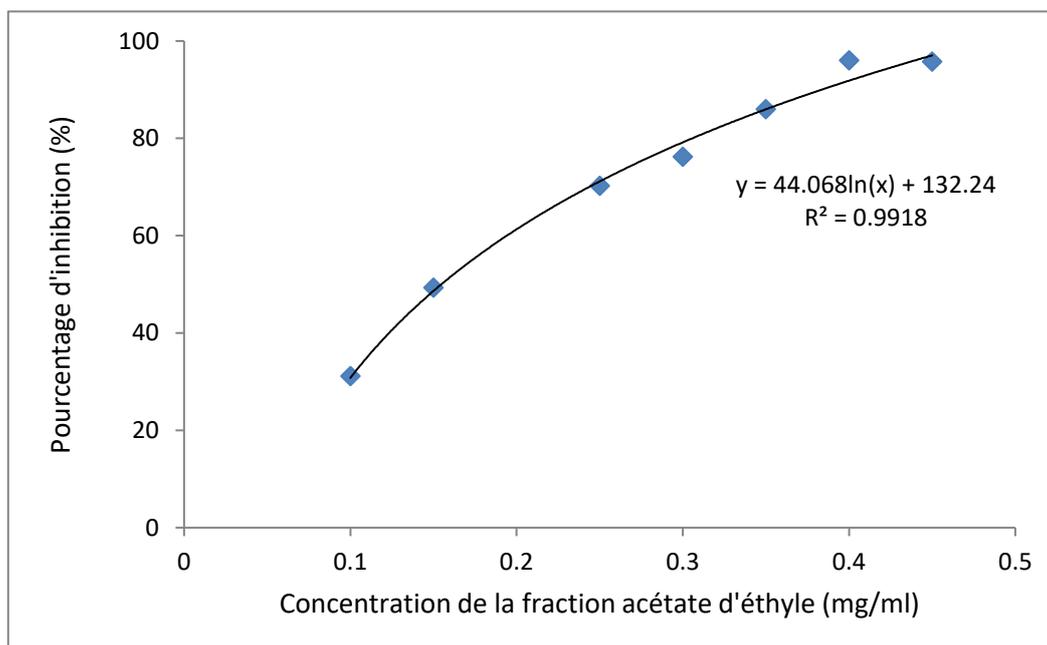


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS⁺ en fonction des différentes concentrations de la fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d'*Inula viscosa*.

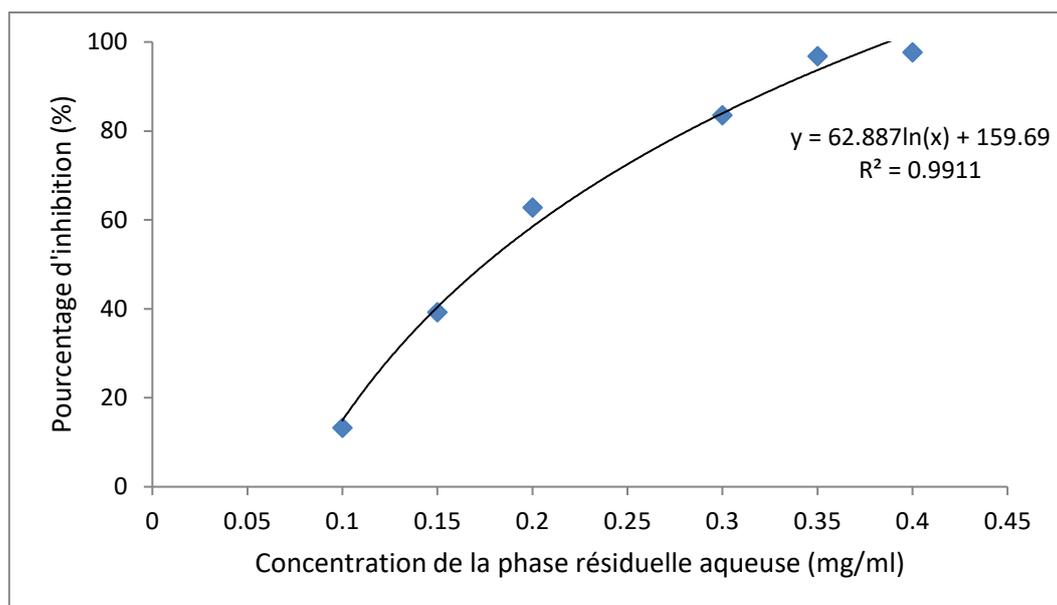


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre $ABTS^{+}$ en fonction des différentes concentrations de la phase résiduelle aqueuse des feuilles d'*Inula viscosa*.

Les CI_{50} (concentrations qui inhibent 50% du radical cationique $ABTS^{+}$), sont représentées dans le **tableau 5**. Elles sont déterminées à partir des équations des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition du radical $ABTS^{+}$ en fonction des différentes concentrations du Trolox (témoin) et des extraits préparés des feuilles d'*Inula viscosa*.

Tableau 5 : Valeurs d' IC_{50} des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

Extraits	CI_{50} (mg/ml) \pm Ecart type (n=3)
Trolox (témoin)	0,07 \pm 0,002
Extrait brut Eau-méthanol (EB)	0,24 \pm 0,008
Fraction acétate d'éthyle (FAE)	0,16 \pm 0,012
Phase résiduelle aqueuse (PR)	0,18 \pm 0,014

A la base des résultats obtenus nous avons noté que la fraction acétate d'éthyle (FAE) présente la plus forte activité anti-radicalaire sur le radical $ABTS^{+}$ ($CI_{50} = 0,16\pm 0,012$) suivi respectivement par la phase résiduelle aqueuse ($CI_{50} = 0,18\pm 0,014$) et l'extrait brut Eau-méthanol ($CI_{50} = 0,24\pm 0,008$). Cette activité reste largement inférieure par rapport au Trolox ($CI_{50} = 0,07\pm 0,002$), utilisé comme contrôle positif.

4.3. Pouvoir réducteur de fer FRAP

Les résultats obtenus du pouvoir réducteur de fer des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, sont présentés dans les figures (18, 19, 20 et 21).

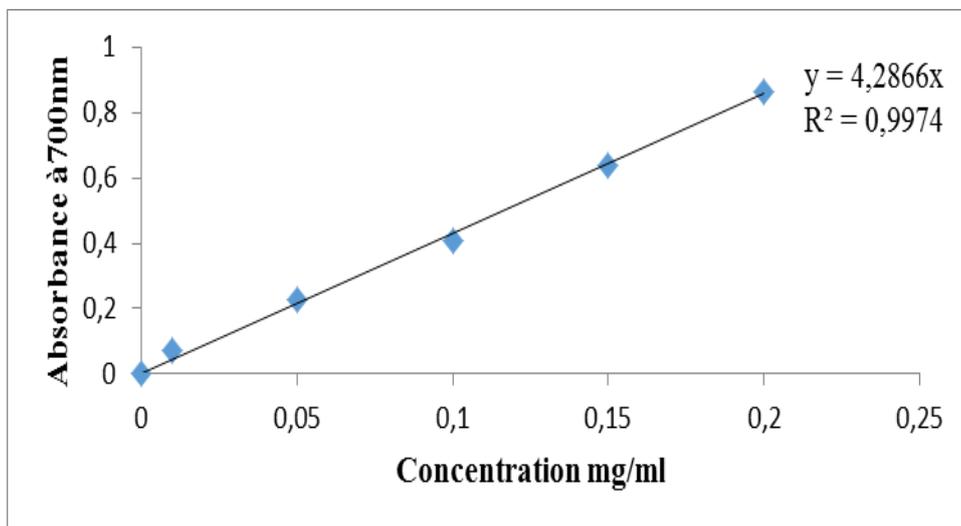


Figure18 : Pouvoir réducteur du fer en présence de l'acide ascorbique (Ghanemi,2019).

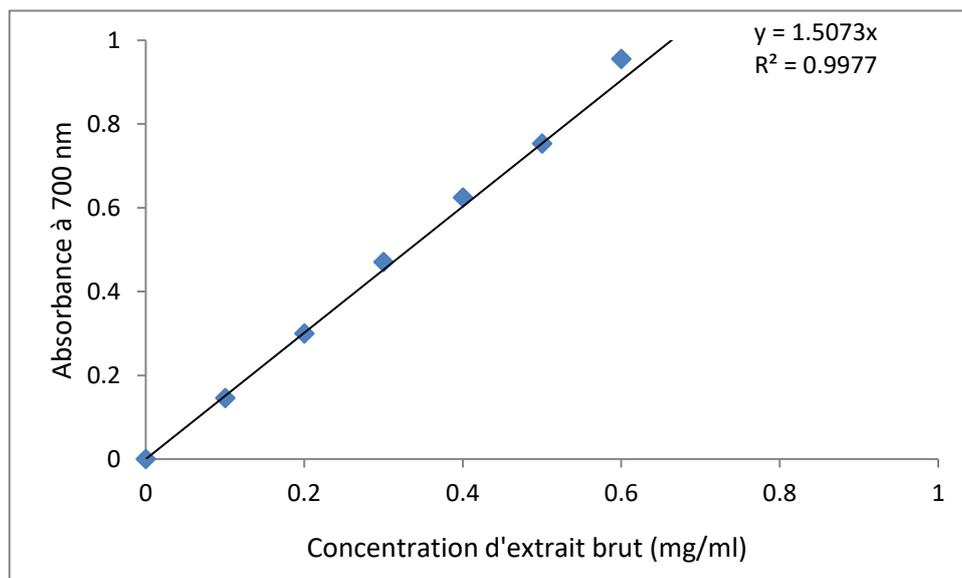


Figure 19 : Pouvoir réducteur du fer d'extrait brut eau-méthanol des feuilles d'*Inula viscosa*.

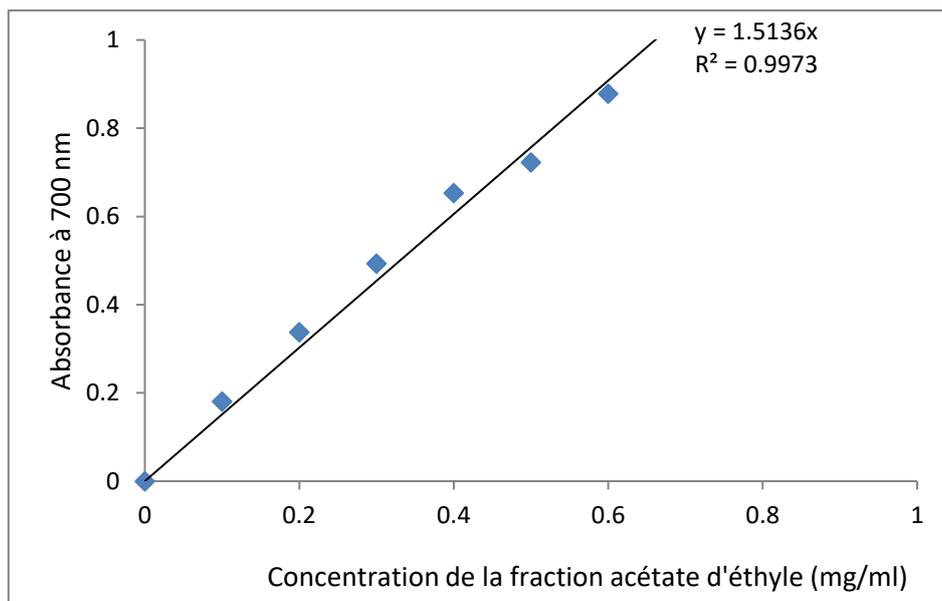


Figure 20 : Pouvoir réducteur du fer de la fraction organique acétate d'éthyle des feuilles d'*Inula viscosa*.

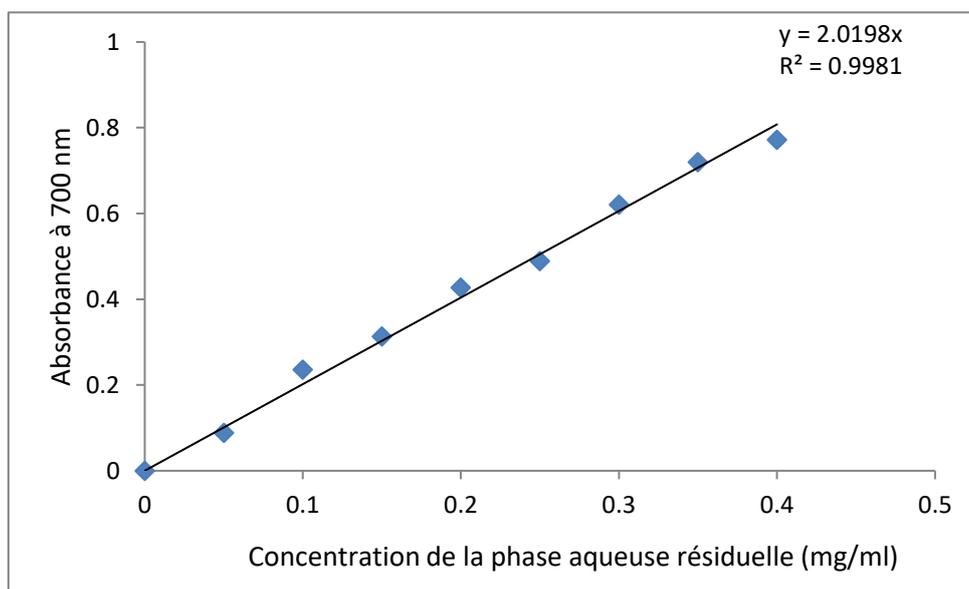


Figure 21 : Pouvoir réducteur du fer de la phase résiduelle aqueuse des feuilles d'*Inula viscosa*.

Le **tableau 6** regroupe les différentes EC50 (concentration efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale). Elles sont calculées à partir des équations de régression linéaire des courbes d'absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés.

Tableau 6 : Les valeurs d'EC50 des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*

Extraits	EC50 (mg/ml) ± Ecart type (n=3)
Extrait brut Eau-méthanol (EB)	0,332 ± 0,003
Fraction acétate d'éthyle (FAE)	0,330 ± 0,014
Phase résiduelle aqueuse (PR)	0,248 ± 0,006
Acide ascorbique	0,002 (Ghanemi adila)

D'après ces résultats obtenus, nous avons enregistré une meilleure activité anti-oxydante de la phase résiduelle aqueuse (PR) avec une EC50 de 0,248 ± 0,006 suivi respectivement par la fraction acétate d'éthyle (FAE) et l'extrait brut (EB) avec des EC50 d'ordre de 0,330 ± 0,014 et de 0,332 ± 0,003. Cette activité reste largement inférieure par rapport à celle de l'acide ascorbique (EC₅₀ = 0,002), utilisé comme contrôle positif.

Discussion

L'Algérie de par son climat, et la nature des ses sols, pourvu d'une flore très riche en plantes aromatiques et médicinales dont la majorité existe à l'état spontané.

La valorisation des plantes aromatiques et médicinales est un domaine particulièrement important à développer puisque c'est une source de produits à haute valeur ajoutée (**Felidj et al., 2010**).

Inula viscosa c'est une plante de la famille des astéracées, d'origine méditerranéenne. Les feuilles de cette plante sont traditionnellement employées en Algérie pour le traitement de plusieurs maladies tel que : le diabète sucré, comme antiseptiques et anti-inflammatoires (**Lauro et Rolih 1990 ; Bellakhdar 1997 ; AL-Dissi et al., 2001**).

Ce travail, repose sur l'étude phytochimique de l'extrait brut eau-méthanol, sa fraction acétate d'éthyle enrichie en polyphénols, et de la phase aqueuse résiduelle, des feuilles d'*Inula viscosa*, par des tests phytochimiques, sur le dosage des composés phénoliques et la recherche d'activité antioxydante par diverses méthodes DPPH (piégeage de radical libre DPPH[•]), ABTS (piégeage de radical libre cation ABTS^{•+}) et FRAP (pouvoir réducteur de fer).

A la base des résultats obtenus, nous avons enregistré des rendements variables d'ordre de 22,34%, 6,90%, 12,87% pour l'extrait brut Eau-méthanol, la fraction acétate d'éthyle et la phase résiduelle aqueuse, respectivement.

Les travaux réalisés par **Chahmi et al., 2015** au Maroc, sur trois échantillons de la partie aérienne d'*Inula viscosa* récoltés dans trois régions : Sefrou, Imouzzet et Taounate, et préparés dans deux solvants différents (acétate d'éthyle et éthanol), ont montré que le solvant le plus extractif est l'éthanol avec des rendements d'ordre de 23,90% dans Sefrou, 20,80% dans Imouzzet et 13,35% dans Taounate. Tandis que les rendements enregistrés par les extraits acétates d'éthyle étaient : 21,30% dans Sefrou, 10,50% dans Imouzzet et 18,50 % dans Taounate.

Les résultats du screening phytochimique, ont montré la présence des tanins, des quinones libres, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des alcaloïdes et l'absence totale des anthraquinones et des saponines dans l'extrait eau-méthanol et ses deux fractions récupérées des feuilles d'*Inula viscosa*.

L'étude effectuée par **Derradji et Marzen (2016)** a montré que les extraits des feuilles de cette plante contiennent les flavonoïdes, les coumarines, les saponosides, et les tanins galliques. Ils ont noté l'absence des alcaloïdes, des tanins condensés et des quinones libres.

Haddad et Khiri (2017), ont montré également que les extraits d'*Inula viscosa* contiennent les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les saponosides.

L'utilisation de l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction des polyphénols nous a permis de préparer un extrait enrichi en polyphénols à partir d'un extrait brut hydrométhanolique préparé par une infusion suivie d'une macération. Ce qui a été confirmé par les résultats du dosage des composés phénoliques, qui ont montré que la fraction organique acétate d'éthyle contient les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes ($518 \pm 47 \mu\text{g EAG}/\text{mg E}$ et $491,9 \pm 104,2 \mu\text{g EC}/\text{mg E}$, respectivement).

Une étude sur le dosage des composés phénoliques effectuée par **El Ouariachi et Bouyanzer (2014)**, réalisée sur deux extraits d'*Inula viscosa* (extrait d'acétate d'éthyle et extrait d'éther diéthylique) a montré également que l'extrait acétate d'éthyle contient les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes ($441\mu\text{g}/\text{mg}$ et $74\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivement).

La concentration la plus efficace d'inhibition du 50% du radical libre DPPH \cdot a été enregistrée par la phase résiduelle aqueuse avec une valeur de $0,25 \pm 0,015 \text{ mg}/\text{ml}$. Cette activité est supérieure par rapport à celle de l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 0,33 \pm 0,012 \text{ mg}/\text{ml}$). Ces résultats sont en accord avec les résultats des travaux de **Trimech et al. (2014)**, qui ont montré que la concentration inhibitrice de 50% du radical libre DPPH \cdot des feuilles d'*Inula viscosa* a été environ $0,26 \text{ mg}/\text{ml}$.

Ennacerie et al. (2019), ont montré également que l'extrait éthanolique d'*Inula viscosa* possède la plus forte activité anti-radicalaire avec une CI_{50} d'ordre de $0,09 \text{ mg}/\text{ml}$, soit presque le double de la décoction ($\text{CI}_{50} = 0,19 \text{ mg}/\text{ml}$).

Par ailleurs, les résultats du test d'ABTS obtenus dans cette étude, ont montré que la meilleure activité anti-radicalaire a été enregistrée par la fraction acétate d'éthyle avec une CI_{50} d'ordre de $0,16 \pm 0,012 \text{ mg}/\text{ml}$. Cette activité reste largement inférieure par rapport au Trolox (témoin positif), ($\text{CI}_{50} = 0,07 \pm 0,002 \text{ mg}/\text{ml}$). Il existe une corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante, puisque la fraction acétate d'éthyle qui est la plus riche en polyphénols présente également la plus forte activité anti-radicalaire.

Mahmoudi et al. (2016), a montré que la concentration efficace d'inhibition radicalaire d'ABTS \cdot^+ à 50% est d'ordre de $16,75 \mu\text{g}/\text{ml}$, et qui est largement inférieure à celle obtenue dans notre étude.

Discussion

A noté, que le test FRAP a montré que la phase résiduelle aqueuse présente le meilleur pouvoir réducteur de fer avec une EC_{50} d'ordre de $0,248 \pm 0,006$ mg/ml.

Cette activité est largement faible par rapport à celle de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Inula viscosa*, ($EC_{50} = 0,55 \pm 0,03$ μ g/ml), rapporté par **Alfarrayeh (2013)**.

Conclusion

et

perspectives

Notre travail est basé sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait brut eau-méthanol, sa fraction organique acétate d'éthyle enrichie en polyphénols et la phase aqueuse résiduelle, préparés par infusion suivie d'une macération des feuilles d'*Inula viscosa*.

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits ont révélé la présence des tanins, des flavonoïdes, des quinones libres, des terpénoïdes et des alcaloïdes, et l'absence des saponines et anthraquinones.

Par ailleurs, le dosage des composés phénoliques, a montré que la fraction organique acétate d'éthyle a marqué les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes ($518 \pm 47 \mu\text{g EAG/ mg E}$ et $491,9 \pm 104,2 \mu\text{g EC / mg E}$, respectivement).

La meilleure activité anti-radicalaire a été notée par la phase résiduelle aqueuse qui a enregistré une CI_{50} d'ordre de $0,25 \pm 0,015 \text{ mg/ml}$ pour le test DPPH et la fraction organique acétate d'éthyle qui a marqué une CI_{50} d'ordre de $0,16 \pm 0,012 \text{ mg/ml}$ pour le test ABTS^{•+}.

De plus, le meilleur pouvoir réducteur du Fer a été enregistré par la phase résiduelle aqueuse avec une EC_{50} d'ordre de $0,248 \pm 0,006 \text{ mg/ml}$.

Ce travail mérite d'être complété, à l'avenir, on proposant les perspectives suivantes:

- Utiliser d'autres solvants organiques pour optimiser le rendement d'extraction, le fractionnement et la purification des composés phénoliques ;
- Identifier les composés phénoliques par des techniques spectrométriques et chromatographiques : RMN, Spectrométrie de masse, HPLC, ...
- Evaluer d'autres activités biologiques d'*Inula viscosa* (antimicrobienne, anti-inflammatoire..).
- Evaluer l'activité antioxydante par différentes méthodes : ORAC (Oxygen Radical Absorbance), TRAP (Total-Radical trapping Antioxidant Parameter assay), CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity).
- Etudier *in vivo* de l'effet antioxydant d'*Inula viscosa*.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abad M J., Guerra J A., Bermejo P., Irurzun A., Carrasco L.** (2000). Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy Research*, 14(8): 604-607.
- Ahmad S.** (1995). *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses In Biology*. Ed. Chapman & Hall.
- Agarwal A., Allamaneni S S R.** (2004). Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal*, 9(3): 187- 197.
- Alalan L., Al-Shammaa I., Al-nouri A S.** (2015). Analysis of the chemical composition of essential oil extracted from Syrian *Inula viscosa* (L). *Journal of chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12): 861-864.
- Albano SM., Lima AS., Miguel MG., Pedro LG., Barroso JG., Figueiredo AC.** (2012). Antioxidant, Anti-5- lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *Records of Natural Products*, 6:1 35-48.
- Al-Dissi NM., Salhab AS., Al-Hajj HA.** (2001). Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 77(1): 117-121.
- Alfarrayeh I I.** (2013). Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of *Sarcopoterium spinosum*, *Paronychia argentea* , *Inula viscosa*, and *Achillea fragrantissima* Selected From Wadi Alkarak- Jordan. Thèse Master en biologie département biologie. Université Mu'tah : 26
- Ali- Shtayeh MS ., Yaghmour RM., Faidi YR., et al.** (1998). Antimicrobial Activity of 20 Plants Used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. *Journal of ethnopharmacology*, 60(3): 265- 271.
- Ali-Shtayeh MS., Abu Ghdeib SI.** (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12): 665-672.
- AL-Qura'n S.** (2009). Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1): 45- 50.
- Alvarez B., Radi R.** (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, 25(3-4): 295-311.
- Araniti F., Lupini A., Sunseri F., Abenavoli RM.** (2017). Allelopathic Potential of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter Mediated by VOCs: A Physiological and Metabolomic Approach. *Plos One*, 12(1): e0170161.
- Ardestani A., Yazdanparast R.** (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food and chemical Toxicology*, 45: 2402-2411.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P.** (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36.
- Barbetti P., Chiappini I., Fardella G., Menghini A.**(1985). A New Eudesmane Acid From *Dittrichia* (*Inula*) *viscosa*. *Planta medica*, 51(5): 471.

Références bibliographiques

- Barrero A F., Herrador M M., Arteaga P., Catalán J V.** (2008). *Dittrichia viscosa* L. Greuter: Phytochemistry and Biological Activity. *Natural Product Communications*, 3 (11): 1799-1804.
- Bartosz G.** (1996). Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta biochimica Polonica*, 43(4): 645-659.
- Beaudeau J L., Delattre J., Therond P., Bonnefont- Rousselot D., Legrand A., Peynet J.** (2006). Le stress oxydant, composante physiologique de l'athérosclérose. *Oxidative stress in the atherosclerotic process. Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21 : 144-150.
- Beckman CH.** (2000). Cellules de stockage phénolique: clés de la mort cellulaire programmée et de la formation de périderme dans la résistance aux maladies du flétrissement et dans les réponses de défense générales des plantes ? *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 57 : 101-110.
- Bellakhdar J.** (1997). La pharmacopée traditionnelle marocaine *Le Fenec*. Ibis press, Paris: 764.
- Bergendi L., Benes L., Durackova Z., & Ferencik M.** (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*, 65(18-19): 1865-1874.
- Brand-william W, Cuvelier ME, Berset C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* , 28 : 25-30.
- Brullo S., De Marco G.** (2000). Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae). *Portugaliae Acta Biologica*, 19: 341-354.
- Bssaibis F., Gmira N., Meziane M.** (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 3(1) : 44-55.
- Caniato R., Filippini R., Piovan A., Puricelli L., Borsarini A., Cappelletti E.**(2003). Melatonin in plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527: 593-7
- Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M C., Pénicaud L., Casteilla L.** (2006). Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine/Sciences*, 22(1) : 47-53.
- Castronovo V.** (2003). Alimentation et cancer. *Revue Médicale de Liège*, 58 : 4 : 231-239
- Chabory E.** (2009). Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine. Thèse de doctorat en Physiologie et Génétique moléculaires, Univ, Blaise Pascal : 20.
- Chahmi N., Anissi J., Jennan S., Farah A., Sendide K., El Hassouni M.** (2015). Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3): 228-233.
- Chaouche T M.** (2014). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat en biochimie. Univ, Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen : 10.
- Chelikani P., Fita I., Loewen PC.** (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 192-208.

Références bibliographiques

- Chira K., Suh JH., Saucier C., Teissèdre P L.** (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75-82.
- Chung KT., Wong T Y., Wei C I., Huang YW & Lin Y.** (1998). Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421-464.
- Cohen Y., Baider A., Ben-Daniel BH., Ben-Daniel Y.** (2002). Fungicidal preparations from *Inula viscosa*. *Plant Prot Sci*, 38: 629-30.
- Demiryürek A T., Çakici I., Kanzik I.** (1998). Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacology & Toxicology*, 82(3): 113-117.
- Derradji S., Marzen L.** (2016). Activités biologiques d'*Inula viscosa*. Mémoire de master en Génie biologique. Univ, Saad DAHLAB de Blida1 : 38-39.
- DPIPWE** (Department of Primary Industries, Parks , Water and Environment) (2011). False Yellow Head Weed Management Plan. Statutory Weed Management Plan as at June 2011. Tasmania/ Australia.
- [http:// www.dpiw.tas.gov.au/inter.nsf/Attachments/LBUN-8EZ5HA?open](http://www.dpiw.tas.gov.au/inter.nsf/Attachments/LBUN-8EZ5HA?open), last access June 2011.
- Duthie G., Crozier A.** (2000). Plant- derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol*, 11: 43-7.
- Eddouks M., Ouahihi M L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri.** (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5 : 194-203.
- Edeas M.** (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5 : 264-270.
- El Ouariachi E., Bouyanzer A.** (2014). Antioxidant activity of solvent extracts of *Inula viscosa* from Morocco. *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research*, 1(1): 33-40.
- Engelmann I., Dormann S., Saran M., Bauer G.** (2000). Transformed target cell-derived superoxide anions drive apoptosis induction by myeloperoxidase. *Redox Report*, 5(4): 207-214.
- Ennacerie F Z., Filali F R., Moukrad N., Bouymajane A.** (2019). Polyphenols, antioxidant activity and mode of action of antimicrobial compounds of *Dittrichia viscosa* extracts. *Arabian Journal of Medicinal & Aromatic plants*, 5(3):90-106.
- Erlund I.** (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research* 24: 851- 74.
- Favier A, Cadet J, Kalaryanaman R, Fontcave M, Pierre JL.** (1995). *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. New York: Birkhauser.
- Felidj M., Bouazza M & Ferouani T.** (2010). Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (verticillata) dans le parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Geo- Eco- Trop*, 34 : 147-154.

Références bibliographiques

- Forni C., Facchiano F., Bartoli M., Pieretti S., Facchiano A., D’Arcangelo D., Norelli S., Valle G., Nisini R., Beninati S., et al.** (2019). Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *BioMed research international*, 2019:8748253.
- Franco-Mican S.X., Castro J., Campos M.** (2008). Observation du complexe parasitaire de l’inule visqueuse en Espagne et ses méthodes de propagation, *Le Nouvel Olivier*, N°66, nov-déc.
- Fridovich I.** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64: 97-112.
- Friguet B., Bulteau A L., Chondrogianni N** et al. (2000). Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences USA*, 908: 143-54.
- Ghafourifar P., Cadenas E.** (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in pharmacological sciences*, 26(4): 190- 195.
- Ghanemi A.** (2019). Etude phytochimique, analyse chromatographique sur couche mince et évaluation de l’activité antioxydante des extraits des feuilles de *Ficus carica*. Mémoire de master en Biochimie. Univ, Abou Bekr Belkaid- Tlemcen : 33.
- Ghedira K.** (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, Numéro 4: 162- 169.
- Ghosh D.** (2015). Tannins from Foods to Combat Diseases. *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(5): 40-44.
- Guignard J.L.** (2001). Botanique, Systématique moléculaire. Ed. MASSON, Paris. 100-272.
- Guillaume D., Charrouf Z.** (2005). Saponines et métabolites secondaires de l’arganier (*Argania spinosa*). *Cahiers Agricultures*, 14(6): 509-516.
- Haddad S., Khiri I.** (2017). Etude de l’activité insecticide de l’extrait d’*Inula viscosa* à l’égard de deux espèces d’insectes *Ceratitis capitata* et *Tribolium castaneum*. Mémoire de master en Santé des plantes. Univ, Akli mohand oulhadj- Bouira : 29.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J O., Charlier C., Chapelle J P.** (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62:10:628-638
- Halliwell B., Clement M V., Long L H.** (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, 486(1): 10-13.
- Hampton M B., Kettle A J., Winterbourn C C.** (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9): 3007-3017.
- Haoui I E., Derriche R., Madani L., Oukali Z.** (2015). Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 8: 587-590.
- Harborne J.B.** (1998). *Phytochemical methods : A guide to modern techniques of plant analysis*. 3^{ème} Ed. 203-234, Chapman et Hall Thomson science (uk).

Références bibliographiques

- Havsteen BH.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap*, 96: 67-202.
- Hawkins C L., Pattison D I., Davies M J.** (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 25(3-4): 259-274.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, Numéro 1: 3-6.
- Herrera E., Barbas C.** (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(1): 43-56.
- Jaisson S., Desmons A., Gorisse L., Gillery P.** (2017). Vieillesse moléculaire des protéines quel rôle en physiopathologie ?. *Médecine/Sciences*, 33(2):176- 82.
- Kabel AM.** (2014). Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *Journal of Nutrition and Health*, 2 (3): 35-38.
- Kattouf J., Belmoukhtar M., Harnafi H., Mekhfi H., Ziyat A., Aziz M., Bnouham M., Legssyer A.** (2009). Effet antihypertenseur des feuilles d'*Inula viscosa*, *Phytothérapie*, 7: 1-4.
- Kelm M., Dahmann R., Wink D., Feelisch M.** (1997). The nitric oxidersuperoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO₂O₂ interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 9922-9932.
- Khanbabaee K., Van Ree T.** (2001). Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep*, 18: 641-649.
- Klebanoff S J.** (1999). Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(5): 383-389.
- Klein JA., Ackerman S L.** (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 111(6): 785-93.
- Kohen R., Nyska A.** (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6): 620-50.
- Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L.** (2008). Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5): 436-447.
- Koppenol W H., Moreno J J., Pryor W A., Ischiropoulos H., Beckman J S.** (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research toxicology*, 5(6): 834-842.
- Kondratyuk TP., Pezzuto JM.** (2004). Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharmaceutical Biology*, 42 (sup 1): 46-63.
- Kragôzler A.A., Erdag B., Emek Y.G., Uygum D.A.** (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Kumar S.** (2011). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*, 2(1): 129-135.

Références bibliographiques

- Lastra C., Lopez A., Motilva V.** (1993). Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta medica*, 59(6): 497-501.
- Lauro L., Rolih C.** (1990). Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait. *Bollettino della Societa italiana di biologia Sperimentale*, 66(9): 829-34.
- Létard J C., Canard J M., Costil V., Dalbiès P., Grunberg B., Lapuelle J et les commissions nutrition et thérapies complémentaires du CREGG.**(2015). *Phytothérapie-Principes généraux*. Hegel, 5(1) : 29-35.
- Lev E., Amar Z.** (2000). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2): 191-205.
- Lippert W et Podlech D.** *Plantes de Méditerranée*. Éditions Nathan, Paris, France, 1994, 2005, 2008.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N.** (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118-126.
- Luisa Corvo M., Jorge JC., Van't Hof R., Cruz ME., Crommelin DJ., Storm G.** (2002). Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: Formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564(1): 227-36.
- Machlin L J., Bendich A.** (1987). Free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutrients. Symposium presented by the American Institute of nutrition at the 71st Annual meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, April 2; Washington, DC.
- Mahmoudi H., Hosni K., Zaouali W., Amri I., Zargouni H., Ben Hamida N., Kaddour R., Hamrouni L., Ben Nasri M., Ouerghi Z.** (2016). Comprehensive phytochemical analysis, antioxidant and antifungal activities of *Inula Aiton* leaves. *Journal of Food Safety*, 36: 77-88.
- Marfak A.** (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat en Biophysique, Univ, Limoges : 23.
- McCord J M.** (2000). The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American journal of medicine*, 108(8): 652-659.
- Merouane A, Noui A, Medjahed H, Nedjari Benhadj Ali K et Saadi A .** (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle , *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8(4) : 1865-1870.
- Migdal C., Serres M.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4) : 405-12.
- Mohan H.** (2010). Cell injury and cellular adaptations. In: *Textbook of Pathology*. New Delhi: Jaypee Brothers medical publishers, 21-34.
- Moon J-K, Shibamoto T.** (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J.Agric.Food Chem.* 57 (5): 1655-1666.

Références bibliographiques

- Morena M., Martin-Mateo M., Cristol JP., Canaud B.** (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23(5): 201-208.
- Nassar E., Mulligan C., Taylor L., Kerksick C., Galbreath M., Greenwood M, et al.** (2007). Effects of a single dose of N-Acetyl-5- methoxytryptamine (Melatonin) and resistance exercise on the growth hormone/ IGF-I axis in young males and females. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4:14, 1-13.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, et al.** (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut*, 74(4): 418-25.
- OMS (organization mondiale de la santé).** (2007). Who Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines With Reference to Contaminants and Residues. World Health Organization, Geneva, 105 p.
- Osman M, Wong KKY, Fernyhough A.(2006).** ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, 346(1) : 321-329.
- Oueslati K.** (2017). Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande. Thèse de doctorat en Sciences des aliments, Univ, Clermont Auvergne : 25.
- Padayatty S J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee JH, et al.** (2003). Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1): 18-35.
- Pala F S., Gürkan H.** (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology* (1): 1-9.
- Pandey K B., Rizvi S I.** (2009). Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (5): 270-278.
- Parolin P., Scotta ML., Bresch C.** (2014). Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant: a review. *Phyton*, 83 :251-262.
- Pham-Huy LA., He H., Pham-Huy C.** (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical science*, 4(2): 89-96.
- Pietta P G.** (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035-1042.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO.** (1999). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Cancerologie. Medi Sphere* 95.
- Puglia C D., Powell S R.** (1984). Inhibition of cellular antioxidant: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental health perspectives*, 57: 307-11.
- Raha S., Robinson B H.** (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences*, 25(10): 502-508.
- Rates SMK.** (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613.

Références bibliographiques

- 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 & medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Reiter R.J., Carneiro R.C., Oh C.S.(1997).** Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 29: 363-372.
- Rezaire A.(2012).** Activité anti-oxydante , et caractérisation phénolique du fruit palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa).Thèse de doctorat en phytochimie. Université des Antilles et de la Guyane : 98.
- Rizvi S., Raza S T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F.(2014).** The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos University Med J*, 14 (2):157-165.
- Rozenblat S., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H., Cohen Y., Dovrat S. (2008).** Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*,75(2): 369- 382.
- Sachdeva M., Karan M., Singh T., Dhingra S. (2014).** Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Spatula DD*, 4(1): 1-16.
- Sassi A.B., Harzallah-Skhiri F., Bourgougnon N., Aouni M. (2008).**Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research*, 22: 53- 65.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C & Jiménez L. (2005).** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4): 287-306.
- Schinella G R., Tournier H A., Prieto J M., Mordujovich P., Rios J L. (2002).** Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences*, 70(9): 1023-1033.
- Sergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J. (2001).** Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*, 49(9) : 689-695.
- Shahidi F., Naczk M. (1995).** Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.
- Side Larbi K., Meddah B., Tit Touil Meddah A., Sonnet P. (2016).** The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(2): 244-255.
- Sinden J., Jones R., Hester S., Odom D., Kalisch C & James R.(2004).** The economic impact of weeds in Australia. Report to the CRC for Australian Weed Management, 1-65.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965).**Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am.J.Enol.Vitic.*16: 144-158.
- Singleton, V.L, Orthofer, R. & Lamuela – Raventós, R.M.(1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.

Références bibliographiques

- Sirmali R., Giniş Z., Sirmali M., Solak O., Şeliman B., Ağaçkiran Y., Delibaş N.** (2014). Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role on pulmonary contusion experimental model. *Turkish journal of medical sciences*, 44(6): 905-913.
- Sisein E A.** (2014). Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*, 2(2): 110-118.
- Stahl W., Sies H.** (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6): 345-351.
- Stoclet J C., Schini- Kerth V.** (2011). Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69: 78-90.
- Trease G.E., Evans W.C.** (1989). A textbook of pharmacognosy. 13 th Ed bacilluere tinal ltd, London.
- Trimech I., Weiss E K., Chedea V S., Marin D., Detsi A., Ioannou E., Roussis V., Kefalas P.** (2014). Evaluation of anti-oxidant and acetylcholinesterase activity and identification of polyphenolics of the invasive weed *Dittrichia viscosa*. *Phytochem. Anal*, 25: 421-428.
- Turrens J F.** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2): 335-344.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., M T D Cronin., Mazur M., Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P., Bordet R.** (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *Pharmacologie. La lettre du Pharmacologue*, 8(1) : 16-23.
- Vergely C., Maupoil V., Clermont G., Bril A., Rochette L.** (2003). Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 420(2): 209-216.
- Vermerris W et Nicholson R.** (2006). Phenolic Compounds Biochemistry. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vermerris W et Nicholson R.** (2008). Phenolic Compound Biochemistry. Edition Springer: 23.
- Wang W., Ben-Daniel B H., Cohen Y.** (2004). Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94: 1042-1047.
- Waterman P G., Mole S.** (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell, Oxford.
- Wollenweber E., Mayer K., Roitman JN.** (1991). Exudate flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochemistry*, 30(7): 2445-2446.
- Yasui K., Baba A.** (2006). Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflammation research*, 55(9): 359-63.

Références bibliographiques

Yegen O., Berger B., Heitefuss R. (1992). Investigations on the fungitoxicity of extracts of 6 selected plants from Turkey against phytopathogenic fungi. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. J Plant Dis Prot*, 99: 349-59.

Yoshikawa T., Naito Y. (2002). What Is Oxidative Stress?. *Japan Medical Association Journal*, 45(7): 271-276.

Zeguerrou R., Guesmia H., Lahmadi S. (2013). *Recueil des plantes médicinales dans la région des Ziban*. Edition Dar El Houda, Algérie. ISBN : 978-9931-438-00-7.

Zillich O V., Schweiggert- Weisz U., Eisner P., Kerscher M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 37: 455-464.

Zucker W V. (1983). Tannins: does structure determine function? an ecological perspective. *The American Naturalist*, 121: 335-365.