



Antibiotiques Antifongiques
physico-chimie,
synthèse et activité biologique

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences, de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire
En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique
et à l'effet antioxydant des extraits d'*Ammi visnaga L.***

Présenté Par : M^{elle} BERCISSE Horiya

JURY

Mr Djaziri R	Professeur	Président	Université de Tlemcen
M^{me} Benmansour M	Maître assistante	Examinatrice	Université de Tlemcen
M^{me} Merghache D	Maître assistante	Examinatrice	Université de Tlemcen
M^{elle} Benariba N	Maître de conférences	Promotrice	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2014- 2015

Dédicace

A mes chers parents

En témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études. Que Dieu leurs prête santé.

A mes beaux-parents, mes belles sœurs et mes beaux-frères en témoignage de mon affection et ma reconnaissance pour leurs encouragements.

A mes belles sœurs Khadidja et Ikram, qui ont partagé avec moi des moments de joie, mais aussi des moments difficiles. Je leur suis profondément reconnaissante.

A tous mes amis et à tous ceux qui nous ont témoigné leur affectation et leur soutien durant cette année.

HORIYA.B

Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à **m^{elle} Benariba N.**, Maître de conférences au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de m'encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Mr Djaziri R.**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier **M^{me} Merghache D.**, maître assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Je remercie également **M^{me} Benmansour M.**, maître assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.*

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous mes amis du laboratoire pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

A toute la promotion de master « Biochimie appliquée », année 2014-2015.

Enfin je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'objectif de cette étude est porté sur l'étude phytochimique de différents extraits d'*Ammi visnaga*: extrait aqueux d'ombelles entières fraîches, de graines, et d'ombelles entières sèches sans graines ; ainsi que sur l'évaluation de l'effet antiradicalaire de cette plante sur le radical libre DPPH.

Le screening phytochimique de ces extraits a révélé la présence de polyphénols (tanins et flavonoïdes) dans les extraits : aqueux d'ombelles entières fraîches, aqueux de graines et aqueux d'ombelles entières sèches sans graines. Les résultats du dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux, montrent que l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches est plus riche par rapport aux autres extraits en composés polyphénoliques et en flavonoïdes avec un taux de 83,28 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 43,72 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait.

Concernant l'activité antioxydante, les extraits aqueux d'ombelles entières fraîches, aqueux de graines et aqueux d'ombelles entières sèches sans graines, à la concentration 1mg/ml, ont réduit 95,51%, 62,62% et 57,38% du DPPH respectivement. L'acide ascorbique (4,5µg/ml) réduit le DPPH à 92,63%.

L'effet antioxydant de ces extraits est principalement dû à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes, ce qui incite l'étude *in vivo* de cette plante sur le stress oxydatif.

Mots clés : *Ammi visnaga*, activité antiradicalaire, polyphénols.

Liste des abréviations

α -TO[•] : Radical α -tocophérol.

α -TOH: dérivé du tocophérol.

¹O₂ : dioxygène singulet.

ABTS: acide 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique.

ADN : acide désoxyribonucléique.

Asc O⁻ : ascorbate.

CAT: catalase.

DPPH: 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E₁ : Extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines.

E₂ : Extrait aqueux de graines.

E₃ : Extrait aqueux d'ombelles entières fraîches.

FRAP : pouvoir antioxydant de réduction ferrique.

GP_x : glutathion peroxydase.

GR : Glutathion réductase

GSH : glutathion réduit.

GSSG: Glutathion-disulfure.

H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène.

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane.

LOO[•]: radical peroxyde lipidique.

LOOH: hydroperoxyde lipidique.

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

O₂^{•-} : anion superoxyde.

OH[•] : radical hydroxyl.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PHGPx: phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase.

ROS: Reactive Oxygen Species.

SOD: Superoxyde dismutase.

Table de matière

Introduction	1
Synthèse bibliographique	2
Matériels et méthodes	
1. Matériel végétal.....	18
2. Préparation des extraits.....	18
2.1 Extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines.....	18
2.2 Extrait aqueux de graines.....	19
2.3 Extrait aqueux d'ombelles entières fraiches.....	19
3. Tests phytochimiques.....	21
4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	23
4.1 Préparation des extraits pour le dosage.....	23
4.2 Dosage des polyphénols totaux.....	23
4.3 Dosage des flavonoïdes totaux.....	25
5. Pouvoir antioxydant des extraits d' <i>Ammi visnaga</i>	27
5.1 Principe de la méthode DPPH.....	27
5.2 Mode opératoire.....	27
5.3 Expression des résultats.....	29
5.3.1 Pourcentage de réduction du DPPH.....	29
5.3.2 Détermination IC ₅₀	29

Résultats et interprétation

1. Les rendements des extraits d'ammi visnaga.....	30
2. Les tests phytochimiques.....	31
3. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	32
4. L'activité antiradicalaire d' <i>Ammi visnaga</i>	33
Discussion	37
Conclusion	40
Références bibliographiques	41

Liste des figures

Figure 01 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	4
Figure 02 : Structures des formes oxydée et réduites de l'acide ascorbique.....	7
Figure 03 : Mécanisme de régénération potentiel entre l' α -tocophérol (α -TOH), l'ascorbate (Asc O ⁻) et les flavonoïdes (FI) dans les systèmes membranaires.....	8
Figure 04 : Structure des tocophérols	8
Figure 05 : Structure des principaux caroténoïdes.....	9
Figure 06 : Quelques substances antioxydantes produites pas les champignons endophytes	11
Figure 07 : <i>Ammi visnaga</i> (L.) LAM.....	14
Figure 08 : Formules chimiques de la khelline, visnadine et visnagine.....	15
Figure 09 : <i>Ammi visnaga</i> (L.) LAM.....	18
Figure 10 : Schéma explicatif de la préparation des extraits aqueux à partir des ombelles d' <i>Ammi visnaga</i>	20
Figure 11 : Forme libre et réduite du DPPH.....	27
Figure 12 : Courbe étalon de l'acide gallique.....	32
Figure 13 : Courbe étalon de la catéchine.....	32
Figure 14 : Réduction du DPPH par l'acide ascorbique.....	35
Figure 15 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graine	35
Figure 16 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux de graines.....	35
Figure 17 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux d'ombelles entières fraiches.....	35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Effet antioxydant de quelques plantes médicinales sur le radical libre DPPH...12	12
Tableau 02 : Effet antioxydant de quelques plantes médicinales sur la réduction du fer (Méthode de FRAP).....13	13
Tableau 03 : Dosage de polyphénols dans les extraits des ombelles d' <i>Ammi visnaga</i>24	24
Tableau 04 : Dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits des ombelles d' <i>Ammi visnaga</i> .26	26
Tableau 05 : Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits d' <i>Ammi visnaga</i> sur le DPPH.....28	28
Tableau 06 : Rendements et caractéristiques des extraits d' <i>Ammi visnaga</i>30	30
Tableau 07 : Screening phytochimique des extraits d' <i>Ammi visnaga</i>31	31
Tableau 08 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits d' <i>Ammi visnaga</i>33	33
Tableau 09 : Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C après 30 min d'incubation.....34	34
Tableau 10 : Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits aqueux d'ombelles d' <i>Ammi visnaga</i>34	34
Tableau 11 : IC ₅₀ de réduction du DPPH par les extraits d' <i>Ammi visnaga</i> et de la vitamine C.....36	36

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt de certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé (**Packer et al., 1999 ; Middleton et al., 2000**).

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, le sélénium et les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes (**Meziti, 2008**). A cet effet, des études scientifiques réalisées sur l'activité antioxydante de quelques plantes médicinales ont révélé l'importance des composés phénoliques dans ce pouvoir. Parmi ces plantes : *Echium pycnanthum* Pomel., *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*., *Prasium majus* L. et *Solenostemma oleifolium* (**Chaouche, 2014**).

Ammi visnaga (khella) est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde dans la médecine traditionnelle. Les extraits de graines de cette plante sont largement utilisés, depuis des siècles pour soulager les douleurs causées par les calculs rénaux. Cette plante contient de la khelline, une substance efficace contre les spasmes et utilisée dans les médicaments qui soignent l'asthme. Les études récentes soulignent des propriétés curatives extraordinaires et prometteuses : Antispasmodique, Antiasthmatique, Relaxant, Vasodilatateur, antimicrobienne et antioxydante (**Bnouham et al., 2002**).

L'objectif principal de notre étude est basé sur une étude phytochimique ainsi qu'une évaluation *in vitro* de l'activité antiradicalaire des extraits d'*Ammi visnaga*. Dans ce but nous avons procédé à une préparation des extraits aqueux à partir des ombelles de cette plante ; une analyse phytochimique des extraits préparés avec un dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux; ainsi une évaluation de l'effet antiradicalaire des extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Synthèse bibliographique

Connues depuis l'antiquité, aromatique, sédative ou curative, les plantes médicinales peuvent se révéler redoutables. C'est Hippocrate qui différencie usage interne et usage externe et qui définit la notion de dose qui permet de distinguer la drogue du poison (Colette, 2005). C'est au 18^{ème} siècle que les plantes acquièrent leurs identités telles qu'on les connaît aujourd'hui, à savoir un double nom latin indiquant le genre et l'espèce (Colette, 2005).

Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (Strobel, 1996).

En général, le corps humain est mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapeutique exclusivement chimique. L'homme est habitué à consommer et à digérer différentes espèces de plantes, qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives. La ligne de démarcation entre les propriétés nutritives et les propriétés curatives n'est pas toujours très nette. Le citron, la papaye, l'oignon et l'avoine sont-ils des aliments ou des médicaments ? En réalité, ils sont les deux à la fois. Le citron (*Citrus limon*) possède une teneur élevée en vitamine C, favorisant la résistance aux infections, ce qui en fait un allié précieux contre le rhume et la grippe ; la papaye (*Caricapapaya*) est par fois utilisée comme vermifuge; l'oignon (*Allium cepa*) prévient les affections des bronches ; l'avoine (*Avenasativa*) augmente l'énergie. De ce fait, la phytothérapie prend tout son sens lorsque la frontière entre aliments et médicaments disparaît (Larousse, 1997).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'intégration de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles et/ou l'apparition des effets secondaires ont mené les chercheurs à étudier et mettre en évidence les effets thérapeutiques des plantes médicinales (Nostro et al., 2000).

Selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) plus de 80% de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (Farnsworth et al., 1985).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

Ces dernières années, la consommation des aliments d'origine végétale constitue un enjeu de santé publique. En effet, beaucoup d'études épidémiologiques ont démontré qu'une alimentation riche en végétaux réduit considérablement le risque de plusieurs maladies comme les accidents cardiovasculaires et certains types de cancers (**Douchet et al., 2005**).

A côté de ces aliments, les plantes médicinales forment une autre ressource phytogénétique qui ne cesse de susciter l'intérêt de la communauté. En effet, depuis des temps immémoriaux, les herbes et les épices ont été utilisées non seulement pour leurs pouvoirs aromatisants mais aussi leurs propriétés médicinales, antiseptiques et conservatrices (**Almeida-Doria et Regitano-Dercen, 2000**).

Les propriétés préventives des plantes médicinales et des aliments d'origine végétale sont dues à la présence de vitamines C, E et A, de caroténoïdes et des composés phénoliques qui sont des molécules dotées d'un pouvoir antioxydant d'où leur importance dans la régulation du stress oxydatif (**Guo et al., 2003**).

Le phénomène d'oxydation, généré par les radicaux libres, affecte aussi bien l'organisme humain que les différents groupes alimentaires existants (**Rolland et al., 2004**). Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre dans la balance oxydant/antioxydant provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par diminution des défenses antioxydantes, ce qu'on appelle le stress oxydatif (**Baudin, 2006**). Pour échapper aux graves séquelles de stress oxydant, il y a nécessité de maintenir de l'équilibre entre oxydant et antioxydant, afin de préserver les performances physiologiques optimales de l'organisme (**Derbel et Ghedira, 2005**).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale des radicaux (**Girodon et al., 1997; Sohal et al., 2002**). Le stress oxydant c'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Sergeant et al., 1998**). Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydatif, plusieurs équipes

de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress et ses pathologies associées.

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (**Tarnawski et al., 2006**). Ils désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres et certaines molécules qui sont des agents d'oxydation et /ou facilement convertis en radicaux libres ; dont les plus courants: le radical hydroxyl (HO^\bullet), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet ($^1\text{O}_2$) endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**Luximon Ramma et al., 2002 ; Dasgupta et De, 2007**).

Pour lutter contre la génération des ROS et prévenir les maladies qui en résultent, les organismes vivants possèdent des antioxydants, présents en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, sont capables de retarder ou empêcher de manière significative l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les ROS ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci (**Halliwell, 1991**). Il existe de très nombreuses sources d'antioxydants tant ceux fabriqués par l'organisme (antioxydants endogènes) que ceux qui sont fournis par les aliments (antioxydants exogènes) (**BENBROOK, 2005**).

Les antioxydants endogènes sont des enzymes comme le superoxyde dismutases (SOD), la catalase (CAT), la glutathion réductase et la glutathion peroxydase (GPX) élaborés par notre organisme à l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge. Ces enzymes sont considérées comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (*fig.1*) (**MIKA et al., 2004**).

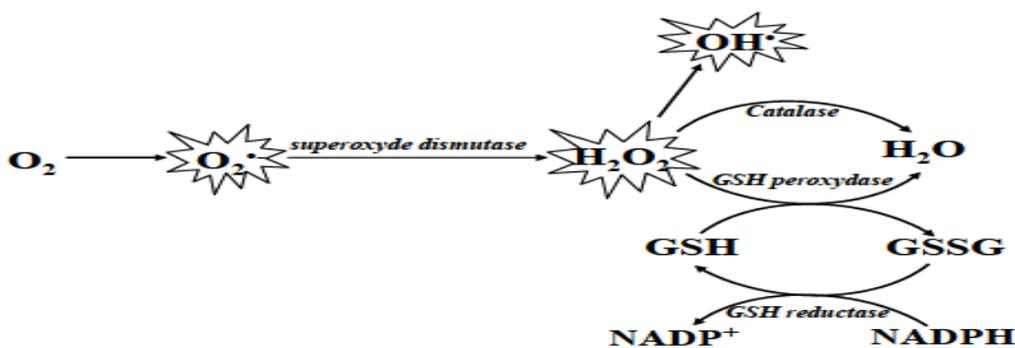
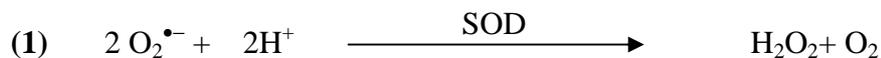


Figure 1- Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (**MIKA et al., 2004**).

Le superoxyde dismutase (SOD) existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD); une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (**Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz et al., 2001**). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (**Huang et al., 2001**). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (**Sentman et al., 2006**). C'est une enzyme responsable de la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée (1) (**Lehucher-Michel et al., 2001**).



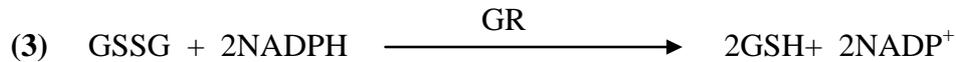
La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂ (2). Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (**Mates et al., 1999; Powers et Lennon, 1999**).



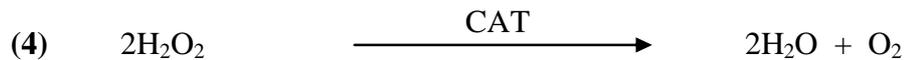
Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique.

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons (3). En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment

pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Mates et al., 1999 ; Nomura et al., 2000).



La catalase (CAT) est également responsable de l'élimination d'H₂O₂ par une transformation en H₂O et O₂ (4) :



Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Mates et al., 1999 ; Powers et Lennon, 1999).

En ce qui des antioxydants exogènes non enzymatiques nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), caroténoïdes, ubiquinones, et les vitamines E et C, etc.

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (Ji et al., 1992).

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, et diminuer ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (Power et Lennon, 1999 ; Packer et al., 1997). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du

stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmente (Ji et al., 1992).

Sous leurs formes semi-radicalaires, les ubiquinones jouaient un rôle fondamental dans la production des ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Packer et al., 1997).

La vitamine C (ou acide ascorbique) est considérée presque à l'unanimité comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain. Grâce au faible potentiel redox du couple ascorbate / radical ascorbyle, la vitamine C est en mesure de céder un électron à presque tous les radicaux libres pouvant intervenir dans un système biologique (radicaux superoxydes, hydroxyles, tocophéroxyles, et peroxyes) (Vergely et Rochette, 2003).

La vitamine C est représentée par deux formules chimiques, résultats d'une transformation réversible (fig.2) (Léger, 2006) :

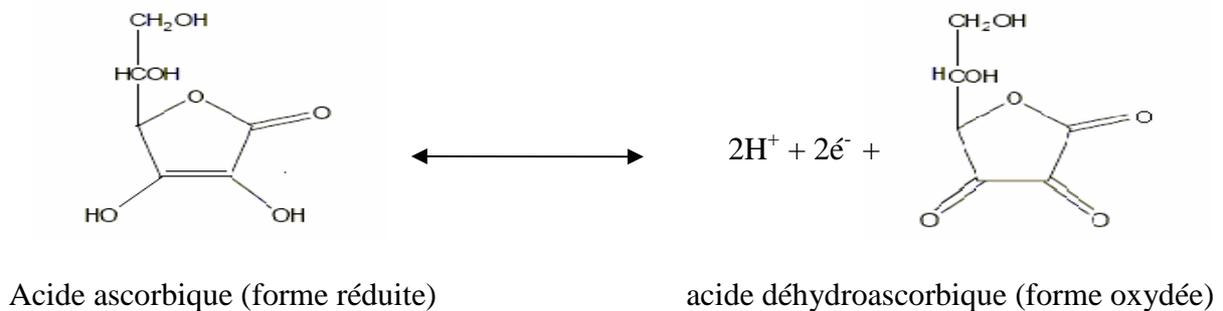


Figure 2- Structures des formes oxydée et réduites de l'acide ascorbique (Léger, 2006).

Le rôle de la vitamine C ou l'ascorbate (Asc O⁻) (fig.3) est par ailleurs essentiel dans la régénération du radical tocophéroxy (α -TO[•]) dérivé du tocophérol (α -TOH). La vitamine C induit une synergie entre les deux molécules. Tappel (1968) est le premier à suggérer cette aptitude *in vivo* en déterminant la défense antiradicalaire des membranes biologiques (Laguerre et al., 2007 ; Léger, 2006).

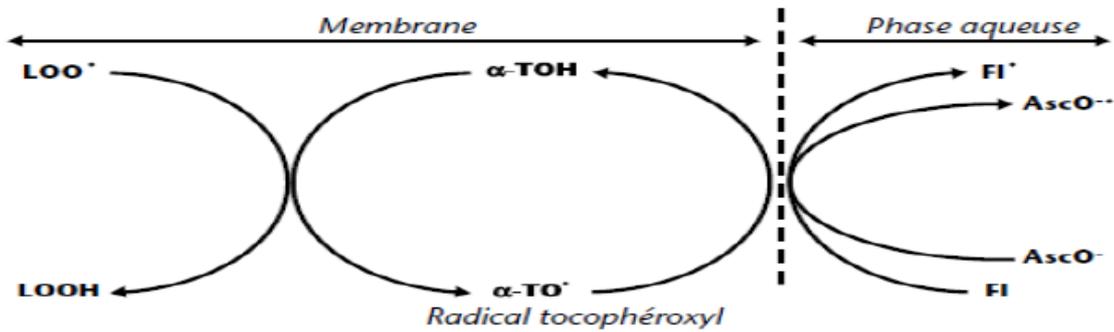


Figure 3- Mécanisme de régénération potentiel entre l’ α -tocophérol ($\alpha\text{-TOH}$), l’ascorbate ($Asc O^\bullet$) et les flavonoïdes (FI) dans les systèmes membranaires (Léger, 2006). (LOO^\bullet) : radical peroxyde lipidique, ($LOOH$) : hydroperoxyde lipidique

La vitamine E appartient à la famille des tocophérols, molécules naturelles lipophiles, apportées par l’alimentation (Toussaint et al., 2003). Elle existe sous quatre formes α , β , γ et δ -tocophérol, se distinguant les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique (fig.4) (Causse, 2005). Elle est représentée globalement par α -tocophérols (Vergely et Rochette, 2003).

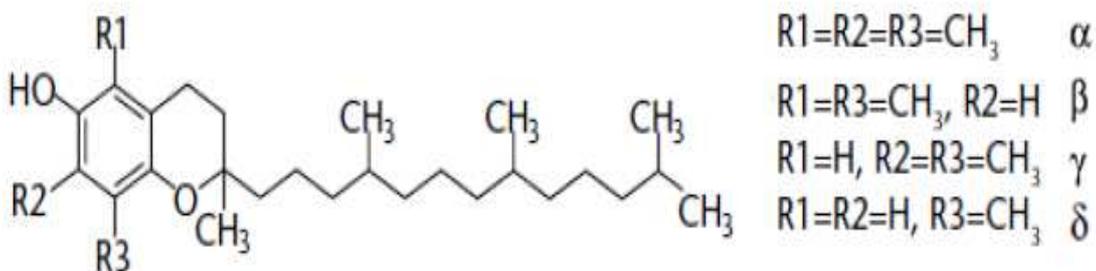


Figure 4- Structure des tocophérols (Laguerre et al, 2007).

Par son activité, le tocophérol, est une substance antioxydante puissante grâce tout particulièrement à son caractère lipophile. Il est en mesure d’inhiber la propagation de la peroxydation en réduisant les peroxydes lipidiques membranaires en alcool correspondant. En échangeant un électron libre. Le tocophérol se transforme en radical tocophéroxyle. Peu

réactif de par sa structure cyclique. Le radical tocophéroxyde peut être régénéré par l'ascorbate (Vergely et Rochette, 2003 ; Toussaint et al., 2003)

Les caroténoïdes, avec plus de 600 sortes, sont des pigments liposolubles synthétisés par les végétaux à qui ils attribuent une couleur orange, rouge ou jaune. Les plus importants sont α -carotène, β - carotène, lycopène, zéaxanthine, β -cryptoxanthine et lutéine (fig.5) (Causse, 2005). Le groupe des caroténoïdes comprend des molécules tétraterpéniques (C₄₀) formées par l'enchaînement de huit unités isopréniques (Derbel et Ghedira, 2005). Parmi les fruits et légumes riches en caroténoïdes on cite souvent : les carottes, les épinards, les tomates, les navets, les laitues et brocolis ((Derbel et Ghedira, 2005).

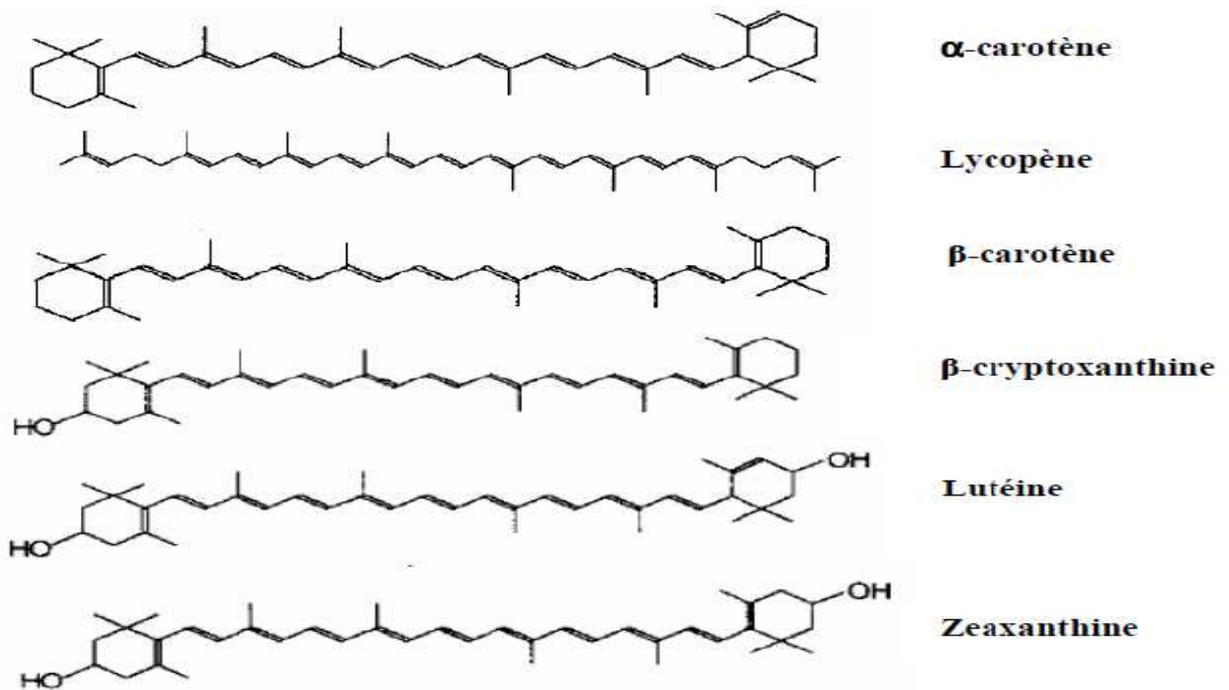


Figure 5- Structure des principaux caroténoïdes (Laguerre et al., 2007).

Les caroténoïdes sont les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet par la désactivation de 1O_2 en 3O_2 (5) :

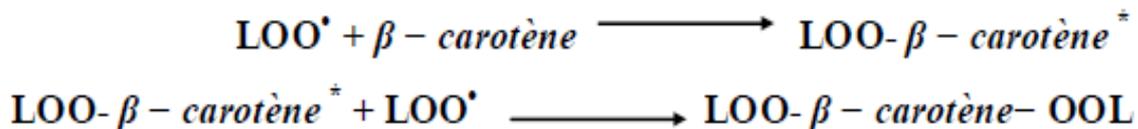


Grace au long système polyénique conjugué de ces molécules, l'excès d'énergie de leur état excité (β -carotène*) est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou leur environnement (6) :



Par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le β -carotène régénéré peut réinitier un nouveau cycle de séquestration de l' $^1\text{O}_2$ et constitue de ce fait un piègeur non stœchiométrique (Laguerre et al., 2007). On pense généralement que chaque molécule de caroténoïde pourrait piéger environ 1000 molécules d' $^1\text{O}_2$, avant de réagir chimiquement et de former un produit (Laguerre et al., 2007).

Il en ressort que les caroténoïdes et les tocophérols contribueraient de façon égale à la protection tissulaire contre les effets délétères de l' $^1\text{O}_2$, puisque Laguerre et al., (2007) estiment que les tocophérols sont environ 30 fois plus abondants que le β -carotène, *in vivo*. Le β -carotène empêche la peroxydation lipidique, le mécanisme d'action étant illustré ci-dessous (Laguerre et al., 2007) :



Certains caroténoïdes exercent une action protectrice contre les rayonnements UV au niveau de la peau et des yeux (Causse, 2005). Ainsi la lutéine et la zéaxanthine s'accumulent au niveau des tissus oculaires et s'avèrent intéressants dans la prévention de la cataracte et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. On suggère pour d'autres composés appartenant à cette classe un rôle protecteur à l'encontre de divers cancers comme le cancer du poumon, et celui de la prostate. Le lycopène diminue également la prévalence des maladies cardiovasculaires, le cancer et l'athérosclérose (Derbel et Ghedira, 2005 ; Joanny menvielle-Bourg, 2005). Deux fois plus puissant que le β -carotène et dix fois plus que la vitamine E.

En plus de divers antioxydants naturels (vit C, E, caroténoïdes,...) présents dans les plantes médicinales, les légumes et les fruits, les champignons endophytes peuvent être une source potentielle de nouveaux antioxydants tels que la Pestacin et isopestacin (Fig. 6) qui sont obtenues à partir de *Pestalotiopsis microspora*, un champignon endophytes isolé de

Terminaliamorobensis (Harper et al., 2003). L'activité antioxydante de l'isopestacin est attribuée au balayage à la fois des superoxydes et des radicaux libres en solution et une similarité structurale avec les flavonoïdes, celle de pestacin est attribuée principalement au clivage d'une liaison réactive C-H et dans une moindre mesure par le biais de l'abstraction de la liaison O-H (Pimentel et al., 2011 ; Strobel et al., 2004).

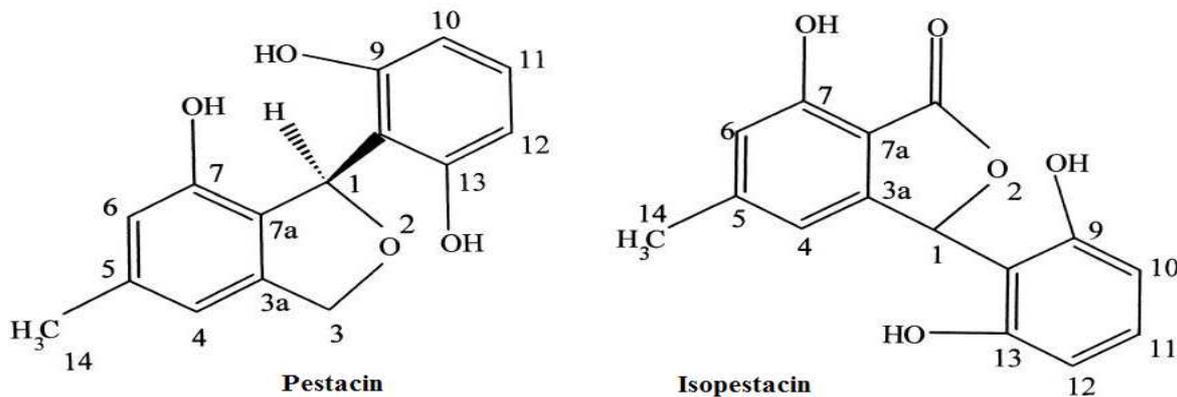


Figure 6-Quelques substances antioxydantes produites pas les champignons endophytes (Strobel et al., 2004).

Autre champignon qui peut renforcer l'activité antioxydante du thé noir (ou vert) c'est le *kombucha*. Le thé Kombucha est une boisson sucrée transformée par un Ferment *Kombucha* (Rollan, 2003). Le résultat est une boisson acidulée et rafraîchissante qui possède des effets bénéfiques sur la santé. Le *Kombucha* agit comme un adjuvant fonctionnel pour le maintien des activités antioxydantes dû aux pigments flavonoïques, détoxifiantes de l'organisme dû à l'acide gluconique qui empêche la peroxydation, et solubilise les toxines. En plus la présence de l'acide chlorogénique inhibe les substances carcinogènes (nitrosamines) (Rollan, 2003).

Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de substances antioxydantes d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse. De même, un certain nombre du secteur industriel se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (Taviano et al., 2013). A cet effet, des études scientifiques s'intéressent à la phytochimie et aux activités des extraits de plantes, dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels (Chaouche, 2014). Les travaux réalisés sur l'activité antioxydante de quelques plantes médicinales ont révélé l'importance des composés phénoliques dans ce pouvoir.

Extraits des plantes : *Echium pycnanthum* Pomel., *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*., *Prasium majus* L. et *Solenostemma oleifolium* riches en tanins condensés et en flavonoïdes provoquent une forte réduction du DPPH', avec des valeurs d'IC₅₀ de 2,9 à 10,95 µg/ml (**Chaouche, 2014**). Autres recherches scientifiques réalisés dans le domaine de l'activité antioxydante des plantes médicinales sont mentionnés dans le **tableau n° 1 et 2**.

Tableau1 : Effet antioxydant de quelques plantes médicinales sur le radical libre DPPH.

Plante	Partie utilisées	Extrait	Réduction du DPPH (IC ₅₀)	Références
<i>Rumex vesicarius</i> L.	Plante entière	Chloroformique Acétate d'éthyle	0,034 mg/ml 0,25mg/ml	[Bouras et Houchi, 2013]
<i>Mitragyna ciliata</i>	Ecorces	Extraits méthanoliques	0,0105±0,288mg/ml	[Bidie et al., 2011]
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	Partie aérienne	Extrait aqueux Extrait méthanolique	0,02264± 0,82mg/m 0,01665±3,18mg/ml	[Benbrinis, 2012]
<i>Disthemonanthus benthamianus</i>	Feuilles	Extraits méthanoliques	0,00450 ± 0,288 mg/ ml	[Bidie et al., 2011]
<i>Arbutus unedo</i> L.	Fruite Feuille	Extrait hydrométhanolique	0,003 mg/ml	[Bakchiche et al., 2014]
<i>Satureja calamintha</i>	Feuilles	Extraits méthanoliques Extraits aqueux	2,075 mg/ml. 1,876 mg/ml.	[Bougandoura et al., 2012]
<i>Chrysophyllum perpulchrum</i>	Ecorces	Extraits méthanoliques	0,004±0,288mg/ml	[Bidie et al., 2011]
<i>Trichilia prieuriana</i>	Ecorces	Extraits méthanoliques	0,0075 ± 0,288 mg/ml	[Bidie et al., 2011]

Tableau2 : Effet antioxydant de quelques plantes médicinales sur la réduction du fer (Méthode de FRAP).

Plante	Partie utilisées	Extrait	Réduction ferrique	Références
<i>Satureja calamintha</i>	Feuilles	Extrait méthanolique	C = 2,5mg/ml DO = 0,484	[Bougandoura et al., 2012]
<i>Myrtus communis</i> L. (Rayhane)	Fruit Feuilles Tiges	Extrait méthanoliques	C = 0, 5 mg/ml. DO = 0,66 DO = 0,56	[Kanoun, 2011]
<i>Punica granatum</i> L.	Epicarpe	Extrait hydrométhanolique	C = 0,5 mg/ml DO=2,5	[Belkasem et al., 2014]
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill	Pelure Pulpe	Extrait aqueux	C = 0.125 mg/ml DO = 0.746 DO = 0.329	[Messaouda, 2013]

Dans le but d'étudier les effets thérapeutiques ainsi que la phytochimie de quelques plantes médicinales Algériennes nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Ammi visnaga*, appelée communément : « Bachnikha ».

Le nom *Ammi* vient du grec ammos, qui signifie «sable», en rapport avec le terrain où pousse la plante. *Visnaga*, le nom de la variété, dériverait de «bis acutum» qui veut dire «à double pointe». Les vieux noms latins étaient *Cuminum alexandrinum*, *C. aethiopicum* et *C. regium* (cumin alexandrin, éthiopien ou royal). Khella, le nom arabe de la plante, est utilisé dans tout le Moyen-Orient et souvent aussi en Europe (Vogel, 2013).

L'*Ammi* est originaire du delta du Nil et on l'utilisait déjà comme remède dans l'ancienne Egypte comme l'indique le papyrus d'Eber. La médecine populaire s'en servait

alors pour traiter les calculs urinaires et vésicaux, concomitants de la bilharziose qui est fréquente dans la contrée. Dans les souks orientaux, on vend encore aujourd'hui les ombelles séchées de la plante dont les tiges sont utilisées comme cure-dents (**Vogel, 2013**). La khella est très efficace contre divers troubles respiratoires (bronchite, emphysème et coqueluche). En Espagne, autrefois les Andalous lavaient leurs dents avec les graines de cette plante (**Larousse, 1997**). Elle est utilisée également contre les maux de ventre et de l'utérus. Les graines étaient autrefois utilisées contre la stérilité, les crampes de l'uretère et les calculs rénaux (**Vogel, 2013**).

L'herbe annuelle ou bisannuelle pousse au printemps sous la forme d'une tige dressée, ronde et cannelée, atteignant de 80 à 120 cm de hauteur. Les feuilles gris vert ont environ 20 cm de long ; elles sont disposées en chevrons et pennées. Le haut de la tige est ramifié et légèrement recourbé. Les grandes ombelles terminales réunissent par fois jusqu'à une centaine de pédicelles portant à leur tour de petites ombelles à fleurs blanches (**fig. 7**). A maturité, les pédicelles épais et rigides sont rétractés et forment comme un nid. Leur goût est agréable et après leur lignification, on les utilise comme cure-dents. Les petits fruits lisses et ovales tombent quand ils sont secs; à la déhiscence, ils donnent deux graines d'un brun grisâtre, d'environ 2 mm de long (**Vogel, 2013**) (**fig. 7**).



Figure 7- *Ammi visnaga* (L.) LAM (Francis, 1979).

Cette plante se caractérise par ailleurs par son hygrochésie, c'est-à-dire que les pédicelles des ombelles s'étalent en milieu humide et se recroquevillent en cas de sécheresse. Les ombellifères de nos contrées sont xérochasiques, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent en séchant et se referment à l'humidité. La floraison a lieu en Juillet (**Vogel, 2013**).

Originnaire d'Afrique du Nord, le khella pousse à l'état sauvage au Moyen-Orient et dans les autres pays méditerranéens. Il s'acclimaté en Australie et en Amérique du sud (**Larousse, 1997**).

Les études phytochimiques de khella (*Ammi visnaga* L.) ont révélé sa richesse en diverses molécules tel que **Furanochromones** (-py-ones) 2-4%: comprenant la khelline (0,3-1,2%), visnagine (0,05-0,3%), khellol et son glucoside, khellenin, khellinol, ammiol et son glucoside, visammiol, khellinone et la visnaginone ; **Pyranocoumarines** (visnagans) 0,2-0,5% comprenant la visnadin, samidine et dihydrosamidin ; **Furanocoumarines**: traces de xanthotoxine et de l'ammoidin ; **Flavonoïdes** (0,02-0,03%) comprenant la quercétine, isorhamnetine et leurs 3-sulphates, et le kaempferol ; **Volatiles**: camphre, carvone, (terpinéol, terpinène-4-ol, linalol, cis et trans oxydes de linalol) ; **Huile fixe**: 12-18%, **Protéines**: 14% (Sonnenberg et al., 1995).

La khelline, la visnagine et la visnadin (*fig.8*) sont les principes actifs des fruits d'*Ammi visnaga*. Ils sont ainsi utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le traitement de l'angine et de l'asthme (Sittig, 1988 ; Grayna et al., 1998 ; Kleeman et al., 1999).

La teneur de ces composés dans les fruits secs varie largement selon les facteurs génétiques et les conditions environnementales (Gynayd et Erim, 2002).

La khelline est la chromone présentant des propriétés spasmolytiques. La visnadin a des propriétés antispasmodique et vasodilatatrice des coronaires.

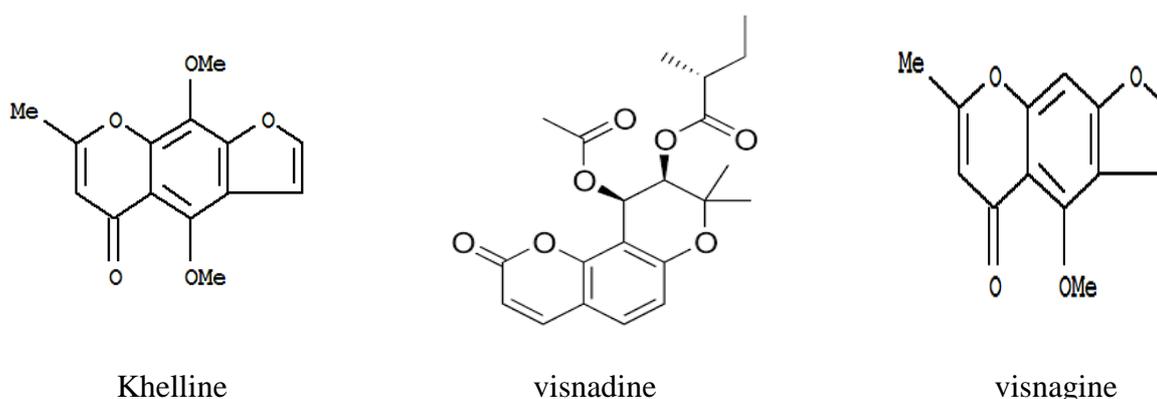


Figure 8- Formules chimiques de la khelline, visnadin et visnagine.

En 1946, un pharmacologue travaillant en Egypte a découvert le puissant effet antispasmodique produit par la khelline et la visnagine du khella sur les petits muscles des branches, sur les artères coronaires qui conduisent le sang vers le cœur et sur les canaux urinaires. L'effet relaxant de cette plante sur les petits muscles bronchiques dure jusqu'à 6 heures et n'entraîne pratiquement aucun effet secondaire. La **khelline** est un médicament prescrit en cas d'asthme largement utilisé en médecine classique (Larousse, 1997). Elle est

utilisée dans le traitement de la crise d'asthme, et l'insuffisance coronarienne. Cependant c'est dans le traitement de la colique hépatique et surtout dans celui de la colique néphrétique que la khelline s'est révélée la plus utile (**Verdrager, 1978**).

La khella contient une quantité importante de méthoxalène (psoralènes), et sa réputation comme traitement du psoriasis semble donc justifiée. Les plus récentes études ont permis de mieux comprendre le mode d'action du traitement à base de psoralènes. Ces substances complexes inhibent la division cellulaire, ce qui ralentit la reproduction cellulaire excessivement rapide qui provoque les plaques des psoriasis (**James, 1997**).

Une étude ethnobotanique des plantes médicinales a été réalisée dans le cercle de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb). Elle a été faite dans le but d'établir le catalogue des plantes médicinales et de réunir toutes les informations concernant les usages thérapeutiques pratiqués par la population locale dans la région étudiée. A l'aide de 280 fiches questionnaires, les enquêtes ethnobotaniques sur le terrain ont été menées pendant deux campagnes (2006 et 2007). Les résultats obtenus ont permis de recenser 149 plantes médicinales qui se répartissent en 127 genres et 52 familles parmi lesquelles six sont les plus dominantes, notamment les *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Poaceae*, *Solanaceae* et *Fabaceae*. Ils montrent que le feuillage et la graine constituent les parties les plus utilisées et la majorité des remèdes est préparée sous forme de décoction (**Benkhniqie et al., 2011**).

Les résultats obtenus constituent une source d'informations très précieuse pour la région étudiée et pour la flore médicinale nationale. Ils pourraient être une base de données pour les recherches ultérieures dans les domaines de la phytochimie et de la pharmacologie et dans le but de chercher de nouvelles substances naturelles (**Benkhniqie et al., 2011**).

Parmi ces plantes les graines d'*Ammi visnaga L.* (Khella, Bachnikha) en décoction sont utilisées contre le diabète, à raison de prendre une demi cuillère à café dans un demi litre d'eau. La décoction des trois ombelles dans un litre d'eau est indiquée contre le diabète et que l'ombelle de Khella est efficace en cas de fièvre typhoïde (**Benkhniqie et al., 2011**).

D'autres études ethnobotaniques réalisées dans la région de Tlemcen, ont recensé plus de 56 espèces dont 23 sont les plus utilisées par les diabétiques de la région, notamment, *Trigonella foenum graecum* (Halba), *Berberis vulgarise* (Ghris), *Nerium oleander* (Defla), *Laurus nobilis* (Rend), *Nigella sativa* (Sanouj), *Punica granatum* (Romman), *citrullus colocynthis* (Handal) et *Ammi visnaga lam.* (**Benmehdi, 2000 ; Allali et al., 2008**).

Des travaux scientifiques réalisés par **Khalfallah et al. (2011)** ont montré que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est principalement caractérisé par la présence de l'isobutyrate d'isobutyle, linalol, l'acide 2,2-dimethylbutanoïque, thymol, acétate de bornyl, et le coveacin. Cette huile essentielle présente une activité antibactérienne contre les souches d'*Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae*. En outre, *Ammi visnaga* présente une activité antioxydante dont l'extrait butanolique assure une réduction du radical libre (78,7%) à la concentration 200 µg/ml (**Kabouche et al., 2011**).

L'objectif principal de notre étude est basé sur une étude phytochimique ainsi qu'une évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits d'*Ammi visnaga*, en utilisant un radical libre DPPH• Pour ce faire, nous envisageons de réaliser au cours de la partie expérimentale ;

- ✓ Une préparation des extraits aqueux à partir des ombelles d'*Ammi visnaga* ;
- ✓ Une analyse phytochimique des extraits préparés ;
- ✓ Un dosage du taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans ces extraits ;
- ✓ Une valorisation de l'activité antioxydante des extraits de cette plante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude c'est les ombelles d'*Ammi visnaga*, récolté en mois de Février et Mai 2015 dans la région de Sidi Abdelli wilaya de Tlemcen. Au laboratoire, les ombelles sont séchées, puis les graines et les fleurs sont récupérées séparément et conservées au laboratoire jusqu'au jour de l'extraction (**fig.9**).



Figure-9 Matériel végétal : *Ammi visnaga* (L.).

A : ombelles fraîches ; **B** : graines (photos prise au laboratoire), **C** : ombelles sèches.

2. Préparation des extraits à partir d'*Ammi visnaga*

A partir des ombelles entières fraîches et séchées, nous avons préparé différents extraits aqueux. La **fig.10** résume le protocole d'extraction.

2.1 Extrait aqueux d'ombelles entières sèches (E₁)

A partir d'ombelles sèches, les graines sont éliminées et le reste de la matière végétale est préparés par infusion comme suit :

- 400 ml d'eau distillée bouillante est versée sur 20g d'échantillon végétal découpés en petits morceaux pendant 30 min ;
- Filtration de la solution obtenue ;
- Evaporation à sec du filtrat dans l'étuve à 37°C ;
- Récupération de l'extrait aqueux sous forme de poudre (E₁)

2.2 Extrait aqueux de graines (E₂)

Les graines récupérées séparément à partir des ombelles sèches sont utilisés pour la préparation de l'extrait aqueux E₂ :

- 600 ml d'eau distillée bouillante est versée sur 20g de graines pendant 30 min;
- Filtration de la solution obtenue ;
- Evaporation à sec du filtrat dans l'étuve à 37°C ;
- Récupération de l'extrait aqueux sous forme de poudre (E₂)

2.3 Extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (E₃)

L'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (séchés dans l'étuve 24h à 37°C) est préparé par **décoction** comme suit :

- 600 ml d'eau distillée est versée sur 50g d'ombelles entières fraîches portés à ébullition pendant 2 heures ;
- Filtration de la solution obtenue ;
- Evaporation à sec du filtrat dans l'étuve à 37°C ;
- Récupération de l'extrait aqueux sous forme de poudre (E₃)

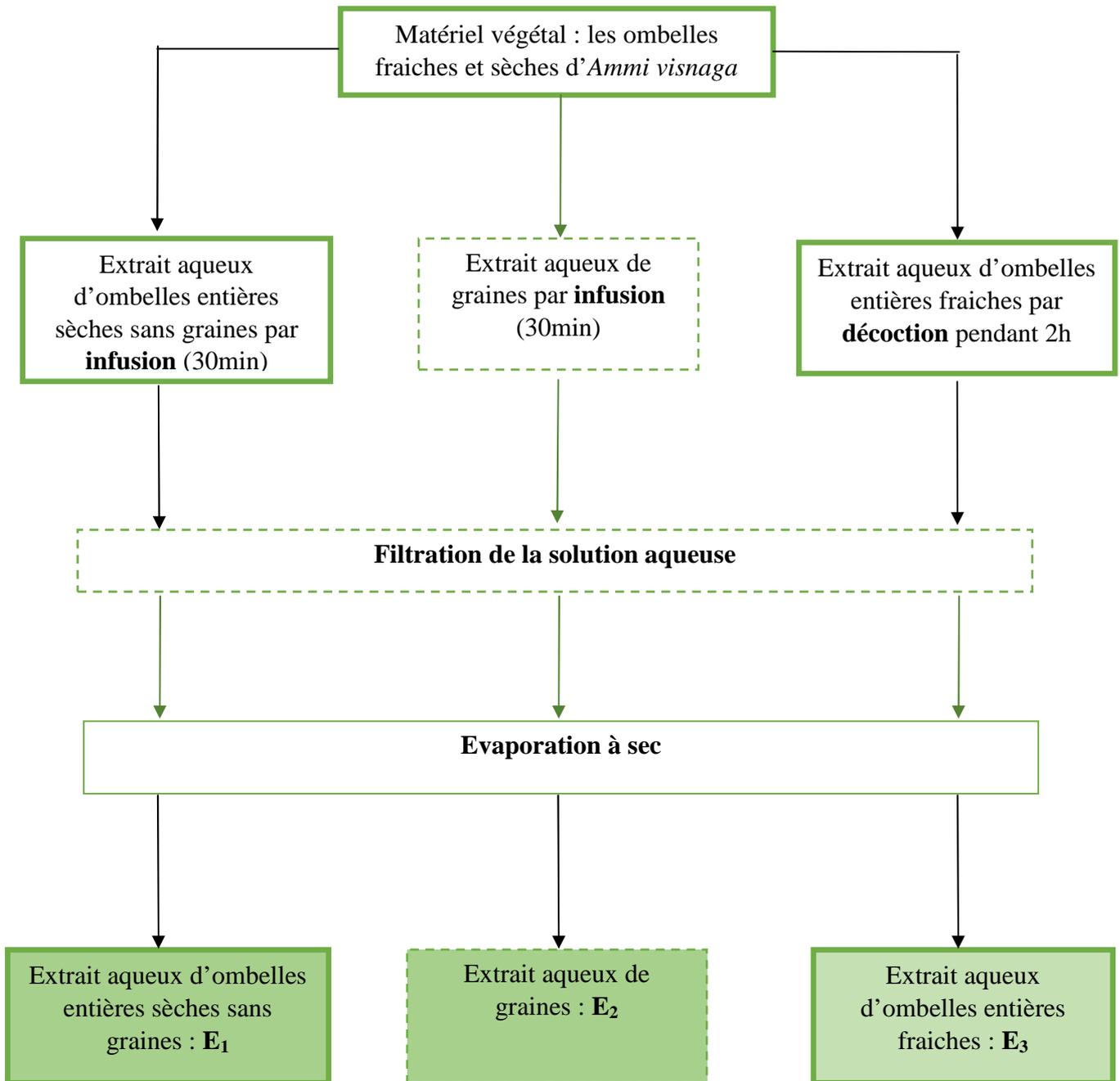


Figure 10- Schéma explicatif de la préparation des extraits aqueux à partir des ombelles d'*Ammi visnaga*.

3. Tests phytochimiques

Dans le but de vérifier la présence ou l'absence de quelques composants phytochimiques, nous avons réalisé quelques tests classiques en utilisant des réactifs chimiques spécifiques (Benariba *et al.*, 2013 ; Karumi *et al.*, 2004).

Tanins

2ml d'extrait plus 2 à 3 gouttes de FeCl_3 (1%) sont incubés pendant 15 min à 50°C , leur présence est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir.

Flavonoïdes

1ml d'extrait est mélangé à 1 ml d'acide chlorhydrique concentré plus 3 ou 4 copeaux de Magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou rose indique la présence des flavonoïdes.

Les quinones libres

5ml d'extrait plus quelques gouttes de lessive de soude (NaOH 1%) développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet en présence des quinones libres.

Les coumarines

5 ml de l'extrait est évaporé à sec, le résidu est dissout dans l'eau chaude (2 ml) ensuite le mélange est partagé en deux parties égales. La première représente un témoin, la deuxième est traitée avec 0,5 ml NH_4OH à 10 %. Une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur le papier filtre. L'observation d'une fluorescence intense (sous U.V 366 nm) révèle la présence de coumarines.

Les anthraquinones

Ajouté 5 ml de NH_4OH (10%) à 10 ml d'extrait, après agitation leur présence est indiquée par une coloration violette.

Les alcaloïdes

Pour révéler la présence des alcaloïdes deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner.

5 ml d'acide chlorhydrique à 1% plus 1 ml de chaque extrait sont chauffés au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer, l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Les terpenoïdes

Deux méthodes ont été utilisées pour détecter la présence des terpenoïdes:

- Test de Libermann-Burchard : A 5 ml de chaque extrait on ajoute 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5ml d'acide sulfurique. Après incubation de 15 min, l'apparition d'une couleur mauve, verte ou violette indique un test positif.
- 5ml d'extrait est ajouté à 2ml de Chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpenoïdes.

Test de mousse pour les saponosides

Dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait aqueux est agité énergétiquement pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

Les sucres réducteurs

A 1 ml de chaque extrait on ajoute 2ml de solution Fehling puis les tubes sont incubés au bain marie pendant 20 min. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique.

4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

4.1 Préparation des extraits

Les extraits aqueux E₁, E₂ et E₃ récupérés à partir des ombelles sont préparés à une concentration de 10 mg/ml.

4.2 Dosage des polyphénols totaux

Principe

Ce dosage repose sur la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (MO₈O₂₃). La coloration présente un maximum d'absorption à 700 nm dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon.

Mode opératoire (Benariba et al., 2013).

- ❖ 0,1ml d'échantillon de chaque extrait sont mélangés avec 2ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% ;
- ❖ Agitation des tubes ;
- ❖ 1^{ère} incubation pendant 5 minutes à température ambiante ;
- ❖ Ajoutez 100 µl du réactif Folin Ciocalteu à 0,2 N ;
- ❖ 2^{ème} incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- ❖ Mesure de l'absorbance (DO) à 700 nm contre le tube blanc (**tableau n° 3**) ;

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations finales (2,27 / 4,54 / 9,1 / 13,63 / 18,18 / 22,72 / 27,27 / 31,81 / 36,36 / 40,90 / 45,45 µg/ml).

Tableau3 : Dosage de polyphénols dans les extraits des ombelles d'*Ammi visnaga*.

Concentration de l'acide gallique (µg/ml)		0	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000				
Volume de l'acide gallique (ml)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1				
Les extraits (ml)	E ₁													0,1			
	E ₂														0,1		
	E ₃															0,1	
Blanc																	0,1
Na₂CO₃ (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1^{ère} Incubation pendant 5 min à température ambiante																	
Folin Ciocalteu (µl)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2^{ème} Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité																	
Mesure de DO à 700 nm																	

Les résultats obtenu exprimés en µg Eq acide gallique/ mg d'extrait sont calculés selon la formule suivante :

[Polyphénols]= a. f / C

- a : concentration des polyphénols (µg / ml) déterminée à partir de la courbe étalon.
- f : facteur de dilution (×22).
- C : concentration d'extrait.

4.3 Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont quantifiés par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

Mode opératoire, représenté dans le tableau n°4 (Benariba et al., 2013)

- ❖ 500 μl de chaque extrait ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée ;
- ❖ Ajoutez 150 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 %.
- ❖ 1^{ère} incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- ❖ Ajoutez 150 μl de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 10 % ;
- ❖ 2^{ème} incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- ❖ Ajoutez 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % ;
- ❖ Le volume total est complété à 5 ml avec de l'eau distillée ;
- ❖ Agitez et incubez pendant 15 minutes ;
- ❖ Mesure de l'absorbance à 510 nm contre le tube blanc;

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à différentes concentrations finales (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Tableau4 : Dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits des ombelles d'*Ammi visnaga*.

Concentration de catéchine (µg/ml)		50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000				
Volume de la catéchine (ml)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5				
Les extraits (ml)	E₁												0,5			
	E₂													0,5		
	E₃														0,5	
Blanc avec MeOH																0,5
Eau-distillé		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaNO₂ (ml)		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1^{ère} Incubation pendant 6 min à température ambiante																
AlCl₃ (ml)		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
2^{ème} Incubation pendant 6 min d'incubation à température ambiante																
NaOH (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Compléter le volume à 5 ml et 3^{ème} incubation pendant 15 min à température ambiante																
Mesure de l'absorbance à 510 nm																

Le taux de flavonoïdes présent dans les différents échantillons exprimé en milligramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (mg EC/mgE) est calculé selon la formule suivante :

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

- a : concentration des flavonoïdes (µg / ml) déterminée à partir de la courbe étalon.
- f : facteur de dilution (×10).
- c : concentration d'extrait.

5. Pouvoir antioxydant des extraits d'*Ammi visnaga*

5-1 Principe de la méthode DPPH

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH réduit change de couleur en virant au jaune (*fig.11*). L'absorbance mesurée à 515 nm sert à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).

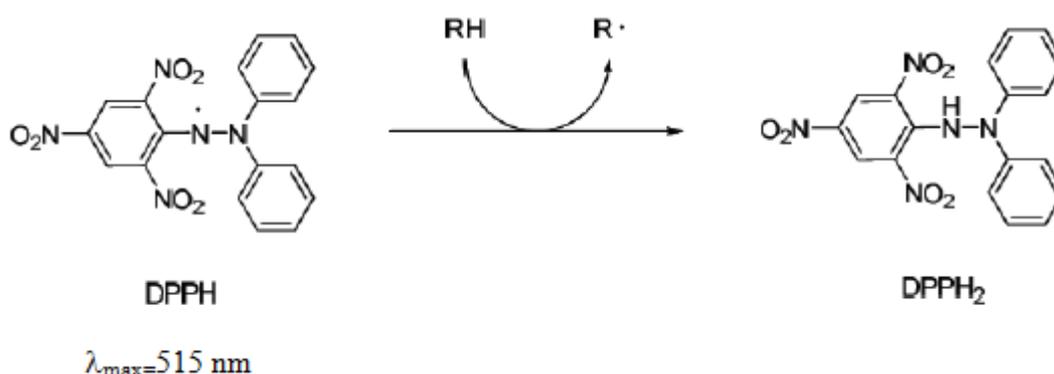


Figure 11- Forme libre et réduite du DPPH (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).

5-2 Mode opératoire, le tableau n°5 résume le protocole de mesure d'activité antioxydante (Benariba *et al.*, 2013).

- ❖ Préparation du DPPH à la concentration de 0,025 mg /ml dans du méthanol;
- ❖ Préparation des extraits dans l'eau distillée à différentes concentrations (2, 4, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40 mg/ml), A 1950 µl de la solution du DPPH on ajoute 50 µl pour chaque extrait à différentes concentration;
- ❖ Préparation du tube blanc pour chaque concentration : 1950 µl du méthanol et 50 µl de chaque extrait correspondant;

- ❖ Préparation du tube control négatif : 50µl du méthanol avec 1950 µl de la solution du DPPH;
- ❖ Le tube blanc : 2ml du méthanol;
- ❖ Incubation 30 min à température ambiante et à l'obscurité ;
- ❖ Mesure de l'absorbance à 517 nm.

L'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif est testé selon le même mode opératoire à différentes concentrations.

Tableau5 : Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits d'*Ammi visnaga* sur le DPPH.

Concentration de l'acide ascorbique (mg/ml)		0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5					
Volume de l'acide ascorbique (ml)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05					
Les extraits (ml) à différentes (2, 4, 8, 10, 12,15, 20, 30, 40) mg/ml	E1												0,05				
	E2													0,05			
	E3														0,05		
Control négatif																	
MeOH (ml)																0,05	
Volume de DPPH (ml)		1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95		1,95	1,95
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité																	
Mesure de l'absorbance à 517 nm																	

5.3 Expression des résultats

5.3.1 Pourcentage de réduction du DPPH

Les résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues. Pour chaque extrait nous avons déterminé le pourcentage de réduction du DPPH selon la formule suivante (Yen et al, 1994) :

$$DPPH (\%) = \frac{(Do\ contr) - (Do\ échan)}{(Do\ contr)} \times 100$$

- **DPPH (%)** : Pourcentage de réduction du DPPH.
- **DO contr**: Densité optique du tube contrôle négatif.
- **DO éch** : Densité optique de l'échantillon.

5.3.2 Détermination IC₅₀

La valeur IC₅₀ est la concentration qui assure la réduction de 50% de l'activité du DPPH déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (Samarth et al., 2008).

Résultats et interprétation

1. Les rendements des extraits d'*Ammi visnaga*

Après extraction et récupération des extraits, leur rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sèche selon la formule suivante :

$$R(\%) = m/m_0 \times 100$$

- **R(%)** : Rendement exprimé en %.
- **m** : Masse en gramme de l'extrait sec récupéré.
- **m₀** : Masse en gramme du matériel végétal initial.

Les résultats obtenus (**tableau n °6**) montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (**E₃**) d'*Ammi visnaga* (10,27%), suivi par l'extrait aqueux de graines (**E₂**), récupéré à partir des ombelles sèches (2,45%), et enfin de l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines **E₁** (2,29 %). Les extraits récupérés sous forme de poudre, sont totalement soluble dans l'eau distillée.

Tableau6 : Rendements et caractéristiques des extraits d'*Ammi visnaga*.

Caractéristiques	Masse (g)	Aspect	Couleurs	Rendement %	solubilité
E₁	0,46	Poudre	Marron	2,29	Eau-distillée
E₂	0,49	Poudre	Marron	2,45	Eau-distillée
E₃	5,13	Poudre	Marron	10,27	Eau-distillée

E₁ : Aqueux d'ombelles entières sèches sans graines.

E₂ : Aqueux de graines.

E₃ : Aqueux d'ombelles entières fraîches.

2. Tests phytochimiques

Les résultats du screening phytochimique réalisé dans les différents extraits d'*Ammi visnaga* sont représentés dans le **tableau n° 7**.

Tableau7 : Screening phytochimique des extraits d'*Ammi visnaga*.

		Extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (E ₃)	Extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines (E ₁)	Extrait aqueux de graines (E ₂)
Flavonoïdes		++	+	+
Tanins		+++	-	+
Quinones libres		-	-	-
Alcaloïdes	Mayer	-	-	+
	Wagner	-	-	+
Saponosides	Test de mousse	++	+++	+++
Terpenoïdes	Libermann-Burchard	-	-	-
Coumarines		-	-	+
Anthraquinones		-	-	-
Sucres réducteurs		+++	+	+

(+++): Test fortement positif
(++): Test positif.

(+): Test faiblement positif
(-): Test négatif.

Selon les résultats mentionnés dans le tableau, on constate la présence de flavonoïdes dans tout les extraits, avec une forte présence dans l'extrait E₃ mais à degré moindre dans les extraits aqueux E₁ et E₂.

Les tanins sont fortement présents dans l'extrait E₃ par rapport aux autres extraits. Les quinones libres, les terpenoïdes, les alcaloïdes, les coumarines et les anthraquinones révèlent un test négatif dans l'ensemble des extraits, seul l'extrait E₂ révèle une faible présence des alcaloïdes. En revanche, les saponosides sont présent dans tous les extraits. Les sucres réducteurs sont notés dans l'ensemble des extraits, mais ils sont fortement présents dans l'extrait aqueux E₃.

3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux

Le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), respectivement.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau n° 8**. Les courbes étalons de l'acide gallique et la catéchine sont représentées dans les **figures 12, 13**.

Selon les résultats du dosage de polyphénols totaux, on remarque dans les extraits E_1 et E_2 des teneurs comparables en polyphénols 43,68 et 40,71 μg . Eq acide gallique par mg d'extrait. Alors que l'extrait E_3 renferme un taux élevé 83,28 μg . Eq acide gallique par mg d'extrait.

De même l'extrait E_3 présente le taux le plus élevé en flavonoïdes 43,72 μg . Eq catéchine/ mg d'extrait, alors que les extraits E_1 et E_2 présentent des taux relativement proches entre 10,29 et 14,39 μg . Eq catéchine/ mg d'extrait.

En fonction de ces résultats on constate que l'extrait aqueux des ombelles fraîches renferment des teneurs moyennement élevées en polyphénols et en flavonoïdes totaux par rapport aux ombelles sèches.

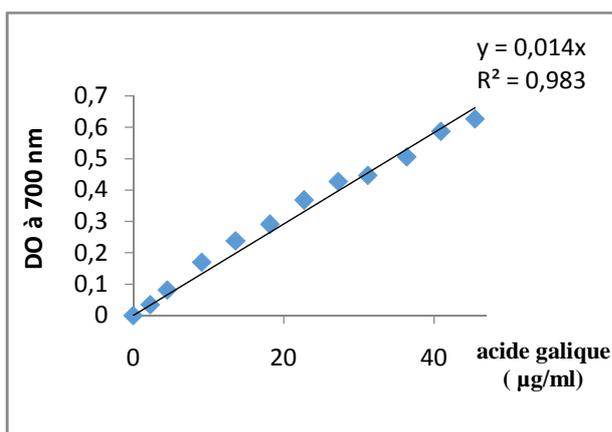


Figure 12 : Courbe étalon de l'acide gallique.

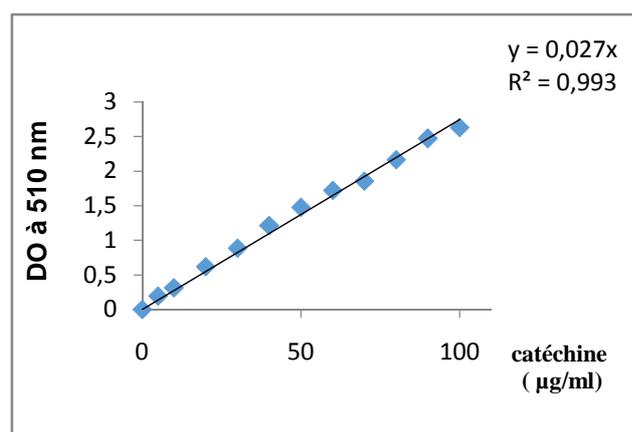


Figure 13 : Courbe étalon de la catéchine.

Tableau8 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits d'*Ammi visnaga*.

	Polyphénols (µg. Eq acide gallique/mg d'extrait)	Flavonoïdes totaux (µg. Eq catéchine/ mg d'extrait)
Aqueux d'ombelles entières sèches sans graines (E₁)	43,68	10,29
Aqueux de graines (E₂)	40,71	14,39
Aqueux d'ombelles entières fraîches (E₃)	83,28	43,72

4. Effet antiradicalaire des extraits d'*Ammi visnaga*

Les résultats de l'effet antiradicalaire de la vitamine C et des différents extraits d'*Ammi visnaga* sur le DPPH sont représentés dans les **tableaux n°9 et 10**.

Après incubation des extraits avec le DPPH, on remarque une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits. A la concentration 0,05 mg/ml l'ensemble des extraits présentent un pourcentage de réduction du DPPH comparable pour l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines (**E₁**) et l'extrait aqueux de graines (**E₂**) 11,87 ; 16,73%, respectivement. Tandis que l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (**E₃**) à cette concentration (0,05mg/ml) présente le pourcentage le plus élevé 91,23%. De ce fait, il était intéressant de tester de faibles concentrations : 0,00025 ; 0,00125 ; 0,0025 ; 0,0125 ; 0,025 et 0,045 mg/ml qui ont assuré des réductions variables entre 22,85 et 50,30 %.

Aux moyennes concentrations (0,3 mg/ml), les extraits aqueux de graines (**E₂**) et d'ombelles entières sèches sans graines (**E₁**) réduisent 43,86 et 33,48 % du DPPH respectivement. Par contre aux fortes concentrations 0,75 et 1 mg/ml, ces extraits montrent un pourcentage qui augmente progressivement de 54 à 62%.

L'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (**E₃**) présente un pourcentage de réduction du DPPH de 22,85% à la concentration de 0,00025mg/ml, et qui va augmenter progressivement (91,23%) avec l'augmentation de la concentration (0,05 mg/ml).

L'acide ascorbique (**tableau n°9**) testé à faibles concentrations (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 µg/ml) assure rapidement une réduction du DPPH qui atteint 92,63%.

Tableau9 : Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C après 30 min d'incubation.

Concentrations de l'acide ascorbique (µg/ml)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
% de réduction du DPPH	3,68	12,63	17,36	28,42	60,52	74,73	84,73	91,05	94,21	92,63

Tableau10 : Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits aqueux d'ombelles d'*Ammi visnaga*.

	Concentrations (mg/ml)														
	0,00025	0,00125	0,0025	0,0125	0,025	0,045	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,375	0,5	0,75	1
E₁	-	-	-	-	-	-	11,87	13,95	23,42	30,08	33,48	42,02	52,46	54,94	57,38
E₂	-	-	-	-	-	-	16,73	17,53	37,36	37,41	43,86	45,14	34,27	68,18	62,62
E₃	22,85	19,82	22,30	30,12	40,66	50,30	91,23	87,07	99,20	97,03	94,92	85,43	98,91	98,22	95,51

E₁ : Aqueux d'ombelles entières sèches sans graines.

E₂ : Aqueux de graines.

E₃ : Aqueux d'ombelles entières fraîches.

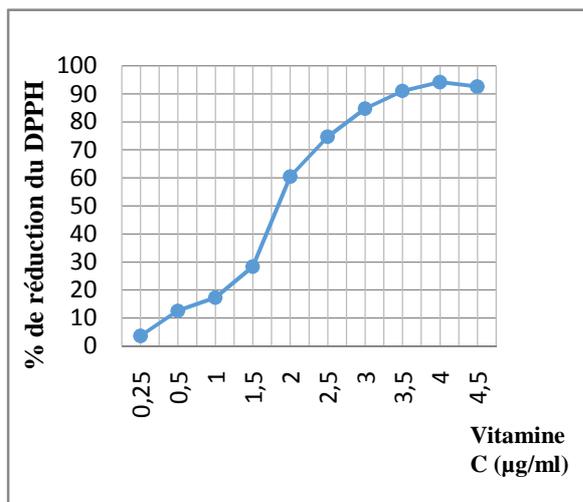


Figure 14 : Réduction du DPPH par l'acide ascorbique.

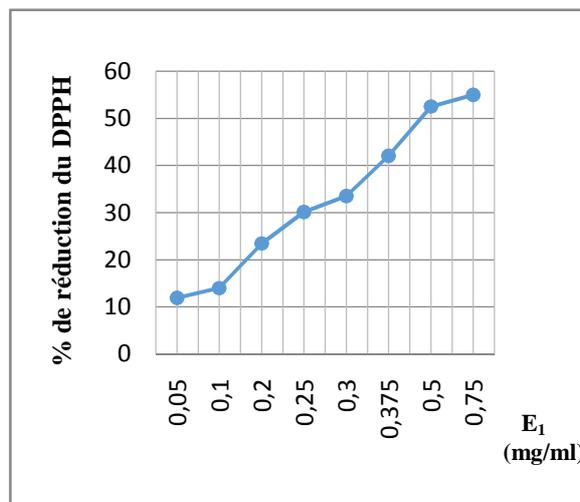


Figure 15 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graine.

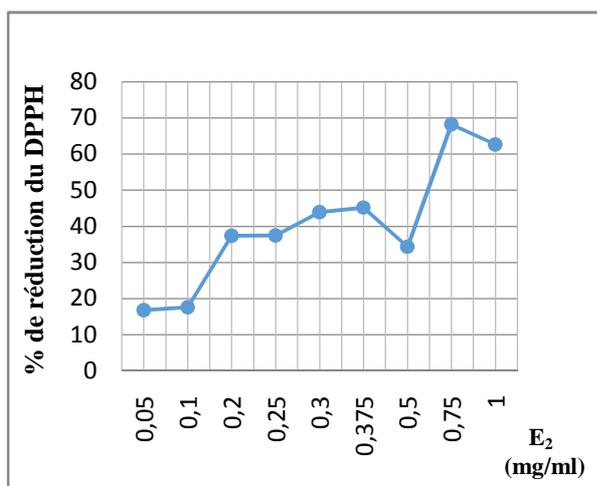


Figure 16 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux de graines.

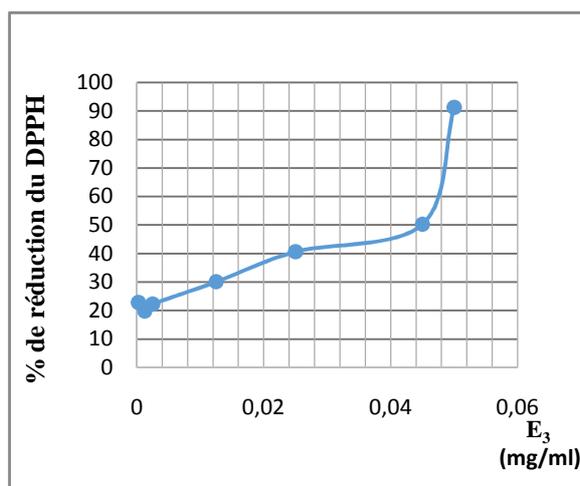


Figure 17 : Réduction du DPPH par l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches.

Les concentrations des extraits et de l'acide ascorbique qui inhibent 50% du DPPH (IC₅₀) déterminés graphiquement (**figures n° 14, 15, 16, 17**) sont mentionnées dans le **tableau n°11**.

D'après valeurs déterminés d'IC₅₀, on constate que l'IC₅₀ la plus faible est de 0,045mg/ml notée pour l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches (**E₃**), suivi par l'extrait aqueux d'ombelles entière sèches sans graines (**E₁**) 0,43mg/ml et l'extrait aqueux de graines (**E₂**) 0,62mg/ml. L'acide ascorbique (IC₅₀ = 0,00185mg/ml) présente un effet nettement faible par rapport aux extraits.

En fonction de ces résultats, on constate que l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches présente un effet antioxydant intéressant par rapport aux autres extraits.

Tableau11 : IC₅₀ de réduction du DPPH par les extraits d'*Ammi visnaga* et de la vitamine C.

	Vitamine C	E₁	E₂	E₃
IC₅₀ (mg/ml)	0,00185	0,43	0,62	0,045

E₁ : Aqueux d'ombelles entières sèches sans graines.

E₂ : Aqueux de graines.

E₃ : Aqueux d'ombelles entières fraîches.

Discussion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des antioxydants naturels. Le nombre de publications sur les antioxydants d'origine végétal reflète leur importance dans plusieurs domaines, médicale ou alimentaire. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et le pouvoir antioxydant de différents extraits d'*Ammi visnaga*.

Ammi visnaga, communément connu sous le nom « Bachnikha », est originaire d'Afrique du Nord, de la famille des Apiacées à fleurs blanches en ombelles. Les pédoncules des ombelles, très nombreux, jaunissent et se tassent les uns contre les autres après la floraison (**Hammouda et al., 2005**).

Dans notre étude, nous avons choisi les ombelles de cette plante, sèches et fraîches, pour préparer différents extraits aqueux.

L'étude phytochimique des extraits : aqueux d'ombelles entières fraîches, aqueux de graines et aqueux d'ombelles entières sèches sans graines, nous a permis de déterminer le rendement massique de chaque extrait. L'extrait aqueux d'ombelles entières fraiches présent un rendement de 10,27% suivi par l'extrait aqueux de graines 2,45% et celui de l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines avec un rendement de 2,29%. Ces résultats est comparables a celle obtenus par **Soro et al., (2015)** où les ombelles entières fraîches, sont utilisés pour l'extraction de l'huile essentielle à partir d'une hydrodistillation dont le rendement est de 0,13 %.

Les tests phytochimiques réalisés dans les extraits préparés, ont permis de mettre en évidence les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les sucres réducteurs dans l'ensemble des extraits. Une absence totale des quinones libres, terpenoïdes, alcaloïdes, coumarines et anthraquinones a été notée dans tous les extraits, seul l'extrait aqueux de graines révèle une faible présence des alcaloïdes.

Certains de ces résultats sont en accords avec l'étude **Amin et al., (2015)** qui ont montré la présence des flavonoïdes et des tanins, ainsi une absence des alcaloïdes dans les extraits aqueux. En outre, les extraits méthanolique, acétone et éthanolique révèlent la présence de ces composés.

Cependant on assiste à quelques différences en comparant nos résultats avec ceux de **Amin et al., (2015)** qui a révélé la présence de terpenoïdes dans les extraits aqueux d'*Ammi visnaga*.

En fonction de ces résultats on constate que cette plante renferme différents métabolites secondaires en particuliers, les flavonoïdes et les tanins qui ont, selon la recherche bibliographique, un effet antioxydant très important.

Ce résultat a été mis en évidence par l'étude de **Dirar et al., (2014)** qui ont isolé et identifié à partir de cette plante cinq nouveaux flavonoïdes : rhamnetin-3-O-glucosides ; rhamnazin-3-O-glucosides ; isorhamnetin-7-O-glucoside ; quercetin-3-O-rutinoside ; quercetin-7,3,3-O-triglucoside.

Au cours de notre analyse phytochimique des extraits d'*Ammi visnaga*, nous avons également déterminé le taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux qui ont permis de démontrer la richesse de ces extraits en ces composés. Le dosage de polyphénols a été réalisé en utilisant le réactif Folin –Ciocalteu. Malgré la sensibilité et la simplicité de cette méthode, elle n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui peut influencer sur les résultats obtenus (**Singleton et Rossi, 1965**).

L'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches est le plus riche en composés polyphénoliques et en flavonoïdes avec un taux de 83,28 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 43,72 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait, suivi par l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines avec un taux de 43,68 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 10,29 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait. La teneur en polyphénols et en flavonoïde de l'extrait aqueux de graines est de 40,71 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait avec 14,39 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait. En comparant nos résultats avec ceux de **Miguel et al., (2014)**, qui ont montré que l'extrait éthanolique présente un taux de 15,10 mg/g, matière sèche en polyphénols et un taux de 2,70 mg/g, matière sèche en flavonoïdes. De ce fait, on constate que nos extraits renferment des teneurs élevées en composés phénoliques. Cette différence est principalement liée à la composition chimique de la plante qui est influencée par des facteurs écologiques (sol, climat, humidité, période de la récolte...) et par les conditions expérimentales au laboratoire, particulièrement les méthodes d'extraction (macération, décoction, infusion...) et les solvants organiques utilisés (eau, méthanol, acétones...).

Dans le but de chercher l'effet antioxydant de *Ammi visnaga* nous avons testé son effet sur la réduction du radical DPPH. Selon **Ozgen et al., (2006)**, Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques d'évaluation de l'activité antioxydante, dans lesquels on

mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant tel que : la méthode ORAC, FRAP, DPPH.

La méthode DPPH utilisée dans notre étude est basée sur l'utilisation du radical DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958; Brand-Williams et al., 1995**) qui s'effectue par la détermination de la réduction du radical DPPH[•] ou par la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH[•] en déterminant l'IC₅₀ et l'activité antiradicalaire (**Popovici et al., 2009**).

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antioxydante montrent que la concentration 1mg/ml d'extraits aqueux d'ombelles entières fraîches, de graines et d'ombelles entières sèches sans graines assurent une réduction du DPPH de 95,51%, 62,62%, 57,38%, respectivement, après 30 min d'incubation, tandis que, l'acide ascorbique peut réduire 92,63 % du DPPH à 4,5µg/ml.

Concernant les valeurs IC₅₀ obtenus, on constate que l'IC₅₀ de l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches est de 0,045 mg/ml, suivi par l'extrait aqueux d'ombelles entières sèches sans graines 0,43 mg/ml et l'extrait queux de graines 0,62 mg/ml. Ces résultats sont nettement inférieurs de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique (0,00185 mg/ml). Cependant on assiste à quelques différences en comparant nos résultats avec ceux de **Amin et al., (2015)** qui ont montré que l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga* présente une IC₅₀ égale à 6 µg/ml contre le Trolox sont utilisé comme contrôle (IC₅₀ =1,5 µg/ml). Nos résultats d'IC₅₀ sont nettement inférieurs par rapport aux résultats déterminés dans les travaux antérieurs.

Selon la bibliographie les métabolites secondaires en particulier les polyphénols sont connus par leurs effets antioxydant en neutralisant les radicaux libres, d'après les résultats des tests phytochimiques et le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux on peut déduire que la plante *Ammi visnaga* à un effet antiradicalaire qui est lié a sa teneur en polyphénols et en flavonoïdes. Ces composés sont dotés d'activité antioxydante en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle ou bien par leurs propriétés chélatrices des ions métalliques (**Pastre et al., 2005**).

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence et l'absence de certaines familles chimiques dans les différents extraits d'*Ammi visnaga*: comme les flavonoïdes les tanins, les sucres réducteurs qui sont présents dans l'ensemble des extraits. Le dosage de polyphénols et de flavonoïdes a révélé un taux moyen dans l'ensemble des extraits. Cette teneur en ces composés semble la responsable de l'effet antiradicalaire de cette plante, notamment pour l'extrait aqueux d'ombelles entières fraîches qui présente une IC₅₀ de 0,045 mg/ml.

A la lumière de ces résultats, cette étude préliminaire nécessite d'autres recherches qui s'intéressent à :

- Détermination des différents constituants chimiques dans autres extraits d'*Ammi visnaga*.
- Diversifier la région et la période de la récolte en vérifiant l'activité antioxydante de cette plante
- Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante, et leur activité antioxydante.
- Evaluation de l'effet antioxydant par d'autres méthodes (FRAP, ORAC, ABTS.....)

1. **Allali H., Benmehdi H., M.A. DIB., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N .,(2008).** “Phytoterapy of Diabetes in West Algeria”. Asian Journal of Chemistry; Vol. 20, N°4: 2701-2710.
2. **Almeida-Dorea R, F., Regitano-Darce A, B., (2000).** Antioxydant level of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil inder thermal oxiaddir ciencia et thechnologia de olimentos 20(2), canpinas May/August; <http://www.scielo.br>.
3. **Amin J, N., Murad A., Motasem A, M., Ibrahem S, R., Ass' ad, J. M., Ayed A, M., (2015).** Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (Ammi visnaga. L.) A member of Palestinian Flora.
4. **Bakchiche B., Gherib A., (2014).** Antioxidant activities of polyphénols extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia. International Journal of Innovation and Applied Studies ISSN 2028-9324 Vol. 9 No. 1 Nov. 2014, pp. 167-172.
5. **Baudin B., (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires, mt cardio, volume 2, numéro 1 ,43-52.
6. **Belkacem N., Djaziri R., Lahfa F., El-Haci., Boucherit Z., (2014).** Phytochemical Screening and In Vitro Antioxydant Activity of Various *Punica granatum l.* Peel Extracts from Algeria: A Comparative Study. Phytothérapie., December 2014, Volume 12, Issue 6, pp 372-379.
7. **Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W, J., & Sener, A. (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35-40.
8. **Benbrinis S., (2012).** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*.
9. **Benbrook M., (2005).** Accroitre la teneur antioxydants des aliments grâce à l’agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed.The organic center: 6-8.
10. **Benkhniq o., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi1 A., Douira A, (2010-2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Bot. Barc. 53: 191-216.
11. **Benmehdi H., (2000).** Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique

- appliquée. Département de chimie faculté des sciences Université Tlemcen. Biochem Biophys, 397:342-344.
12. **Bidie A. dit Philippe., Banga B., Adou F., Jean D., Allico J., (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature Vol. 8 N°1: 1 - 11.
 13. **Blois M, S., (1958).** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature. (181) :1199-1200.
 14. **Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A. and Ziyat (2002).** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int. J. Diab. Metab. 10: 33-50.
 15. **Bouhandoura N., Bendimered N., (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/Juin 2013. Pages 14 à 19.
 16. **Bouras F, Z., Houchi A., (2013).** Etude de l'activité antioxydante de la plante.
 17. **Brand-Williams W., Cuvelier M, E., Berset C., (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, 28, 25-30.
 18. **Causse C., (2005).** Les secrets de santé des antioxydants. Edition Alpen s.a.m, pp: 95.
 19. **Chaouche T, M (2014).** Contribution a l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelque plantes médicinales. Doctorat en biologie option biochimie. Université Abou-Bakr-Belkaid Tlemcen.
 20. **Colette E., (2005).** Etude photochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako : 147 P.
 21. **Dasgupta N, B., (2007).** Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. Food Chemistry 101, 471 – 474.
 22. **Dauchet L., Amouyel P, R., Dallongeville J., (2005).** Consommation de fruits et légumes et risque d'accident vasculaire cérébral et cardiaque : Méta-analyse des études épidémiologiques prospectives. Cah. Nutr. Diet, 40 (1), 31-40.
 23. **Derbel S., Ghedira K., (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé phytothérapie, numéro 1,28-34.
 24. **Dirar A, I., Mohamed M, A., Osman W, J., Abdalgadir H., & Khalid H, S., (2014).** A Phytopharmacological Review on Four Antitumor Medicinal Plants Grown in Sudan. *Am. J. PharmTech Res*, 4(5), 28-41.

25. **Elqaj M., Ahami A., Belghyti D., (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
26. **Farnsworth N, R., Akerele O., Bingel A, S., (1985).** Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ 63:965-81.
27. **Francis C., (1979).** Identifier les fleurs du maroc atlantique par leurs couleurs.
28. **Girodon F., Blache D., Monget A, D., Lombart M., Brunet-Lecompte P., Arnaud J., Richard M, J., Galan P., (1997).** Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. J Am Coll Nutr 16: 357-365.
29. **Grayna Z., Dragan T., Gourniak K., Basiura E., (1998).** Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and *Ammi visnaga* fruits by combined solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **797** (1-2), 305-309.
30. **Guo C, yang J., Wer J, L, XU, T., Jiang Y., (2003).** Antioxydants activities of peel, pulp, and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, Nutur, Res, **23**, 1719-1726.
31. **Gynayd K., Erim B., (2002).** Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **954**, 291- 294.
32. **Halliwell B., (1991).** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* **91**(3C):14S-22S.
33. **Halliwell B., (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, **52**: 253-265.
34. **Hammouda F, M., Ismail S, I, Abdel-Azim N, S and Shams K, A (Eds: Batanouny K.H.), (2005).** A Guide to Medicinal Plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation. Malaga. 2005.
35. **Harper J, K., Arif A, M., Ford E, J., Strobel G, A., Porco J, A., Tomer J, r, D, P., O'Neill K, L., Heider E, M., Grant D., Pestacin M.,(2003).** A 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 2003; **59**: 2471-2476.
36. **Huang D, B., Prior R, L (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* **53**:1841-1856.

37. **Huang T,T., Carlson E,J., Kozy H,M., Mantha S., Goodman S,I.,(2001).** Ursell PC and Epstein CJ (2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med* 31, 1101-1110.
38. **James A, D, P, H.D., (1997).** La pharmacie verte. Édition Rodale page 464.
39. **Ji L, L., Fu R., Mitchell E, W., (1992).** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73, 1854-1859.
40. **Joanny Menvielle-Bourg, F. (2005).** Plantes et vieillissement, données actuelles, phytothérapie, Numéro 2,57-71.
41. **Kabouche Z., Jay M., (2001).** Flavonols and antioxidant activity of Ammi visnaga L. (Apiaceae). *Rec Nat Prod* 2011; 5 (1):52-55.
42. **Kanoun K., (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen ; Faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers. Laboratoire de produits naturels.
43. **Karumi Y., Onyeyili P, A., Ougbuaja V, O., (2004).** Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *Med Science.* 4, p: 179–82.
44. **Khalflah A., Labed A., Semra Z., Aikaki B., Kabouche A., Touzani R., Kabouche Z., (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Ammi visnaga L. (apiaceae) from Constantine, Algeria. *Int.J.Med.Arom.plants.* ISSN 2249-4340. Vol.1, No.3, pp. 302-305.
45. **Kleeman A., Engel J., Kutcher B., Reichert D., (1999).** *Pharmaceutical Substances, Synthèses, Patents, Applications.* AM, 4th ed., Thieme, New York, 1 380 p. Laboratoire Symbiotec ZA Les Pousses 31270 Villeneuve-Tolosane, e-mail:symbiotec@wanadoo.fr.
46. **Laguerre M., Lopez-Giraldo L, L, J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P., (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL*, volume 14, numéro 5,278-292.
47. **Larousse., (1997).** Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soins. Larousse. P 11-12.
48. **Leger C, L., (2006).** Antioxydant d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interaction. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, volume 13, numéro 2 ,213-222.

49. **Lehucher-Michel M, P., Lesgards J, F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., (2001).** LIMOGES.187 p.
50. **Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee M, A, and Aruoma O, I., (2002).** Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5042-5047.
51. **Mates J, M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I., (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
52. **Messaouda Hireche (2013).** Dosage des Polyphénols de la tomate et étude de leur pouvoir anti oxydant. Université de Hassiba Ben Bouali Chlef Algérie - Master 2 nutrition numaine 2013.
53. **Meziti A., (2008).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Etude in vitro et in vivo. Ministère de l'enseignant supérieur et de la recherche scientifique. Université El-haj Lakhdar.
54. **Middelton E., Kandaswami C., Theoarides T, C., (2000).** The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation. *Heart Disease & cance*, 52: 675-752.
55. **Miguel M., Bouchamaa N., Aazza S., Gaamoussi F., & Lyoussi B. (2014).** Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants. *Fresenius Environ Bull*, 23, 1375-88.
56. **MIKA A., MINIBAYEVA F., BECKETT R., LÜTHJE S., (2004).** Possible functions of Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p.
57. **Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T and Nakagawa Y., (2000).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 351, 183-193.
58. **Nostro A., Germano M, p., D'angelo V., Marino A., Cannatelli M, a., (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliqué.* 30 (5), p379.
59. **Okado-Matsumoto A., Fridovich I., (2001).** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388-38393.

60. **Ozgen M., Reese R, N., Tulio J, R, A, Z., Scheerens J, C., and Miller A, R., (2006).** Modified 2, 2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1151-1157.
61. **Packer L., Rimbach G., Virgili F., (1999).** Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus Maritima*) bark, Pycnogenol., *Free Radic. Biol. Med*, 27: 704- 24.
62. **Packer L., Tritschler H, J., Wessel K., (1997).** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.
63. **Pastre J., Pastre O., Pastre C., (2005).** Interêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation. Thèse de vétérinaire. Université de Toulouse.
64. **Pimentel M, R., Molina G., Dionisio A, P., Marostica Junior M, Rand Pastore G, M., (2011).** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011; doi:10.4061/2011/576286.
65. **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B, (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de Génie Industriel* 4 : 25-39.
66. **Powers S, K., Lennon S, L (1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.
67. **ROLLAN S., (2003).** Le Kombucha une ancienne boisson pour rajeunir la santé. Laboratoire Symbiotec ZA Les Pousses 31270 Villeneuve-Tolosane, e-mail:symbiotec@wanoadoo.fr.
68. **ROLLAND Y., (2004).** Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux. *Rosaceae plant rots. Food Chem.* 2007, 100 (2): 579-83. *Rumex Vesicarius L.* Mémoire d'analyse et contrôle de qualité. Université Kasdi Marbah Ouargla.
69. **Samarth R, M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A.; (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106: 868-873.
70. **Sentman M,L., Granstrom M., Jakobson H., Reaume A., Basu S and Marklund S,L., (2006).** Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281, 6904-6909.

71. **Sergeant C., Hamon C., Simonoff M., Constans J., Conri C., Peuchant C., Delmas- Beauvieux M, C., Clerc C., Pellegrin J, L., Leng B., Pellegrin I., Fleury H., (1998).** Oxidative Stress in Cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. New York- Basel-Hong Kong, 409-427.
72. **Singleton V, L., Rossi J, A., (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-153.
73. **Sittig M., (1988).** *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia. Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens.* Noyes Publications. 2nd ed., 707 p.
74. **Sohal R, S., Mockett R, J., Orr W, C., (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med* 33: 575-586.
75. **Sonnenberg H., Kaloga M., (1995).** "Isolation and characterization of an angular-type dihydropyranocoumaringlycoside from the fruits of *Ammi visnaga* (L.) LAM. (Apiaceae)". *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences* 50(9-10): 729-731. {a} Inst. Pharmazeutische Biol., Freie Univ. Berlin, Koenigin- Luise-Str. 2 and 4, D-14195 berlin, Germany.
76. **Soro K, N., Sabri L., Amalich S., Khabbal Y., Zair T., (2015).** Composition chimique d'*Ammi visnaga* L. (Lam.) marocaine et activité antibactérienne de son huile essentielle vis-à-vis de bactéries productrices et non productrices de beta-lactamases à spectre élargi. *Phytothérapie*, 1-8.
77. **Strobel G., (1996).** Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, *Microbiology*, Vol 142: 435-440.
78. **Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004; 67: 257-268.
79. **Sturtz L, A., Diekert K., Jensen L, T., Lill R and Culotta V, C., (2001).** A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276, 38084-38089.
80. **Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B., (2006).** HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 182–188.

81. **Taviano M, F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De-Pasquale R., Miceli N., (2013).** *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “Berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.
82. **Toussaint J, F., Jacob M, P., Lagrost L., Chapman J., (2003).** L'athérosclérose physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Edition Masson, 776 p.
83. **Verdrager J., (1978).** Ces médicaments qui nous viennent des plantes (ou les plantes médicinales dans les traitements modernes). Page 128 129 130 131. maloine s.a. éditeur.
84. **Vergely C., Rochette L., (2003).** Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. Médecine thérapeutique Cardiologie, Volume 1, Numéro 3, 131 – 139.
85. **Vogel A., (2013).** Encyclopédie des plantes. L'univers des plantes médicinales; Act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 2000, 153 (1- 2): 1-5.
86. **Yen G, C., Duh P, D., (1994).** Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J. Agri, Food Tech.*, 42: 629-632.