

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

*Université A. Mira de Bejaia*  
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Physico-Chimique*

## *Mémoire de Fin de Cycle*

*En vue de l'obtention du diplôme d'études supérieures en*  
*Biologie Moléculaire et cellulaire*

*Option : Biochimie*

*Thème*



**L'activité antioxydante des extraits  
de feuilles d'*Inula viscosa*.**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> : RAHMOUNI Karima

M<sup>elle</sup> : REDOUANE Houria

**Devant le jury :**

Présidente : M<sup>elle</sup> LAIB Y.

Promotrice : M<sup>me</sup> KRAOUCHE née KHEYAR .N

Examinatrice : M<sup>elle</sup> BOUCHEFFA. S

*Promotion 2011/2012*



## Remerciements



✧ *Au terme de ce travail, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour le réaliser.*



✧ *Nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice M<sup>me</sup> KRAOUCHE née KHEVAR.N, pour avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité.*



✧ *Mes sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury : M<sup>lle</sup> Laib .Y, qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury. M<sup>lle</sup> Boucheffa .S pour avoir accepté d'examiner ce travail.*



✧ *Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles et nos ami(e)s qui ont nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tous au long des années.*





## Dédicaces

☞ Grâce à la bonne volonté, l'acharnement, Dieu tout puissant m'a donné la force et le courage pour la réalisation de ce travail que je dédie :

☞ A mes très chers parents pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée, leur soutien moral et financier. C'est grâce à eux que je suis là, rien ne peut rendre même le minimum des choses merci encor.

☞ A Mon grand frère L'ahcen et sa femme Sara et la petite charmante Marame.

☞ A Mon très Cher ghanou que je le souhaite tout le Bonheur du Monde.

☞ A Mon petit frère Laid que je le souhaite une très bon continuation dans tous les domaines.

☞ A ma grande sœur Malya et son mari Hacem et leurs enfants Ayoub et Ishak,

☞ A mes petites sœurs Kahina, Aicha que je le souhaite la succession dans leur vie.

☞ A mes copines de chambre: Kahina, Saloua, Lynda, Warda, et Anissa et son fiancé (M).

☞ A ma binôme Karima que j'ai partagé se modeste travail et sa famille

☞ A tous les ami (e)s qui m'ont soutenu de près ou de loin.

☞ A tous ceux que j'aime.

Houria 





# Dédicaces

*✿ C'est avec une pensée pleine de reconnaissance inspirée par la générosité et la gentillesse que je dédie ce modeste travail en remerciant d'abord le bon Dieu tout puissant de m'avoir accordé le courage, la volonté et la patience.*

*✿ A mes chers parents qui m'ont vraiment soutenues que Dieu les protèges.*

*✿ A mes très chers frères : Hamza et Abdeladim à qui je souhaite beaucoup de succès dans leurs vies.*

*✿ A mes très chères sœurs : Fella à qui je souhaite une vie fleurissante, avec son mari, sans oublier Loubna, Khadidja, Ahlem et Yasmin à qui je souhaite tout le succès .*

*✿ A toute ma famille, mes ancêtres, tantes, cousins et cousines.*

*✿ A toutes mes copines : Anissa, Kahina, Linda, Safoua et Warda.*

*✿ A tout mes ami(e)s.*

*✿ A ma binôme Houria et sa famille ; et tout particulièrement à mon cher Adel.*

*Karima ✍*



# Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance.

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.

**AlCl<sub>3</sub>** : chlorure d'aluminium.

**BHA** : HydroxyAnisole Butylé.

**BHT** : HydroxyToluéne Butylé.

**CAT** : Catalase.

**DPPH** : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl.

**EDTA** : Ethylénediaminotétraacétique.

**Fe<sup>2+</sup>** : Ions ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Ions ferriques

**GPS** : Glutathion Peroxydase.

**GSH** : Glutathion réduit.

**GSHrx** : Glutathion réductase.

**GSSG** : Glutathion oxyde.

**HOG**: hydroxy-guanine.

**L°**: Radical alkyle.

**LH**: acide gras polyinsaturés.

**LOO°**: Radical peroxyde.

**LOOH**: Hydroxyperoxyde lipidique.

**NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**PEP**: Phosphoénolpyruvat.

**SOD**: Superoxyde Dismutase.

# Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Anion superoxyde et ses dérivés	3
2	Relation mutuelles entre les radicaux libres	6
3	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	6
4	Activation de la NADPH oxydase et ses conséquences sur la paroi artérielle	8
5	Activité de la NO synthase et formation du peroxyde d'azote	8
6	Sources et principales cibles des espèces radicalaires de l'oxygène modulant la croissance, la survie et l'apoptose des cellules endothéliales et musculaires lisses	10
7	Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN	11
8	Effet du radical OH° sur la guanine	13
9	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs	15
10	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	19
11	Structures des composés phénoliques simples.	20
12	Structure de base des flavonoïdes	21
13	Exemple de structure d'un tannin hydrolysable (Gallotannins)	23
14	Exemple de structure d'un tannin condensé	24
15	Sites de chélation des métaux par les flavonoïdes	26
16	Mécanisme de l'activité scavenging des flavonoïdes via la fonction catéchol	27
17	Groupes fonctionnels de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes	28
18	Photo d' <i>Inula viscosa</i> L	30
19	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	34
20	Histogramme des teneurs en phénols totaux des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	42

Suite :

21	Histogramme des teneurs en flavonoïdes des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	44
22	Histogramme des teneurs en tannins condensés des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	45
23	Réduction du radical DPPH par un antioxydant (Amic et al., 2003).	47
24	Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles d' <i>I.viscosa</i> et une molécule de référence à 1µg/ml.	48
25	Activité chélatrice des extraits de feuilles d' <i>I.viscosa</i> et une molécule de référence à 1µg/ml.	51
26	Effet scavenger contre le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> des extraits des feuilles d' <i>I.viscosa</i> et une molécule de référence à 1µg/ml.	55

# Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Les principales classes de flavonoïdes	22
II	Quelques usages traditionnels de l' <i>Inula viscosa</i> .	31
III	Taux d'extraction (%) de feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	40



# *Sommaire*

# Sommaire

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

**Introduction ..... 1**

## *Synthèse bibliographique*

### *Chapitre I : Les espèces oxydantes*

I-1- Définition .....	2
I-2- Les différents types des espèces oxydantes.....	2
I-2-1- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	2
I-2- Les espèces réactives nitrogénées (ERN).....	5
I-3- Source de formation des radicaux libres .....	6
I-3-1- Sources endogènes .....	7
I-3-2- Sources exogènes .....	9
I-4- Rôles physiologiques des radicaux libres.....	9

### *Chapitre II : Le stress oxydant*

II-1-Définition .....	11
II-2-Origine du stress .....	11
II-3-Cibles moléculaires des ERO.....	12
II-3-1- Effets sur les lipides.....	12
II-3-2- Effets sur les protéines.....	12
II-3-3- Effets sur les acides nucléiques .....	12
II-3-4- Effets sur les glucides .....	13

II-4- Le stress oxydant et atteintes pathologiques .....	13
II-5- Antioxydants .....	14
II-5-1- Définition.....	14
II-5-2-Antioxydants endogènes.....	14
II-5-3-Antioxydants de synthèse .....	16
II-5-4-Antioxydants naturels .....	16

### *Chapitre III : Les composés phénoliques*

III-1- Définition.....	18
III-2- Biosynthèse.....	18
III-3- Classification .....	20
III-3-1- Acides phénols simples .....	20
III-3-2- Flavonoïdes .....	21
III-3-3- Tannins .....	23
III-4- Rôle et intérêt biologiques des polyphénols .....	25
III-4-1- Propriétés physico-chimiques.....	25
III-4-2- Propriétés biologique.....	26
III-4-3-Propriétés antioxydantes.....	27

### *Etude expérimentale*

#### *Chapitre I : Matériels et méthodes*

I-1-Matériel végétal.....	29
I-1-1- Description .....	29
I-1-1-2- Famille des Astéracées .....	29
I-1-1-3- Espèce <i>Inula viscosa</i> L .....	29
I-1-1-4- Usage traditionnel de l' <i>Inula viscosa</i> L.....	30
I-2- Méthodes .....	32

I-2-1- Préparation du matériel végétal.....	32
I-2-2- Extraction.....	32
I-2-3- Dosage des composés phénoliques .....	35
I-2-3-1- Dosage des phénols totaux .....	35
I-2-3-2-Dosage des flavonoïdes .....	35
I-2-3-3-Dosage des tanins condensés .....	36
I-2-4-Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	37
I-2-4-1- Activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH.....	37
I-2-4-2-Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	37
I-2-4-2- Chélation de fer .....	38
I-3- Etude statistique .....	38

## *Chapitre II : Résultats et discussions*

II-1- Préparation des extraits .....	39
II-4- Teneurs en composés phénoliques.....	42
II-4-1- Teneurs en phénols totaux .....	42
II-4-2- Teneurs en flavonoïdes .....	43
II-4-3- Teneurs en tannins condensés.....	45
II-5-Activité antioxydante .....	46
II-5-1-Activité anti radicalaire contre le radical DPPH.....	47
II-5-2- Chélation de fer .....	50
II-5-3- Activité scavenger du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
<b>Conclusion.....</b>	<b>56</b>

### **Références bibliographique**

### **Annexes**



# *Introduction*

## **Introduction**

Le corps humain est toujours en face de plusieurs dangers tels que les radicaux libres qui sont, spontanément produits dans nos systèmes biologiques. Ce sont des molécules capable d'engendrer certaines pathologies (les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète...etc.), et susceptibles d'altérer la qualité de l'aliment (Favier, 2003).

Grâce à leurs propriétés de lutter contre les radicaux libres, les antioxydants synthétiques ont toujours été utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additifs. Cependant, il semblerait que ces substances présentent un certain potentiel de toxicité. Actuellement, des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification des composés phénoliques à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Demichel, 2010).

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers, représentés actuellement par 100.000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales (Cowan, 1999) : Les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes.

Pour cet intérêt, des substances naturelles bioactives, les composés phénoliques conservent une place de choix dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, et capturent d'intérêt de plusieurs recherches vue le nombre de leurs propriétés biologiques indénombrables. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme traitement dans diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires ou maladies inflammatoires.

Les feuilles d'*Inula viscosa* sont choisies sur la base de leurs utilisations en médecine traditionnelles locale dans le traitement de nombreuses pathologies à caractères inflammatoire. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif est de tester l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques des feuilles d'*I.viscosa* par trois méthodes complémentaires: piégeage du radical (DPPH<sup>•</sup>), chélation de fer et l'activité scavenger du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



*Synthèse bibliographique*

# Chapitre I

## *Les espèces oxydantes*

## I- Les espèces oxydantes

Le terme « espèces oxydantes ou pro-oxydantes » essaie de rassembler trois caractéristiques : espèce (molécule, atome ou radical) capable d'en oxyder une autre ou capable de générer une espèce réactive, de manière spontanée et relativement aspécifique (Vamecq et *al.*, 2004). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique.

Parmi ces espèces pro-oxydantes, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) que nous désignerons par l'abréviation ERON; occupent une place centrale dans les systèmes biologiques dont plusieurs travaux leur accordent un intérêt croissant tant sur leurs rôles pathologique que physiologique.

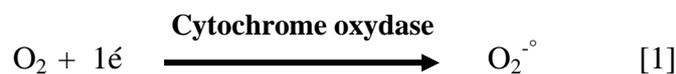
Actuellement, on emploie le terme ERON pour désigner un ensemble plus large de molécules, à savoir les espèces réactives radicalaires qui réfèrent aux entités chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés.

### I-1- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

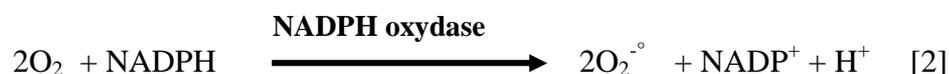
Le terme ERO réfère aux espèces oxygénées qu'elles soient radicalaires tels l'anion superoxyde et le radical hydroxyle ou non radicalaires tel l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (Pincemail et *al.*, 2002).

#### ➤ L'anion superoxyde ( $O_2^-$ )

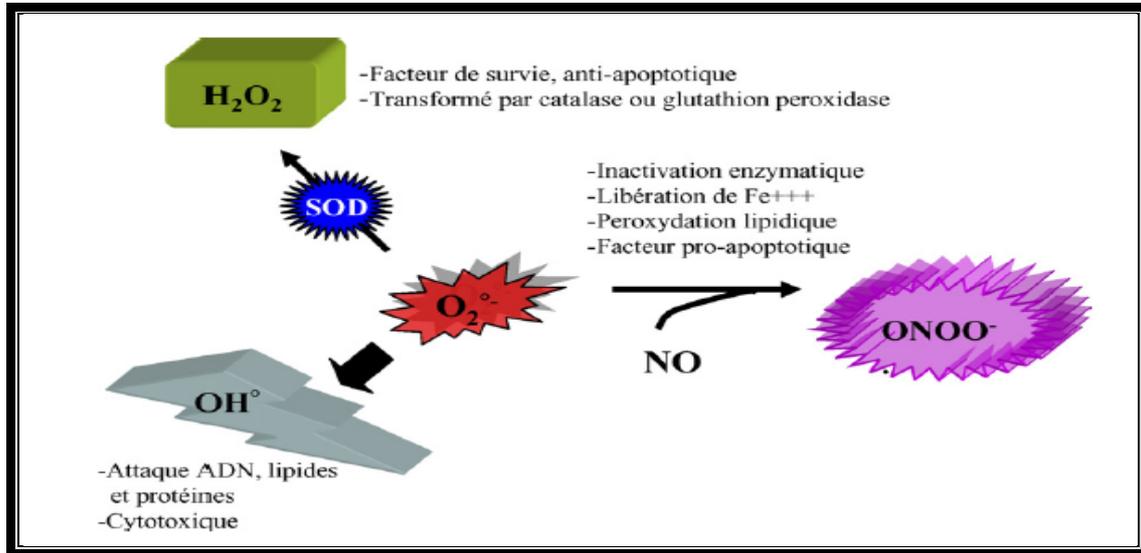
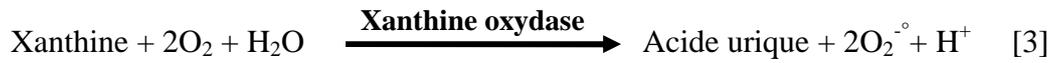
Lors du métabolisme oxydatif, 2 à 5% de l'oxygène consommé est converti en radical superoxyde (réaction [1]). Ceci est dû à des électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire et se fixent directement sur l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) (Ré et *al.*, 2005).



L'anion superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase (réaction [2]) dans la membrane plasmique des cellules phagocytaires (Valko et *al.*, 2007)



La réduction de l'oxygène par la xanthine oxydase (OX) permet également la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , selon la réaction [3] (Beaudeau et *al.*, 2006b).



**Figure N°1** : Anion superoxyde et ses dérivés (Afonso, 2007).

### ➤ Oxygène singlet ( $^1O_2$ )

L'oxygène singlet correspond à un état excité de l'oxygène moléculaire dont il se distingue par sa configuration électronique. Il n'est pas un radical libre, car il ne possède pas un électron non apparié. Il est formé par action de la lumière sur l'oxygène. Il joue un rôle mineur dans la panoplie des effets toxiques des formes actives de l'oxygène (Houée-levin, 2005)

### ➤ Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés, plus stable que le radical superoxyde, mais c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile et peu réactive en milieu aqueux et la majeure partie de sa toxicité provient de sa capacité de générer le radical hydroxyle ( $HO^\bullet$ ). En effet, le peroxyde d'hydrogène en présence des ions ferriques ( $Fe^{2+}$ ) donne le radical hydroxyle lors

de la réaction de Fenton (réaction [4]) (De Leiris, J. 2003; Vamecq et *al.*, 2004; Edreva, 2005).



Le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) peut se produire à partir du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) par interaction avec le radical superoxyde qui est oxydé en oxygène moléculaire. La résultante de cette dernière réaction et la réaction de Fenton (réaction [5]) est connue sous le nom de réaction de Haber Weiss (réaction [6]) (Vamecq et *al* 2004; Edreva, 2005).



#### ➤ Le radical hydroxyle (OH<sup>°</sup>)

La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH<sup>•</sup>. Ce dernier est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques ayant une durée de demi-vie très courte, il peut réagir pratiquement avec toutes les macromolécules. C'est une espèce qui ne diffuse quasiment pas au sein des milieux biologiques et qui réagit sur le lieu même de sa production. Il ne peut être mis en évidence dans les milieux biologiques que par ses produits d'oxydation (Gardès-Albert, 2006).

L'hydroxyle constitue le radical libre le plus toxique en biologie. Il est notamment à l'origine de la production des radicaux libres dit « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires (Rochette, 2008).

#### ➤ Radical peroxy (ROO<sup>°</sup>)

Les radicaux peroxy (ROO<sup>°</sup>) se forment par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés, ou de l'oxydation des lipides. Ils sont peut réactifs, capables de diffuser, à travers les membranes biologiques (Marfak, 2003 ; Valko et *al.*, 2007).

➤ **Radical alcoxyle (RO°)**

Les radicaux alcoxydes (RO°) se produisent, lors de la dégradation des peroxydes organiques ou à partir des chaînes d'acide gras poly-insaturées (Goudable et Favier, 1997 ; Jerez et *al.*, 2006).

**I-2- Les espèces réactives nitrogénées (ERN)**

La production d'espèces réactives de l'azote commence avec les réactions catalysées par les NO synthases (Valko et *al.*, 2007). Les ERN représentées par le monoxyde nitrique (NO°) et le peroxy-nitrique (ONOO<sup>-</sup>) sont généralement désignées comme étant des médiateurs chimiques (Bérard, 1997).

➤ **Le radical oxyde nitrique (NO°)**

Le monoxyde d'azote est une molécule diatomique gazeuse non chargée sous forme de radical libre, contenant un électron non apparié sur sa dernière couche électronique. Il est synthétisé à partir de L-Arginine par les NO synthases en présence de l'oxygène et du NADPH et d'oxygène (réaction [7]). En biologie, l'intérêt de cet élément est focalisé sur son effet vasodilatateur (Gutteridge, 1995; Valko et *al.*, 2007).



➤ **L'anion peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>)**

L'anion peroxy-nitrite est un puissant oxydant qui traverse les membranes biologiques. Il est généré par interaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde (réaction [8]). (Delemasure et *al.*, 2006).



La figure suivante présente les relations mutuelles entre les différents radicaux libres.

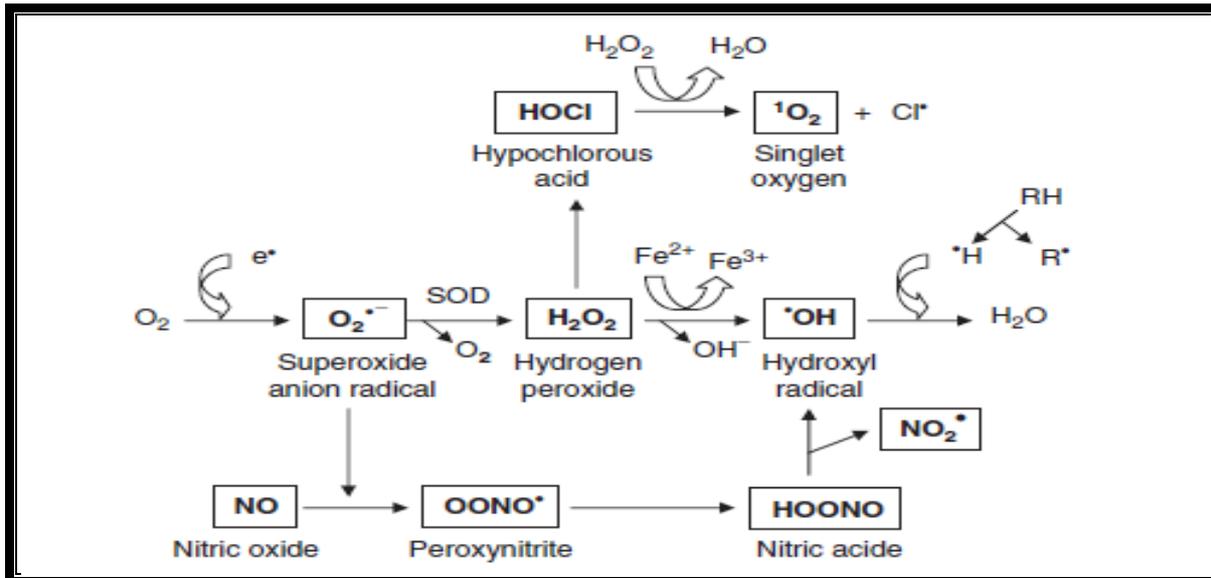


Figure N°2 : Relation mutuelles entre les radicaux libres (Durachova, 2008)

### I-3- Source de formation des radicaux libres

La production de radicaux libres est largement physiologique dont l'importance varie selon les tissus (figure N°3). Elle est déterminée et dirigée par un grand nombre de mécanisme et sources tant endogènes qu'exogène. Bin que physiologique, cette production peut être accidentelle et potentiellement délétère. Elle est dommageable si elle est prolongée ou incontrôlée, dépassent les capacités de neutralisation de l'organisme (Berger, 2006).

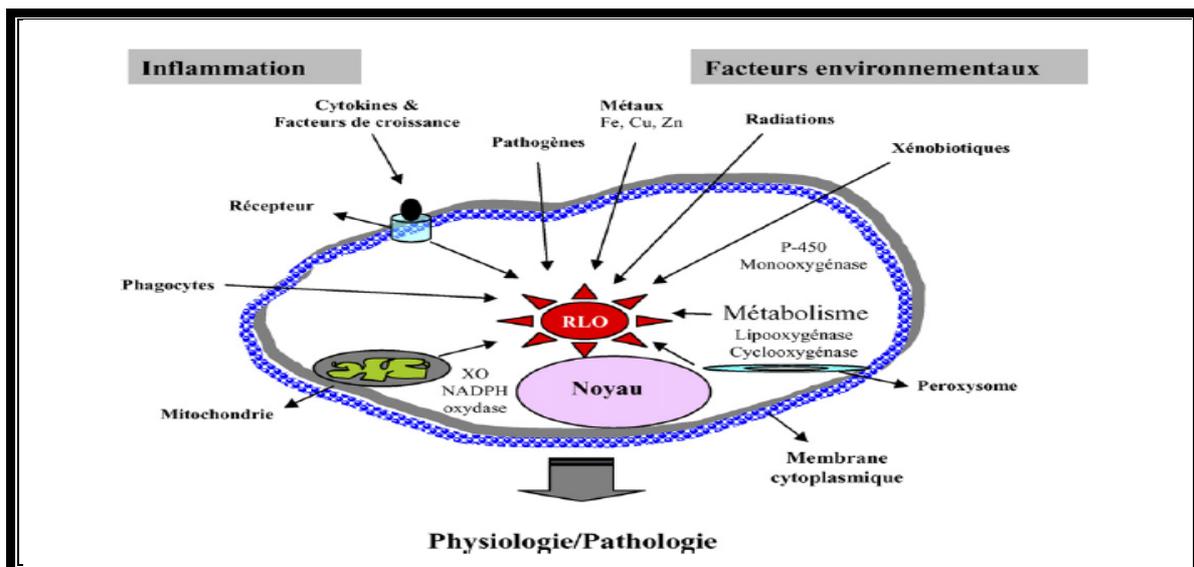


Figure N°3 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al., 2007).

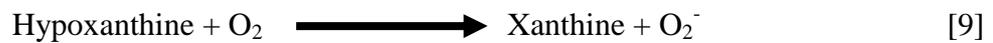
### I-3-1- Sources endogènes

#### ❖ Source mitochondriale

Dans les conditions physiologiques, la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne mitochondriale est la source la plus importante de production d'ERO. Environ 2% de l'oxygène utilisé par les mitochondries est partiellement réduit en superoxyde par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau de la NADH déshydrogénase du complexe I et du site ubisemiquinone du complexe III (coenzymeQ) (Beaudeau et *al.*, 2006).

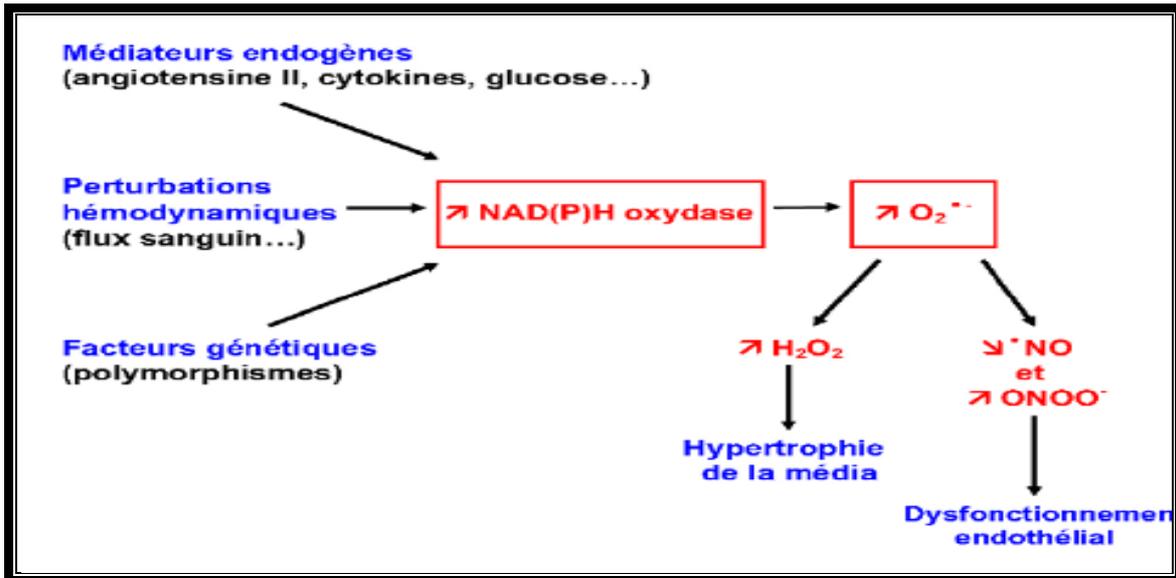
#### ❖ La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme soluble qui génère les ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine (réaction [9]) et la xanthine en acide urique (réaction [10]) (Harrison, 2002). Dans la deuxième réaction l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde (Phillis, 1994).



#### ❖ La NADPH oxydase

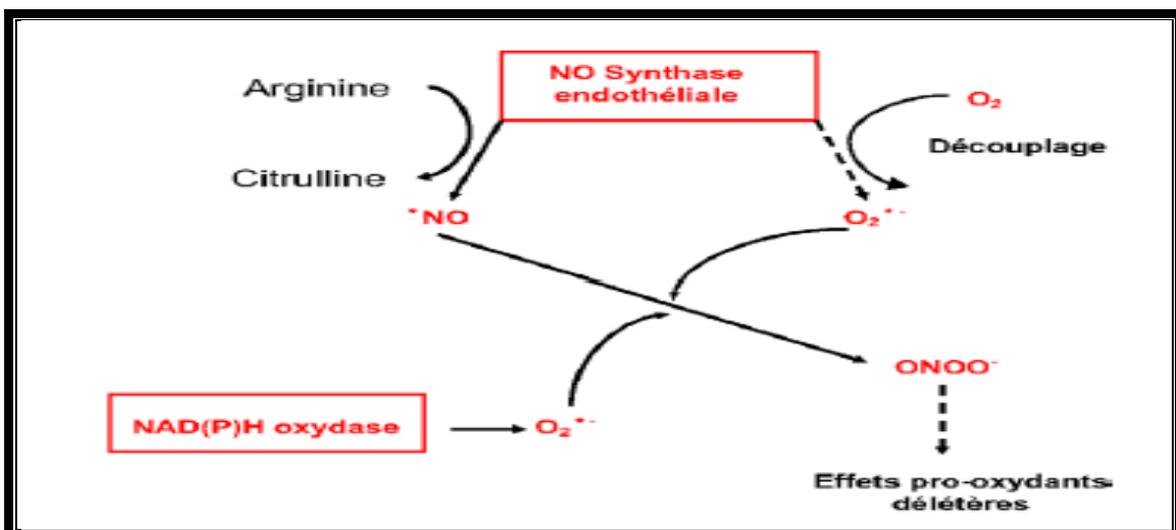
L'autre principale source enzymatique de production de l'anion superoxyde est la famille des protéines NADPH oxydases. Ces enzymes cellulaires présentes dans la membrane plasmique des phagocytes. Leur activité peut être régulée par de multiples facteurs dont l'angiotensine II, les cytokines, l'acide arachidonique et ses métabolites. Dans ce cas de figure, les radicaux libres produits, agissent au niveau des cellules vasculaires (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002; Moldovan et *al.*, 2006).



**Figure N°4:** Activation de la NADPH oxydase et ses conséquences sur la paroi artérielle (Beaudeau et *al.*, 2006).

❖ Nitrique oxyde synthase (NOS)

La NOS est également considérée comme source potentielle d'ERO. En effet, cette enzyme catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline (figure N°5) avec la libération de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de °NO, qui pourrait conduire à une production significative de peroxy-nitrite (Beaudeau et *al.*, 2006).



**Figure N°5 :** Activité de la NO synthase et formation du peroxy-nitrite (Beaudeau et *al.*, 2006)

### ❖ Les métaux de transition

La formation des (ERO) requiert la présence de métaux de transition comme le fer et le cuivre (Fontaine, 2003). Ils peuvent facilement céder un électron par les réactions d'oxydoréduction et générer ainsi les radicaux hydroxyles à partir de l'espèce peu réactive  $H_2O_2$  (Valko et *al.*, 2006). Le fer, est le métal de transition le plus abondant pourrait catalyser la formation des radicaux libres au cours de réaction de Fenton et du cycle d'Haber-Weiss (Huet et *al.*, 2008).

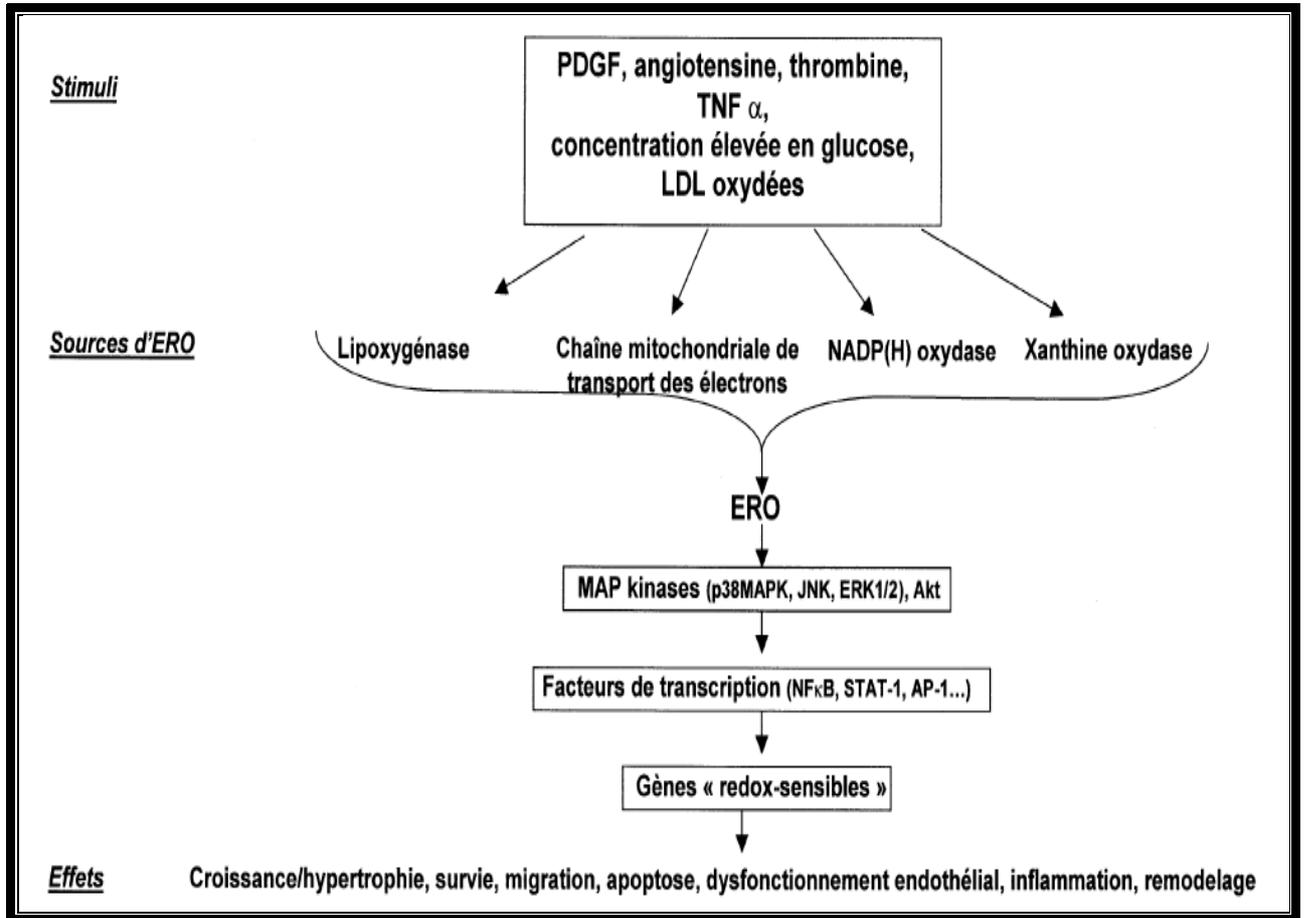
### I-3-2- Sources exogènes

D'autres productions sont anormales, pathologiques, toujours dommageables, et sans objectif physiologique, comme par exemple celles résultant de la Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, et qui constituent une source importante des ERO, ils attaquent et causent des endommagements dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Kirkhan et Rahman; 2006). Aussi, l'augmentation de la consommation de l'oxygène durant l'effort physique, entraîne une formation accrue d'ERO au niveau des mitochondries des cellules musculaires (Pincemail et *al.*, 2001).

### I-4- Rôles physiologiques des radicaux libres

Les radicaux libres ont des origines multiples et exercèrent deux types d'action, des effets physiologiques et des effets délétères (Barouki, 2006). Ils s'impliquent dans la transduction de signaux cellulaires (des messagers intra et extra-cellulaires), la défense immunitaire contre les agents pathogènes (un rôle physiologique important dans la phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou polynucléaires) (Pincemail et *al.*, 2002 ; Valko et *al.*, 2007), la destruction par apoptose des cellules tumorales, la différenciation cellulaire, la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire et la fécondation de l'ovule (Favier, 2003). Dans ce cas de figure N°6, les ERO jouent un rôle dans le contrôle de processus cellulaires physiologiques tels que la croissance, la migration, la sénescence, l'apoptose ou la survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses ou le développement de

processus pathologiques conduisant à l'augmentation de la perméabilité et l'activation endothéliale, la réponse inflammatoire et la prolifération des cellules musculaires lisses.



**Figure N°6 :** Sources et principales cibles des espèces radicalaires de l'oxygène modulant la croissance, la survie et l'apoptose des cellules endothéliales et musculaires lisses (Bonnetfont-Rousselot *et al.*, 2002).

# Chapitre II

*Le stress oxydant*

## II- Le stress oxydant

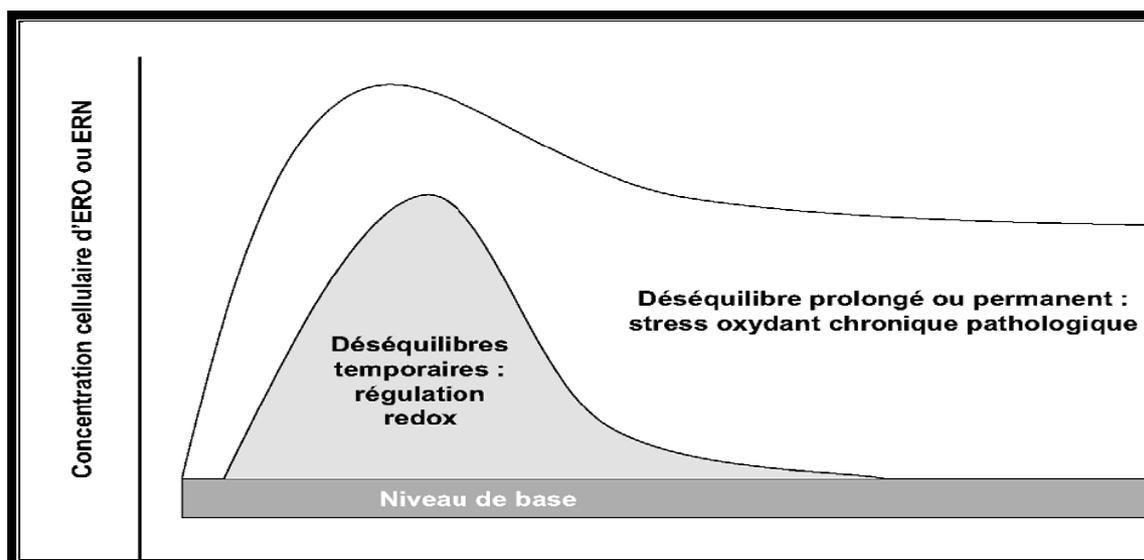
### II-1-Définition

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense anti-oxydants au profit des premiers, il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2002 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

### II-2-Origine du stress

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par le système de défense, la balance antioxydant/pro-oxydante est en équilibre.

Cependant, dans certaines situations, les ERO sont produites en quantité anormalement importante, dépassant les capacités des systèmes de protection, ce qui induit une situation d'un stress oxydatif profond, (figure N°7). Dans ce cas de figure, les ERON exercent des effets délétères sur les lipides, les protéines et le matériel génétique provoquant ainsi plusieurs pathologies (Fukagawa, 1999; Beaudoux et *al.*, 2006).



**Figure N°7 :** Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aiguë ou chronique des ERO/ERN (Beaudoux et *al.*, 2006).

### II-3-Cibles moléculaires des ERO

#### II-3-1- Effets sur les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les ERO, réaction appelée la peroxydation lipidique (Lee et *al.*, 2004 ; Ré et *al.*, 2005), qui est généralement initiée par un radical (R<sup>•</sup>) particulièrement réactif selon la réaction:



Le radical lipidique (L<sup>•</sup>: radical alkyle) formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO<sup>•</sup>) capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique (Nafia et *al.*, 2005 ; Koechlin-Ramonatsco, 2006), selon la réaction suivante :



Ceci conduit à une réaction en chaîne, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

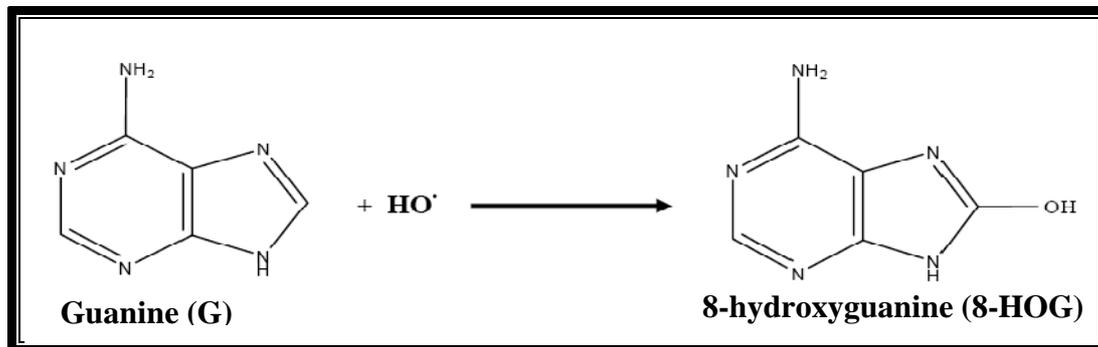
#### II-3-2- Effets sur les protéines

La toxicité des ERO s'exerce également sur les protéines, en particulier celles qui comportent les acides aminés soufrés, basique et aromatiques (Favier, 2003 ; Baudin, 2006). Ainsi l'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant ainsi la signalisation cellulaire.

#### II-3-3- Effets sur les acides nucléiques

Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (figure N°8). Il peut y avoir jusqu'à 70 modifications oxydatives différentes des acides nucléiques, certaines affectant les bases

d'autres induisant des cassures dans les brins. L'un des marqueurs d'une attaque oxydative des acides nucléiques est la présence de 8-hydroxy-guanine (8-HOG) (Ré *et al.*, 2005).



**Figure N°8:** Effet du radical  $\text{OH}^\bullet$  sur la guanine (Valko *et al.*, 2007).

#### II-3-4- Effets sur les glucides

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\bullet$ , qui entraînent la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

#### II-4- Le stress oxydant et atteintes pathologiques

La notion de « stress oxydant » et de « radicaux libres » est de plus en plus utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme des causes de complication dans leur évolution (Huang *et al.*, 2004). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Favier, 2003).

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré (Favier, 2003). Le stress oxydant serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. Enfin, les radicaux libres semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse,

puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Desport et Couratier, 2002 ; Roussel et Ferry, 2002).

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défense que l'on qualifie d'antioxydants. De plus, de nombreuses molécules d'origine naturelle (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles,...) ou issues de synthèses organiques (Trolox, BHA, BHT,...) sont étudiées pour leurs propriétés antioxydantes et leur contribution dans la lutte contre les espèces oxydantes de l'organisme.

## **II-5- Antioxydants**

### **II-5-1- Définition**

Un antioxydant est toute substance capable d'inhiber ou de retarder l'oxydation d'un substrat tout en étant présente à une faible concentration par rapport à la concentration du substrat oxydable. Ces antioxydants peuvent avoir plusieurs origines, ils peuvent être produits dans l'organisme ou apportés par l'alimentation ou bien sont issus d'une synthèse chimique (Al-Mamary *et al.*, 2002 ; Karou *et al.*, 2005 ; Berger, 2006).

Les agents anti-oxydants peuvent retarder l'oxydation par deux moyens ; soit en piégeant directement les radicaux libres, et dans ce premier cas le composé est appelé antioxydant primaire ou par d'autres mécanismes indirectes, incluant la fixation des ions métalliques, la conversion des hydroperoxydes en espèces non radicalaires. Dans ce deuxième cas, le composé est appelé antioxydant secondaire (Pokorny *et al.*, 2001).

### **II-5-2-Antioxydants endogènes**

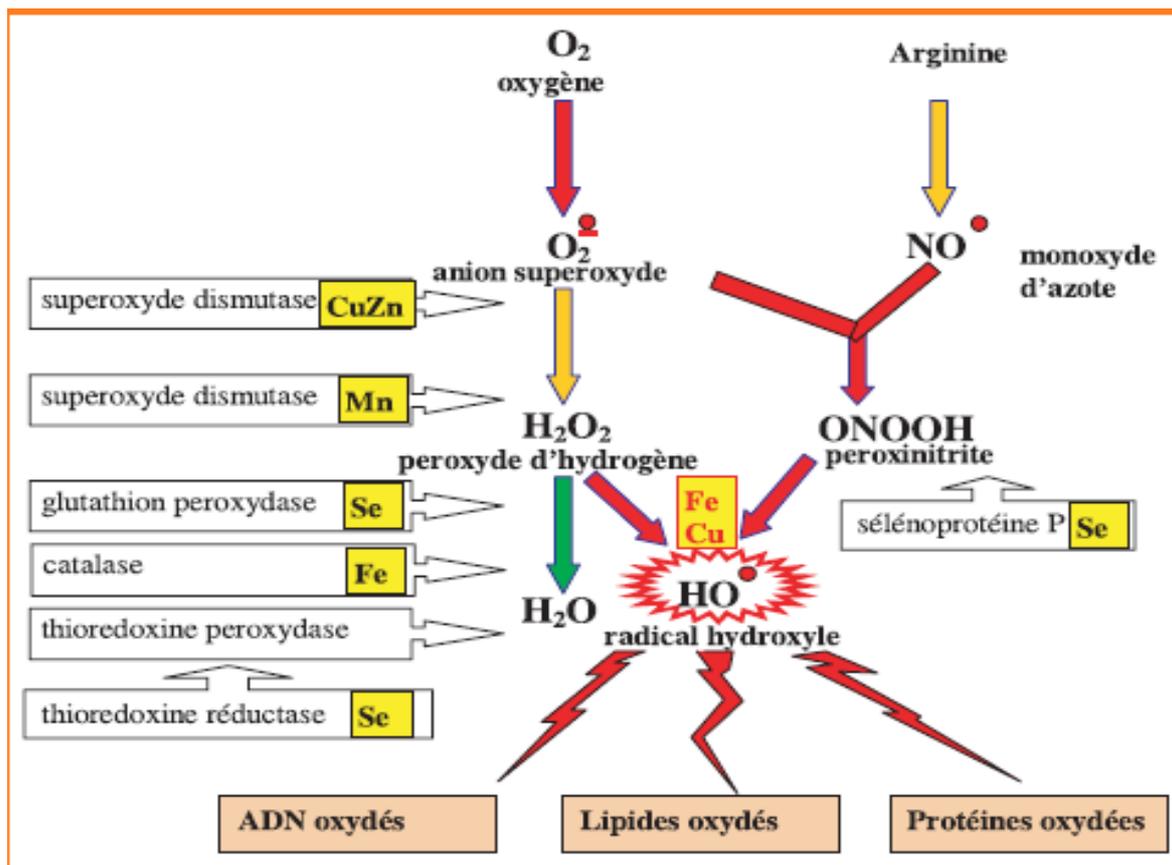
L'organisme possède deux grands systèmes de défense : les systèmes enzymatiques et non enzymatiques qui fonctionnent de façon complémentaires et synergique selon un compartiment bien précis pour protéger les cellules contre les métabolites cytotoxiques de l'oxygène (figure N°9).

 **Systèmes enzymatiques** : Les principales enzymes d'antioxydants sont :

- La superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ .

- La catalase (CAT): transforme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en simple molécule d'eau.
- La glutathion peroxydase (GPx): détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques
- La glutathion réductase (GSHrx) : Réduire le glutathion oxyde en glutathion réduit (GSSG-GSH) en présence d'un cofacteur, le NADPH (Milane, 2004 ; Garait, 2006 ; Rahman et al., 2006).

✚ **Systèmes non enzymatiques** : De nombreuses métalloprotéines telles que la transferrine et l'albumine permettent de chélater les métaux (Fe, Cu, etc) impliqués dans la formation des radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Fenton et d'Haber-Weiss (De Moffarts et al., 2005).



**Figure N°9** : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

En plus des substances propres à l'organisme, la définition d'antioxydant englobe ainsi toutes les substances chimiques qui, plus spécifiquement, prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation telles que le rancissement des matières grasses et le brunissement enzymatiques (Andrian *et al.*, 2003).

### **II-5-3-Antioxydants de synthèse**

Les antioxydants synthétiques peuvent être soit des produits imitant les enzymes telles que les « SOD like » basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse ; soit des dérivés de sélénium comme l'Ebselen. Les antioxydants peuvent aussi être des molécules maintenant le fer dans un état inactif (Desferal, hydroxypyridines) ou des molécules inhibitrices d'enzymes responsables de la formation des ROS (Allopurinol).

Ces composés présentent des propriétés peroxydasiques et peuvent appartenir à de nombreuses familles : les dérivés phénoliques (butylhydroxytolène et le butyldroxyanisole, esters d'acide gallique et le trolox), les dérivés stéroïdiens (lazaroides), les dérivés soufrés (N-acétylcystéine), les dérivés de la méthyle xanthine (caféine, allopurinol) (Pincemail *et al.*, 1998 ; Helm *et al.*, 1999 ; Odabasoghlu *et al.*, 2004).

### **II-5-4-Antioxydants naturels**

En plus de la prévention par les enzymes ou les protéines chélatrices de métaux, l'organisme peut quant- à- lui tirer profit de nombreux antioxydants présents dans son alimentation.

➤ **Vitamine E** : La vitamine E ou l' $\alpha$ -tocophérol proprement dite, la plus importante de la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble reconnue, grâce à sa capacité d'inhiber les peroxydations lipidiques au niveau des membranes cellulaires (Pincemail *et al.*, 1998 ; Cuvelier *et al.*, 2003). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique qui est riche en acides gras polyinsaturés, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire majeur (Cuvelier *et al.*, 2003 ;

Milane et *al.*,2004). De plus, l'effet bénéfique de la vitamine E se retrouve renforcée par une consommation optimale de la vitamine C (Pincemail et *al.* ,2002 ; Lee et *al.*, 2004).

➤ **Vitamine C** : La vitamine C ou l'acide ascorbique, connue comme étant le principal antioxydant hydrosoluble, est un piègeur efficace des ROS tels que les radicaux peroxydes, hydroxyles, superoxydes et le peroxinrite. Elle peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation (protéines, acides gras et ADN) (Servais, 2004 ; Kaliora et *al.*, 2006). La vitamine C, à une concentration élevée, a une activité pro-oxydante en favorisant la formation de radicaux hydroxyles en présence de fer et de cuivre (Servais, 2004).

➤ **Caroténoïdes** : Les caroténoïdes sont des pigments végétaux liposolubles ; de couleur rouge (lycopène de la tomate), orange ( $\beta$ -carotène des carottes) ou jaune (lutéine et zéaxanthine du maïs), sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singulet et dans protection contre les radiations solaires et protège ainsi le peau des dommages oxydatifs (Josse, 2003 ; Stahl et Sie, 2004 ; Dutta et *al.*, 2005).

# Chapitre III

## *Les composés phénoliques*

### III-Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux (Morello et *al.*, 2005) et constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal (Martin et Adriantsithona, 2002).

#### III-1- Définition

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules à structures chimiques variées, appartenants à plusieurs classes (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins) (Tanguy et *al.*, 2009), sont très largement répandus dans le règne végétal, localisées depuis les racines jusqu'aux fruits (Richer, 1993). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (Bruneton, 1999 ; Macheix et *al.*, 2005). Les différentes propriétés, notamment antioxydantes des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés phénoliques. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003).

#### III-2- Biosynthèse

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse : la voie shikimate et la voie polyacétate (Lugasi et *al.*, 2003).

##### ❖ Voie shikimate :

La voie la plus courante est celle du shikimate, elle débute par la condensation d'un phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former au bout de plusieurs réactions enzymatiques l'acide chorismique, celui-ci se transforme en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) qui par désamination, donnent des acides cinnamique, producteurs de la majorité des acides phénols (Figure ) (Richter, 1993 ; Bruneton, 1999).

##### ❖ Voie polyacétate :

Cette voie commence de l'acétate et conduit à des polyacétates qui engendrent, par cyclisation différentes formes de composés phénoliques composés (Bruneton, 1999). De plus

la pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique (figure N°10) est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine.

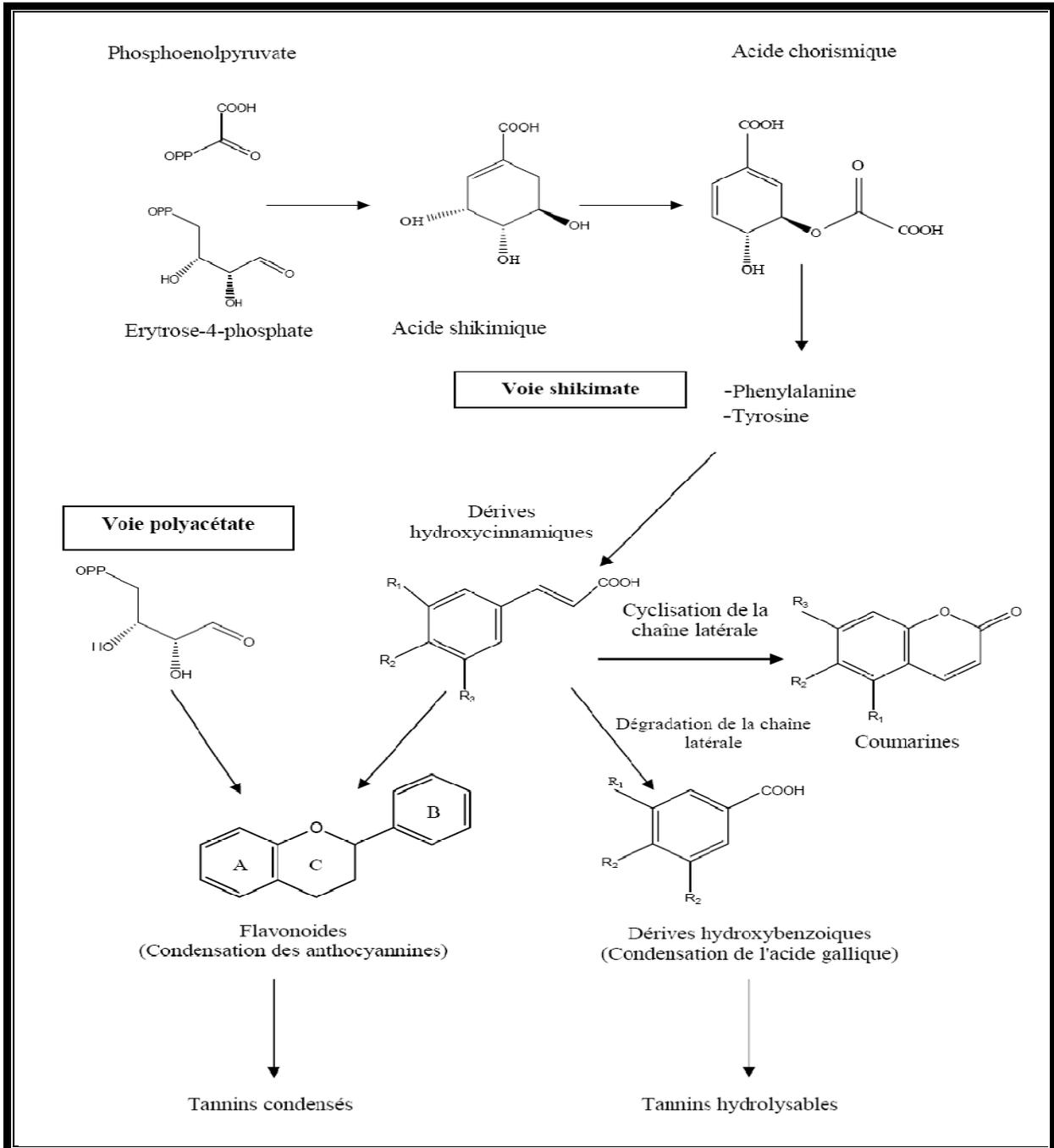


Figure N°10 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

### III-3- Classification

Selon leur structure de base, les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes, les plus importantes sont : les phénols simples, les flavonoïdes et les tanins (Bennick, 2002).

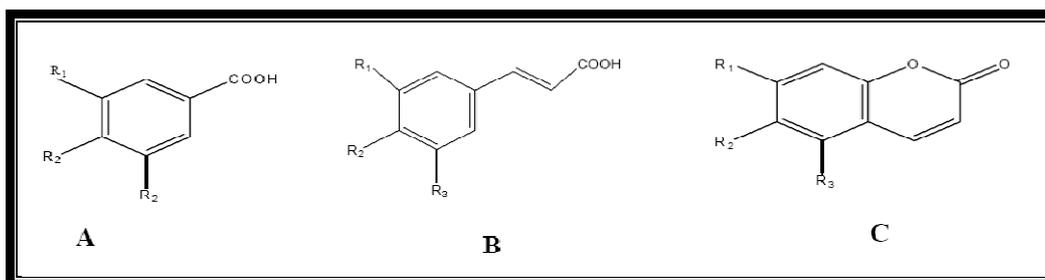
#### II-3-1- Acides phénols simples

Dans cette classe, on compte les dérivés hydroxybenzoïques à sept atomes de carbone (C6-C1), les dérivés hydroxycinnamiques à neuf atomes de carbones (C6-C3) et enfin des coumarines (Ribéreau-Gayon, 1968).

Les dérivés hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de l'acide cinnamique, l'ensemble de ce groupe est souvent rapporté sous la dénomination commune de phénylpropanoïdes. Ils sont les plus abondants des composés phénoliques simples, et leur présence dans le règne végétal est, généralement à l'état d'ester avec d'autres molécules organiques tels que les glucides (Richter, 1993).

Les dérivés hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque avec une formule de base C6-C1 (figure N°11). Ces composés peuvent provenir directement de l'acide 3-déshydroshikimique (cas de l'acide gallique) ou de l'acide chorismique (cas de l'acide salicylique) ; mais en règle générale, ils résultent de la dégradation de la chaîne latérale des acides cinnamiques. Ils sont moins abondants par rapport à leurs précurseurs et peuvent exister sous forme d'esters ou de glucosides qui représentent des formes de stockage et de circulation dans les plantes (Bruneton, 1999).

Les coumarines sont des composés qui dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leur chaîne latérale (figure ). Ils sont les moins répandus des deux premiers et leur répartition dans la nature est assez limitée. Le composé le plus fréquent est l'ombelliférone (Guignard, 1996; Bruneton, 1999).

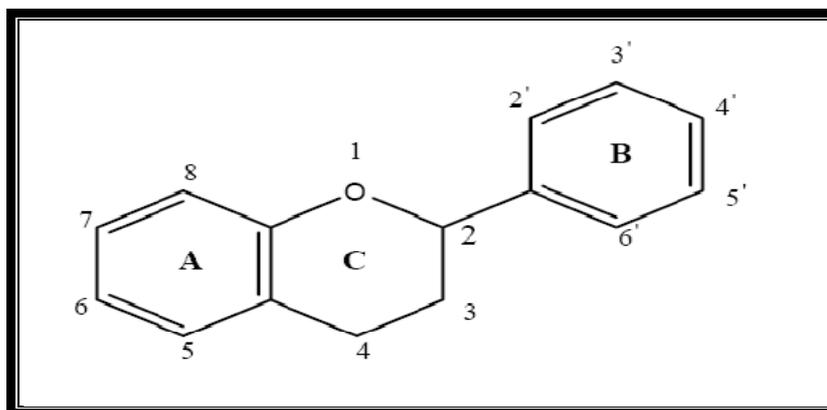


**Figure N°11 :** Structures des composés phénoliques simples. A) acide benzoïque. B) acide cinnamique. C) coumarin (Handique et Baruah, 2002)

### III-3-2- Flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Cette classe représente la plus grande et la plus diverse famille des polyphénols. Leur fonction principale est la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, et des caroténoïdes), où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Bennick, 2002).

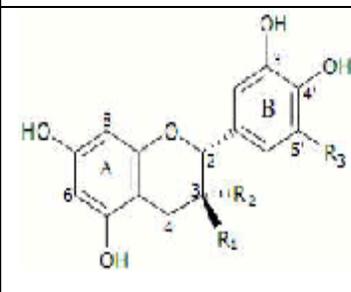
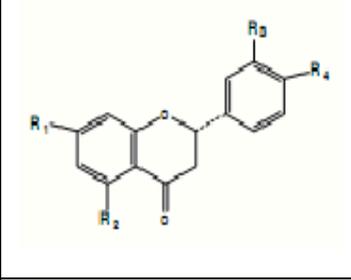
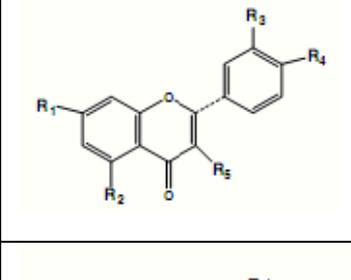
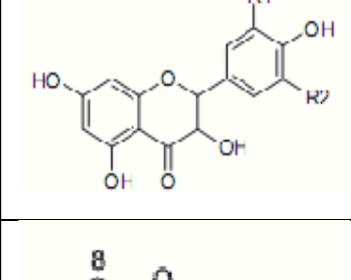
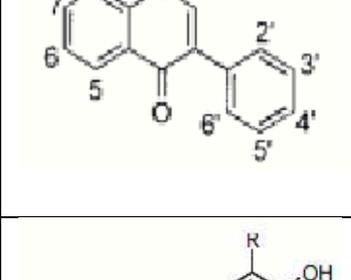
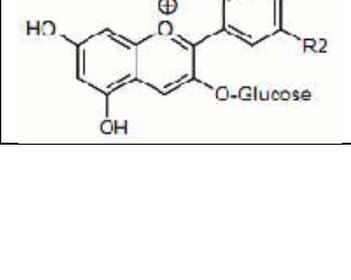
Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones (figure N°12), constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (cycles A et B) reliés par une chaîne en C3 (cycle C) (Bruneton, 1999 ; Narayana *et al.*, 2001 ; Sellappan *et al.*, 2002 ; Naithani *et al.*, 2006).



**Figure N°12:** Structure de base des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002)

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique, les flavonoïdes sont classés sur la base du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles OH et méthoxyles OCH<sub>3</sub> principalement), sur la base des deux cycles aromatiques A et B et sur celle de la chaîne de carbone intermédiaire. Ils ont donc en commun une même structure, dont les multiples substitutions permettent de les diviser en plusieurs classes (tableau I): flavones, flavonols, flavanones, isoflavanones, anthocyanidines et flavonols (Ouarkoub *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2008).

Tableau I : Les principales classes de flavonoïdes

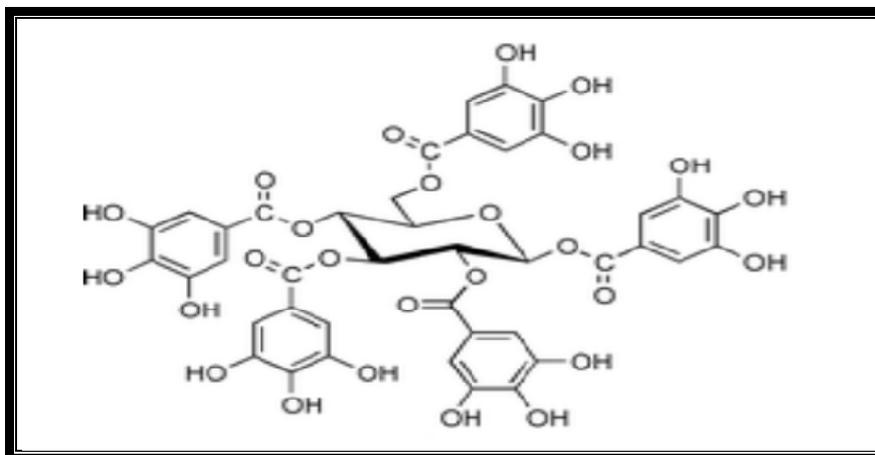
Classes	Structures	Exemples	Substitutions	Références
Flavanols		Catéchine	$R_2=R_3=H$ $R_1=OH$	Cheyrier, 2005
		Epicatéchine	$R_1=R_3=H$ $R_2=OH$	Rasmussen et al., 2005
Flavanones		Naringénine	$R_1=R_2=R_4=OH$ $R_3=H$	Rietjens et al., 2002
		Hespéridine	$R_1=R_2=R_3=OH$ $R_4=OCH_3$	Tripoli et al., 2007
Flavones		Lutéoline	$R_1=R_2=R_3=R_4=OH$ $R_5=H$	Skerget et al., 2005
		Quercétine	$R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OH$	Tripoli et al., 2007
Flavonols		Kampférol	$R_1=R_2=H$	Suzuki et al., 2008
		Myricétine	$R_1=R_2=OH$	Ghidouche et al., 2008
Isoflavone		Génistine	$5,4'=OH$ $7=glucose$	Cook et Samman, 1996
		génisteine	$5, 7,4'=OH$	Devi et al., 2009
anthocyanidines		Malvidine-3-O-glucoside	$R_1=R_2=OCH_3$	Lu et Foo, 2002
		Delphinidine-3-O-glucoside	$R_1=R_2=OH$	Chira et al., 2008

### II-3-3- Tannins

Ce sont des composés phénoliques complexes qui ont la propriété commune d'être astringents en précipitant certaines protéines de la salive. La communauté scientifique leur confère également des propriétés médicinales après leur ingestion par l'homme. Toutes ces propriétés dépendraient de leur structure et surtout de leur degré de polymérisation (Okuda, 2005 ; Perret, 2001 ; Simon, 2003). Deux groupes de tannins se différencient aussi bien par leur structure que par leur origine biosynthétique : tannins hydrolysables et tannins condensés (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999).

#### ❖ Tannins hydrolysable

Ce sont des esters de glucides et d'acides phénoliques, la molécule glucidique est en général du glucose (Ribéreau-Gayon, 1968). Ils sont facilement hydrolysables par les acides ou les enzymes (tannases) en ose et en acide phénolique, selon la nature de celui-ci, on distingue les gallotannins (figure N°13) et les ellagitannins (Bennick, 2002).

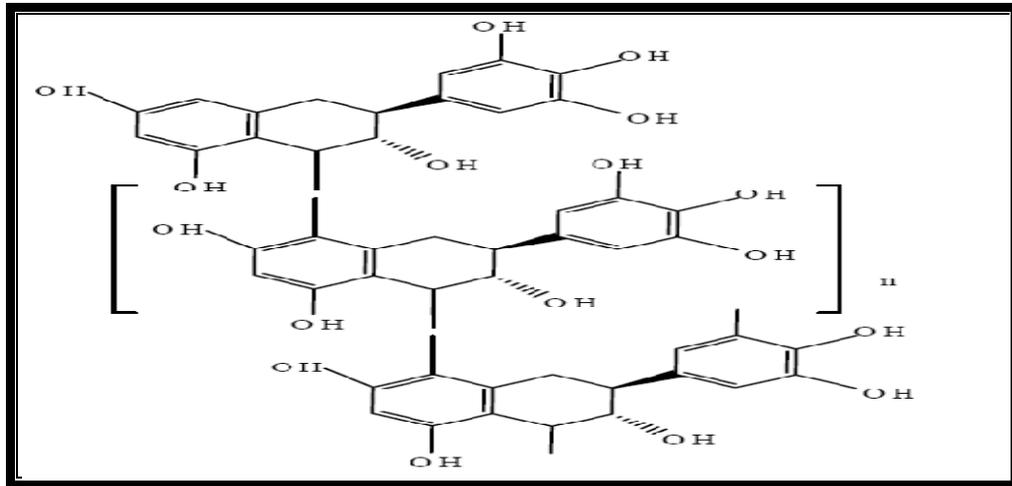


**Figure N°13:** Exemple de structure d'un tannins hydrolysable (Gallotannins) (Macheix et *al.*, 2005).

#### ❖ Tannins condensés ou tannins catéchiques

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (figure N°14). Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse, et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les

formes dimères et oligomères sont dénommées proanthocyanidines. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit par liaisons C-C ou par liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (Bruneton, 1999; Xie et Dixon 2005).



**Figure N°14:** Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix et *al.*, 2005).

## II-4- Rôle et intérêt biologiques des polyphénols

### II-4-1- Propriétés physico-chimiques

Les polyphénols sont des composés aromatiques solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Les polyphénols moins polaires à savoir, les isoflavonoïdes, les flavonoïdes, sont solubles dans d'autres solvants, tels que l'éther, le chloroforme et l'hexane, néanmoins, les formes hétérosides des flavonoïdes sont solubles dans l'eau ainsi que dans l'eau chaude mélangée avec de l'alcool (Bruneton, 1999 ; Macheix et *al.*, 2005). Ces métabolites secondaires sont connus par leurs propriétés à former des complexes avec certaines molécules organiques et aussi avec certaines macromolécules, c'est le cas de l'association des tannins avec les protéines pour former des complexes insolubles (Bruneton, 1999 ; Macheix et *al.*, 2005).

Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent dans l'UV et certains d'entre eux comme les anthocyanes, flavonols, chalcones et aures absorbent dans le visible et participent alors à la coloration des organes végétaux (fleur, fruits...). Leur spectre d'absorption résulte en général de la présence combinée des cycles benzéniques, des

groupements hydroxyles et les différentes doubles liaisons portées par ces molécules. Les acides phénols absorbent généralement entre 220 et 280nm, le spectre d'absorption des flavonoïdes est caractérisé par deux gammes d'absorption, une de 320 à 385nm correspondant au cycle B, et une autre comprise entre 250- 285 nm correspondant au cycle A (Macheix et *al.*, 2005 ; Naczk et Shahidi, 2006).

#### II-4-2- Propriétés biologique

##### ❖ Chez les végétaux

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...). Ces métabolites montrent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Marfak, 2003). En effet, la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Aron, 2007). De même, les polyphénols sont largement répandus dans notre alimentation et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits (couleur, astringence, amertume....) (Perret, 2001 ; Fleuriet et *al.*, 2005).

##### ❖ Chez les humains

Au cours de ces dernières années, les études sur les composés phénoliques et les plantes médicinales, ont prouvé l'implication de ces composés dans plusieurs activités biologiques qui leur sont attribuée, incluant des activités anti-microbiennes, anti-virales, anti-inflammatoire, anti-diabétiques et anti-tumorales (Martin et Andrantsitohaina, 2002 ; Xiao et *al.*, 2007 ; Grossman et *al.*, 2008 ; Athamena et *al.*, 2010).

Ces propriétés pharmacologiques sont associées à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se fixer aux protéines, propriétés particulière des tannins, ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques telles que le lipoxygénase, la peroxydase et la xanthine oxydase qui sont à l'origine de pathologies d'origine inflammatoire (Macheix et *al.*, 2005 ; Porat, 2006 ; Leopoldini et *al.*, 2011). Et d'autre part, comme cela sera cité ci-dessous, le caractère antioxydant permet de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène et les radicaux

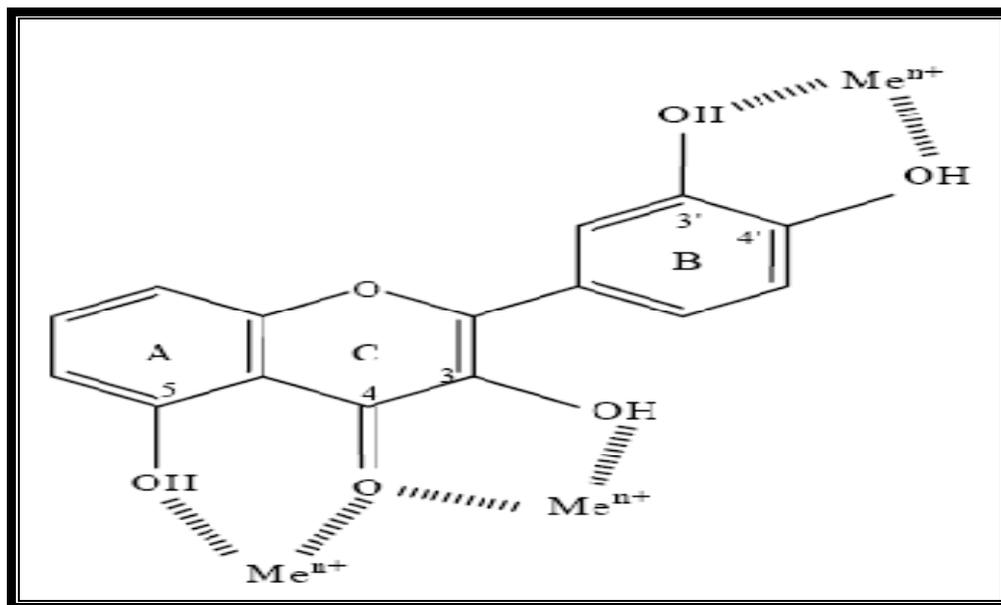
libres issus de la peroxydation lipidique responsables de vieillissement cellulaire (Fleuriet et *al.*, 2005 ; Wong et *al.*, 2006).

### II-4-3-Propriétés antioxydantes

La reconnaissance des composés phénoliques comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et elle est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces molécules dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie (Macheix et *al.*, 2005). Grace à leur diversité structurale, les composés phénoliques sont impliqués dans cette activité via plusieurs mécanismes en agissant à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux, l'effet scavenger, l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres et l'induction de la synthèse des enzymes antioxydantes (Halliwell, 1996 ; Rolland et *al.*, 2004 ; Balasundam et *al.*, 2006 ; Leopoldini et *al.*, 2011).

#### ❖ Chélation des métaux

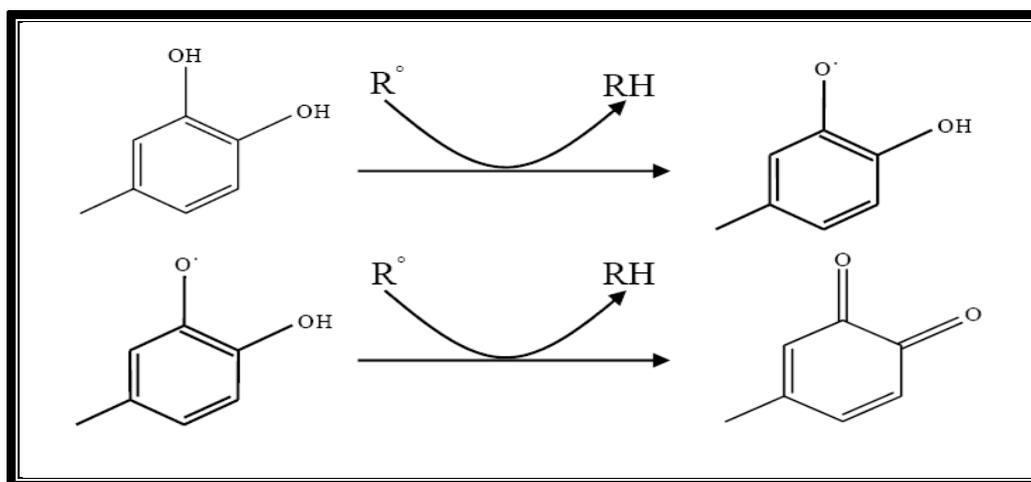
Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs via la réaction de Fenton (Fuorucci, 2006). Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques (figure N°15) (Marfak, 2003).



**Figure N°15** : Sites de chélation des métaux par les flavonoïdes (Pietta, 2006).

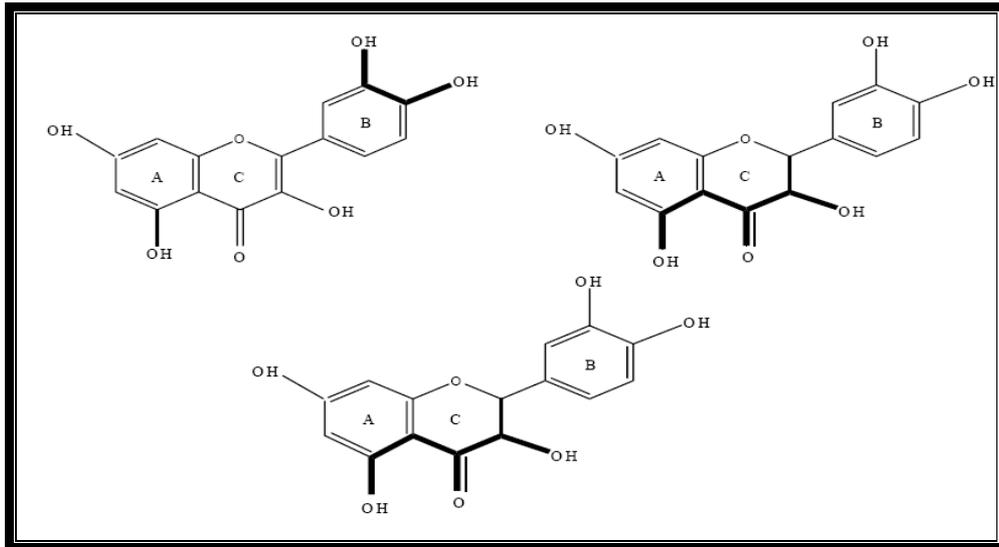
### ❖ Effet scavenger

L'effet scavenger des composés phénoliques consiste à piéger et à neutraliser les formes toxiques de l'oxygène (figure N°16), en les réduisant par transfert direct d'un électron sur leur dernière couche électronique (Ghedira, 2005). De ce fait, les composés phénoliques interfèrent et bloquent la propagation de la réaction radicalaire en chaîne grâce à leur caractère réducteur en devenant, eux-mêmes, des radicaux phénoxyls assez stables grâce au phénomène de résonance (délocalisation des doubles électroniques) (Pietta, 2000 ; Macheix et *al.*, 2005).



**Figure N°16** : Mécanisme de l'activité scavenging des flavonoïdes via la fonction catéchol (Pietta, 2006).

L'activité des composés phénoliques comme piégeurs de radicaux libres étant bien établie ; des études récentes suggèrent qu'ils seraient également de puissants piégeurs du radical  $NO$  et  $O_2^-$  (Nair et *al.*, 2012 ; Sánchez-Vioque et *al.*, 2012). Cette activité est étroitement liée aux propriétés structurales des composés phénoliques, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim et *al.*, 2002).



**Figure N°17** : Groupes fonctionnels de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes (Soobratte et *al.*, 2005).

#### ❖ Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est une autre stratégie de l'effet antioxydant des composés phénoliques. Il a été rapporté par plusieurs études que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (Nagao et *al.*, 2002 ; Lin et *al.*, 2002). La quercétine, par exemple, par exemple, est l'un des flavonoïdes les plus connus pour son activité inhibitrice sur la xanthine oxydase (Middleton et *al.*, 2000).

#### ❖ Induction de synthèse des enzymes antioxydantes

A la lumière des études récentes de biologie moléculaire dans le domaine de la signalisation cellulaire et le rôle probable des composés phénoliques dans ce processus, un nouveau mécanisme de défense antioxydante a été avancé. Ce mécanisme indique l'implication des composés phénoliques, notamment la catéchine et ses dérivés dans l'induction de l'expression des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) (Mattie et Freedaman, 2004 ; Masella et *al.*, 2005).



*Etude expérimentale*



*Matériels et méthodes*

## I- Matériel et méthodes

### I-1-Matériel végétal

La présente étude tente de tester quelques propriétés biologiques d'une plante largement utilisée en médecine traditionnelle locale, les feuilles d'*Inula viscosa*, afin d'évaluer l'activité anti-DPPH, chélation du fer et l'activité scavenging de peroxyde d'hydrogène.

#### I-1-1- Description

##### I-1-1-2- Famille des Astéracées

La famille des Astéracées ou Composées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 25 000 espèces réparties en 1 500 genres (Bohur et Stuessy, 2001). Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées (Guignard, 2001). Les plantes de cette famille sont très riches en sesquiterpènes notamment les lactones sesquiterpéniques (Rozerblat et *al.*, 2008).

##### I-1-1-3- Espèce *Inula viscosa* L.

*Inula viscosa* L. (figure N°18) Aiton (syn. : *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), appartenant à la famille des Astéracées (Levizou et *al.*, 2000; Hemández et *al.*, 2007), est un sous arbrisseau vivace de 40 à 100 cm de haut à tiges dressées, frutescentes à la base, et très feuillées. Ses feuilles sont petites vertes lancéolées, simples et alternes, dentelées et visqueuses (Baba Aissa, 1991). Ses fleurs sont jaunes rayonnantes, en capitules assez gros en longues grappes pyramidales (Mànez et *al.*, 1999). La floraison a lieu entre la fin du mois d'août et le mois de novembre. Ses fruits sont des akènes velus ; rétrécis en col au sommet (Baba Aissa, 2000).

#### - Noms vernaculaires

Français : Inule visqueuse (Baba Aissa, 2000).

Anglais : Stichky fleabane (Wang et *al.*, 2004)

Berbère : Amagramane (Baba Aissa, 2000).

**-Place dans la systématique**

La classification botanique de l'espèce *Inula viscosa* L. selon Guignard. (2001) est :

**Règne :** Végétal

**Embranchement :** Spermaphyte

**Sous embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous classe :** Astérides

**Ordre :** Astérales

**Famille :** Astéracées, composées

**Genre :** *Inula*

**Espèce :** *Inula viscosa* L.



**Figur N°18 :** Photo d'*Inula viscosa* L

**-Distribution**

L'inule visqueuse est originaire du bassin méditerranéen, elle est distribuée largement dans le sud d'Espagne, le nord de l'Afrique et le moyen orient (Maoz et *al.*, 2000 ; Wang et *al.*, 2004 ; Stavrianakou et *al.*, 2006). Cette espèce pousse sur les lieux incultes et rocaillieux dans des sols secs et calcaires (Hernandez et *al.*, 2001).

**I-1-1-4- Usage traditionnel de l'*Inula viscosa* L.**

Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connu depuis longtemps dans les médications traditionnelles. Elle est utilisée pour ses activités (tableau II): anti-inflammatoire, antipyrétique, antiseptique, antiphlogistique et dans le traitement du diabète (Ali-Shtayeh et *al.*, 1998 ; Maoz et *al.*, 1999 ; Rozenblat et *al.*, 2008). En Algérie, l'inule visqueuse jouit d'une grande popularité, où elle est utilisée sous forme du suc de feuilles fraîches pour arrêter les hémorragies, prévenir les inflammations et activer les cicatrifications (Baba Aissa, 2000).

Tableau II : Quelques usages traditionnels de l'*Inula viscosa* L.

Pays	Parties utilisées	Voie	Usage	Références
Palestine	Plante entière	Externe	Antispasmodique, sédatif, antiseptique, Antirhumatisme, Blessures curatives, contre les maux de têtes, traitements des hémorroïdes.	Ali-Shtayeh <i>et al.</i> , 2000
		Interne	Antispasmodique, anti-diabétique, anti-helminthique, diurétique.	
Jordan	Feuilles	Orale	Abortif, anti-fertilité.	Al-Dissi <i>et al.</i> , 2001
	Parties aériennes	Injection	Anti-inflammatoire, anti-ulcérogénique	Alkofahi et Atta, 1999.
Israël	Partie aérienne		Anti-inflammatoire	Alkofahi et Atta, 1999
Espagne	Partie aérienne Fleurs	Injection péritonéal	Anti-inflammatoire, Anti-septique	Hernandez <i>et al.</i> 2005 ; Hernández <i>et al.</i> , 2007.
	Feuilles	Infusion	Anti-inflammatoire, antilithique rénal, diurétique. Antihypertensif.	Fresquet <i>et al.</i> , 1993
		Cataplasme de feuilles fraîches.	Topique : Hémostatique. Antiseptique, analgésique, Antirhumatisme.	
Algérie	Feuilles	Cataplasme	Céphalées, les douleurs rhumatismales. Cicatrisation, antihémorragiques	Baba Aissa, 2000
	Plante entière	Orale	Hypoglycémiant, affection des voies urinaires. Analgésique, antiseptique, diurétique, hémostatique, vermifuge	
France	Racines	Orale	Expectorant, tonique (estomac), vermifuge, tuberculose, antiseptique	Iserin, 2001
Maroc	Feuilles	Orale	Anti-diabétique, Hypoglycémiant, tuberculose, affections pulmonaires	Zeggwagh <i>et al.</i> , 2006 ; Sqalli <i>et al.</i> , 2007

## I-2- Méthodes

### I-2-1- Préparation du matériel végétal

#### ❖ Récolte

Les feuilles d'*Inula viscosa* ont été récoltées en novembre 2011 dans la forêt de Draa El Gaid ; un site situé dans la localité de Kharrata, wilaya de Bejaia, dans un endroit propre, loin de tout impact de pollution et après la disparition de la rosée du matin, et ce pour écarter toute modification dans la composition chimique de l'espèce.

#### ❖ Séchage

Les feuilles d'*Inula viscosa* ont été séchées à l'air libre et à une température ambiante puis mises à l'étuve pour éliminer toutes traces d'humidité.

#### ❖ Broyage

A l'aide d'un broyeur électrique les feuilles ont été broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

#### ❖ Tamisage

Les feuilles séchées ont été réduites en poudres, puis tamisées dans le but d'obtenir une poudre très fine. Seules les fractions les plus fines de diamètre inférieur à 50  $\mu\text{m}$  qui sont utilisées pour l'extraction.

### I-2-2- Extraction

Le procédé d'extraction que nous employons au niveau de notre laboratoire est celui de Chiang et ses collaborateurs (1994), qui porte sur trois principales étapes (figure N° 19).

La première est la macération de la matière végétale fine dans l'éthanol (95%) à raison de 4,0ml pour 1,0g de la poudre végétale sous agitation pendant 24h. La suspension éthanolique est ensuite laissée se décanter (24 h) pour donner deux phases bien distinctes; une phase de précipité de la matière végétale et une phase de surnageant qui est la solution éthanolique de l'extrait végétale. Cette dernière est récupérée soigneusement et soumise au séchage à la température ambiante de laboratoire loin de la lumière vive.

A la stabilité de son poids, l'extrait éthanolique, mis à part une petite portion retenue pour l'étude, est transféré dans un mélange acétate d'éthyle/ eau (3/1 : v/v). Au bout de 24 h de macération, deux phases non miscibles (une phase aqueuse d'acétate d'éthyle et une phase organique d'acétate d'éthyle) ont été obtenues; celles-ci ont été séparées soigneusement et laissées sécher dans les mêmes conditions citées précédemment.

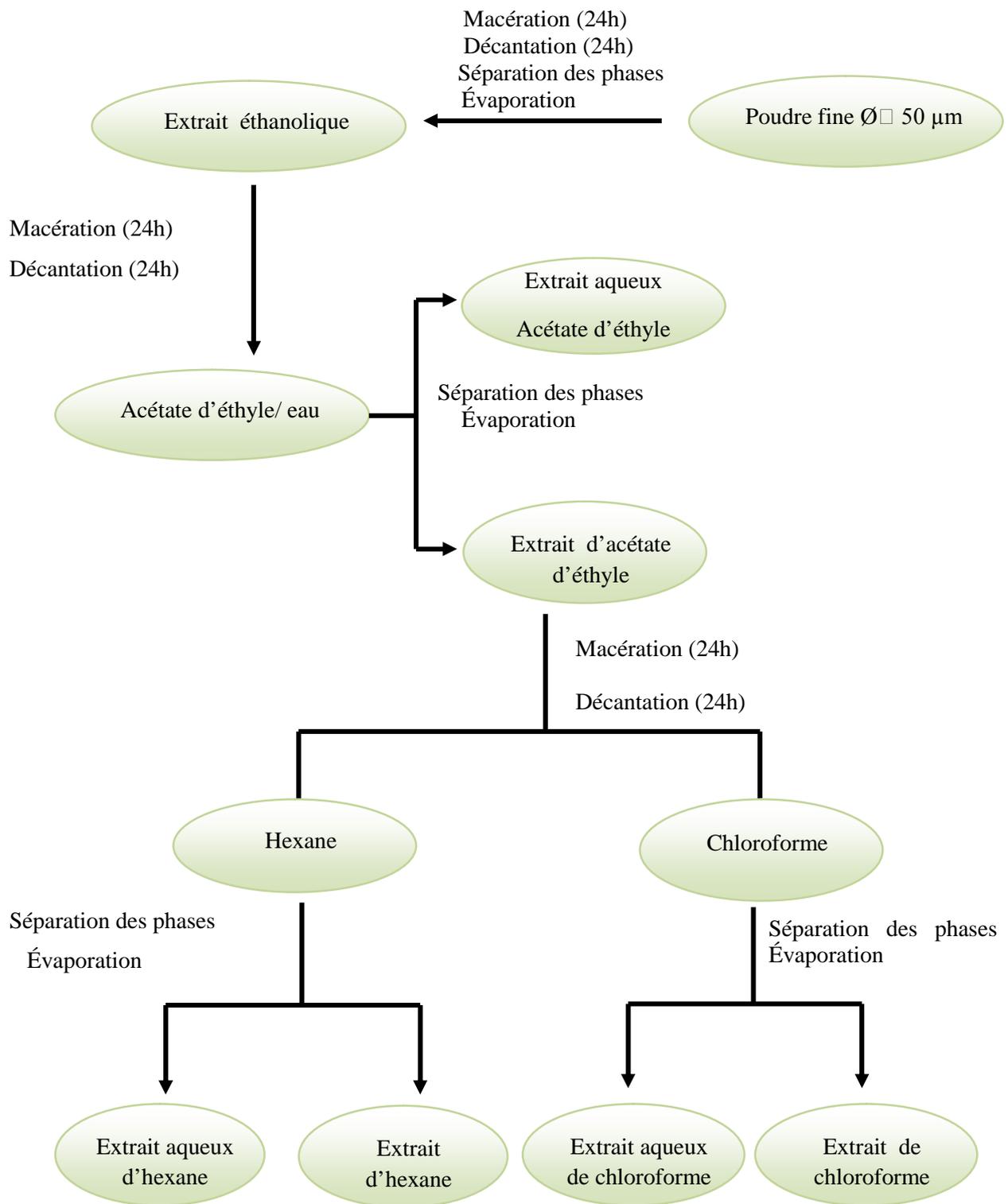
Après avoir mis de côté la phase aqueuse d'acétate d'éthyle et une petite portion de l'extrait d'acétate d'éthyle, le reste de cette dernière est répartie équitablement en deux parties; dont chacune est transférée dans un mélange soit d'hexane/eau ou chloroforme/eau (3 :1, v/v). Après une nuit de macération, quatre phases ont été obtenues séparément et laissées sécher jusqu'à la stabilisation de leur poids sec. Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] 100$$

**P<sub>1</sub>** : poids d'extrait après évaporation (g).

**P<sub>0</sub>** : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

**E** : poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).



**Figure N° 19** : Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang *et al.*, 1994) .

### I-2-3- Dosage des composés phénoliques

#### I-2-3-1- Dosage des phénols totaux

##### ❖ Principe

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1982).

##### ❖ Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi dans cette étude pour le dosage des phénols totaux des extraits de feuilles d'*I.viscosa* est celui de Kähkönen et *al* (1999).

Nous avons introduit dans chaque tube un volume de 200  $\mu$ l de la solution d'extrait à une concentration de 1  $\mu$ g/ml, par la suite, nous avons rajouté 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 800  $\mu$ l de carbonate de sodium (7,5 %). le mélange est laissé réagir à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, la lecture des absorbances est faite à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait (Vermerris et Nicholson, 2006).

Une courbe d'étalonnage a été préalablement préparée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme référence. Les résultats seront exprimés en mg Equivalent catéchine/g d'extrait (Annexe 1).

#### I-2-3-2-Dosage des flavonoïdes

##### ❖ Principe

Les méthodes de dosage des flavonoïdes sont le plus souvent colorimétriques ; elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le pic d'absorption est fixé à la longueur d'onde de 430nm.

❖ **Mode opératoire**

La méthode du chlorure d'aluminium rapportée par Maksimovié et ses collaborateurs (2004) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *F.angustifolia*. 2 ml de l'extrait (1µg/ml) ont été rajoutés à 1 ml de réactif de chlorure d'aluminium (133mg du chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100 ml d'eau distillée). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine et sont exprimées en milligramme d'équivalent rutine par gramme d'extrait (mg Equivalent Rutine/g d'extrait) (Annexe 2).

**I-2-3-3-Dosage des tanins condensés**❖ **Principe**

Le dosage des tanins condensés des extraits de feuilles d'*I.viscosa*, a été réalisé selon la méthode décrite par Vermerris et Nicholson (2006). Ces auteurs ont utilisé la méthode d'hydrolyse acide. Etant donné que les tannins condensés, sont résistants à l'hydrolyse, et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées proanthocyanidines.

❖ **Mode opératoire**

Un volume de 100 µl de l'extrait (1µg/ml) a été rajouté à 2 ml de la solution de ferrosulfate (77 mg du sulfate de fer dans 500 ml de 2:3 HCL /Butanol). Après incubation du mélange réactionnel pendant 15minutes à 95°C, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 530 nm. Les taux en proanthocyanidines des extraits sont exprimés en milligramme équivalent cyanidine par rapport à 100 gramme de matière sèche (mg EC/100g MS), sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Concentration en proanthocyanidines} = \text{Abs} * \text{MM} * \text{FD} * 1000 / \epsilon * \text{L}$$

**Abs:** Absorbance à 530 nm.

**FD:** Facteur de dilution.

**MM:** Masse molaire de la cyanidine (287,24 g/mol).

**L:** Trajet optique.

**ε:** Coefficient d'extinction molaire de la cyanidine ( $\epsilon=34\ 700 \text{ L. mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

## I-2-4-Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

### I-2-4-1- Activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH

#### ❖ Principe

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des extraits de feuilles *d'I. viscosa* contre le radical DPPH est celle de Balasundram et *al.* (2007). Cette méthode tire de la décoloration de la solution méthanolique du radical DPPH lors de sa réduction par les antioxydants. La différence de l'absorbance, entre la solution du radical DPPH en absence et en présence de l'extrait reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire le radical DPPH, et le taux réduit du DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage suivant la forme suivante :

$$\% \text{ scavenger de radical DPPH} = [(A_T - (A_E - A_B))/A_T] \times 100$$

$A_T$  : absorbance de témoin (méthanol + 1ml DPPH).

$A_E$ : absorbance de l'échantillon (300  $\mu$ l extrait + 1ml DPPH).

$A_B$  : absorbance du blanc de l'échantillon. (300  $\mu$ l extrait+1ml méthanol).

#### ❖ Mode opératoire

Chaque 300  $\mu$ l des solutions méthanoliques des extraits (1 $\mu$ g/ml) a été additionnée de 1ml de la solution DPPH préparée à  $6.10^{-5}$ M dans du méthanol (95%). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesuré à 517nm. A titre d'indication, un standard : l'acide ascorbique, connu pour leur effet anti-radicalaire a été testé en parallèle.

### I-2-4-2-Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

#### ❖ Principe

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène est déterminée suivant la méthode rapportée par Atmani et *al.* (2009). Le principe de la réaction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécule d'eau. Le pourcentage d'inhibition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du H}_2\text{O}_2 \text{ radical DPPH} = (A_T - A_E/A_T) \times 100$$

$A_T$  : absorbance de témoin.

$A_E$ : absorbance de l'échantillon.

### ❖ Mode opératoire

Un volume de 2 ml d'extrait est mélangé avec 1,2 ml de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40mM) qui est préparé dans un tampon phosphate (pH= 7,4). L'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée à 230 nm après 10 min de réaction.

### I-2-4-2- Chélation de fer

#### ❖ Principe

Le principe de chélation de fer est basé sur le fait que le réactif de la ferrozine peut quantitativement former un complexe avec le fer (Fe<sup>2+</sup>-Ferrozine) ; chromophore violet ayant un maximum d'absorption à 562nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur violette qui est suivie spectrophotométriquement. L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = (A_T - A_E) / A_T \times 100$$

A<sub>T</sub> : absorbance de témoin.

A<sub>E</sub>: absorbance de l'échantillon.

#### ❖ Mode opératoire

L'activité de chélation de fer des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* a été réalisée selon le protocole de Dinis et al modifié (1994). Il s'agit d'introduire dans un tube à essai 100 µl d'extrait (1 µg+/ml), 200 µl de FeCl<sub>2</sub> (0,2 mM) et 500 µl de H<sub>2</sub>O. Après agitation, un volume de 200 µl de ferrozine (5mM) a été ajouté suivi d'une agitation rigoureuse du mélange. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la lecture d'absorbance a été effectuée à 562 nm. Le même procédé a été réalisé sur l'EDTA, qui est utilisé comme chélateurs de référence.

### I-3- Etude statistique

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application « ANOVA » à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5 et le seuil de significativité est fixé à P< 0,05.



## *Résultats et discussion*

## **II- Résultats et discussions**

Le présent travail s'articule sur trois parties, on retrouvera ainsi les résultats concernant l'extraction et le dosage des composés phénoliques suivi de ceux relatifs à l'activité antioxydante.

### **II-1- Préparation des extraits**

Les procédés d'extraction des antioxydants phytochimiques à partir des plantes médicinales constituent une étape cruciale, car elle est déterminante de la qualité et de la quantité de principes actifs recherchés, qui reflètent directement leurs activités pharmacologiques. Considérant la diversité et les propriétés structurales complexes de ces composés, notamment les composés phénoliques, il est impossible de mettre au point des méthodes exhaustives pour leur extraction (Vercauteren et *al.*, 1998). Ainsi, les conditions de l'extraction, à savoir le type du solvant, la taille des particules, l'état du matériel végétal (sec ou frais) et les conditions thermiques de l'extraction peuvent influencer significativement le taux et la nature des composés extraits (Naczka et Shahidi, 2006 ; Lim et Murtijaya, 2007).

Dans notre cas, avant de procéder à l'extraction, nous avons d'abord séché le matériel végétal à l'air libre et à l'abri de la lumière comme préconisé par Rijke et al (2006), afin d'éviter la dégradation de certains composés phénoliques sous l'effet des hydrolases qui peuvent exister dans le matériel végétal frais. Par la suite, la matière sèche retenue est réduite en poudre fine, pour augmenter la surface de contact avec le solvant et améliorer le rendement de l'extraction. Dans le but d'optimiser l'extraction, le broyage et le tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer la poudre la plus fine possible ayant un diamètre inférieur à 50µm. Selon Escribano et ses collaborateurs (2003), l'efficacité de l'extraction dépend de plusieurs paramètres ; entre autres, le diamètre des particules de la poudre, le volume et le type de solvants utilisés et le nombre d'extraction. D'après Lim et Murtijaya (2007), le taux d'extraction des principes actifs est inversement proportionnel avec la taille des particules obtenues après le broyage.

Le protocole d'extraction choisi utilise des solvants de degré de polarité décroissant afin de séparer et sélectionner les composés phénoliques (Chiang et *al.*, 1994). L'utilisation de l'éthanol dans la première étape d'extraction est connu comme un excellent solvant

d'extraction de métabolites secondaires tels que les polyphénols avec une faible toxicité (Contini et *al.*, 2008).

Le taux d'extraction de l'extrait éthanolique a été calculé à partir de la poudre initiale et la suite des taux sont calculés à partir de l'extrait issu de l'étape précédente. Le taux d'extraction de notre plante est présenté dans le tableau III.

**Tableau III** : Taux d'extraction (%) de feuilles d'*Inula viscosa*.

Solvants	Taux d'extraction (%)
Ethanol	8,54
Acétate d'éthyle	43,92
Aqueux acétate d'éthyle	41,98
Chloroforme	70,45
Chloroforme aqueux	9,84
Hexane	28
Hexane aqueux	10

-Chaque pourcentage est calculé par rapport à l'extrait dont il est issu précédemment.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les taux d'extraction sont différents d'un solvant à un autre. L'extrait éthanolique des feuilles d'*I. viscosa* a présenté un taux d'extraction de 8,54%.

Un taux d'extraction de 31,72% de l'extrait éthanolique des feuilles d'*I. viscosa* cultivée en Maroc, est obtenu par une étude menée par Bssaibis et al. (2009), ceci peut être expliqué par la différence de la période de récolte et la méthode d'extraction.

La deuxième étape, l'extraction liquide-liquide est beaucoup plus qualitative que quantitative, car elle repose sur la répartition sélective des composés contenus dans l'extrait éthanolique retenu selon leur solubilité entre les phases organiques utilisés: acétate d'éthyle, chloroforme et hexane et leurs phases aqueuses correspondantes. Nous constatons que la majeure partie des composés de l'extrait éthanolique de feuilles d'*I.viscosa* ont tendance à se

répartir presque équitablement, entre les deux phases d'acétate d'éthyle, dont les taux d'extraction atteignent une moyenne de 40%.

Concernant l'extrait chloroforme, on constate un taux d'extraction de la phase organique largement supérieure, de celui de la phase aqueux des feuilles d'*I.viscosa* (70,45%, 9,84% respectivement). La même tendance de variation est observée lors de la comparaison des deux phases d'extrait hexane, où le taux d'extraction de la phase organique est beaucoup plus élevé (28%) par rapport à celui de la phase aqueuse (10%), ce qui donne un signe de sa richesse en composés apolaires. A titre comparatif, selon Velazquez et al. (2003), les taux d'extractions par chloroforme et hexane des composés phénoliques d'une plante *Schinus weinmannifolia* de famille anacardiaceae sont largement faibles 3% et 5,3% respectivement comparé à nos résultats. Ce qui laisse présumer la richesse de notre plante en composés phénoliques.

Par ailleurs, une autre étude menée par l'équipe Wang (2004) sur la même espèce rapporte un rendement de 28,2% pour l'extrait hexane, ce qui est proche du rendement obtenu dans la présente étude.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature, car le taux n'est que relatif et semble être influencé non seulement par la méthode appliquée dans l'extraction, mais aussi par la nature chimique des composés à extraire et le solvant à utiliser. Mais ce taux est lié surtout aux propriétés génétique des plantes ainsi qu'à l'origine géographique qui contribuent aux différences de rendement enregistrées d'une plante à une autre et même au sein de la même espèce (Kordali et al., 2003 ; Kivkac et Akay, 2005).

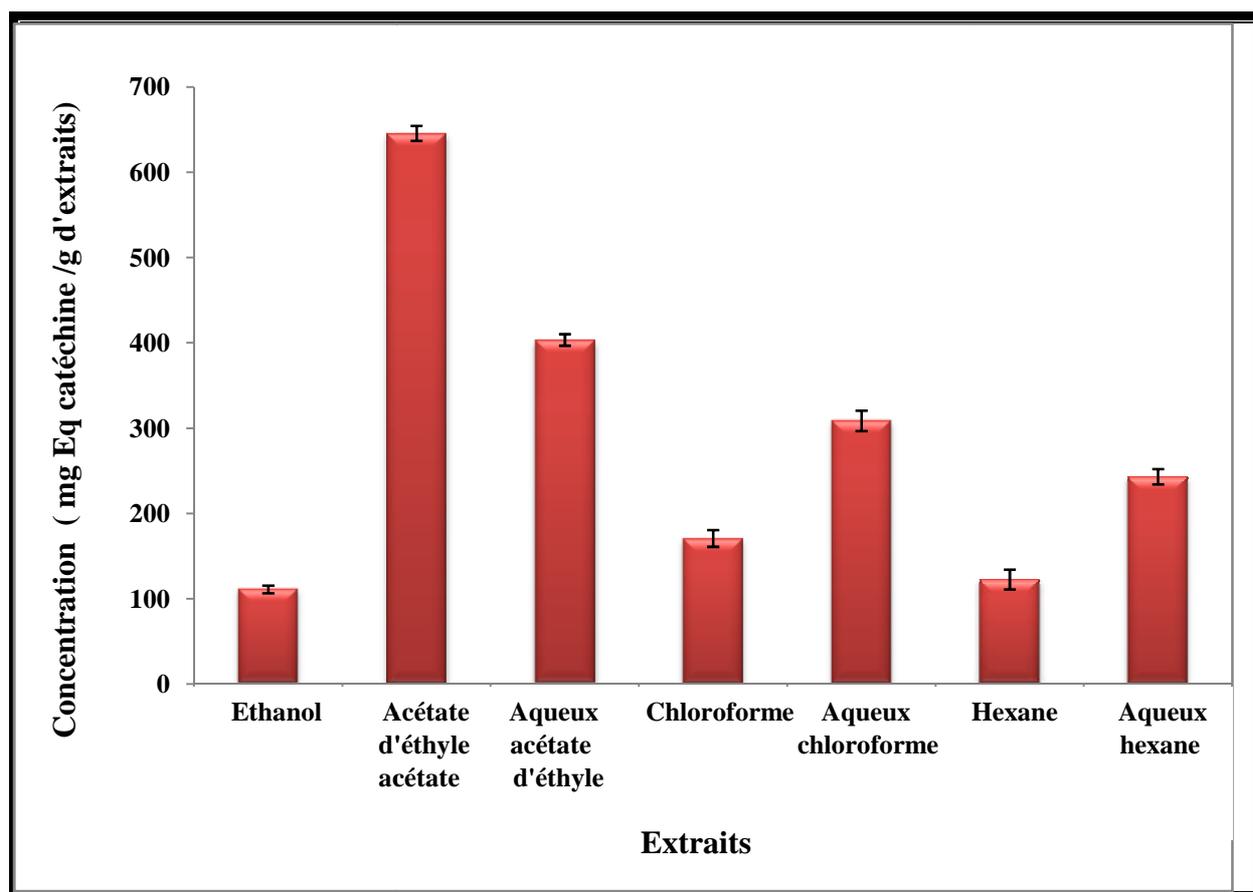
Le critère de taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car les extraits de plantes contiennent d'autres pigments. Cette évidence est montrée dans l'étude de dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins discutés ci-dessous.

## II-2- Dosage des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits préparés à partir de feuilles d'*Inula viscosa*, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins a été effectué. La principale raison pour le choix de ces substances résidus dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

### II-2-1- Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits ont été exprimées, en équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq Cat / g d'extrait), à partir de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (Annexe1). Les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous.



**Figure N° 20** : Histogramme des teneurs en phénols totaux des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

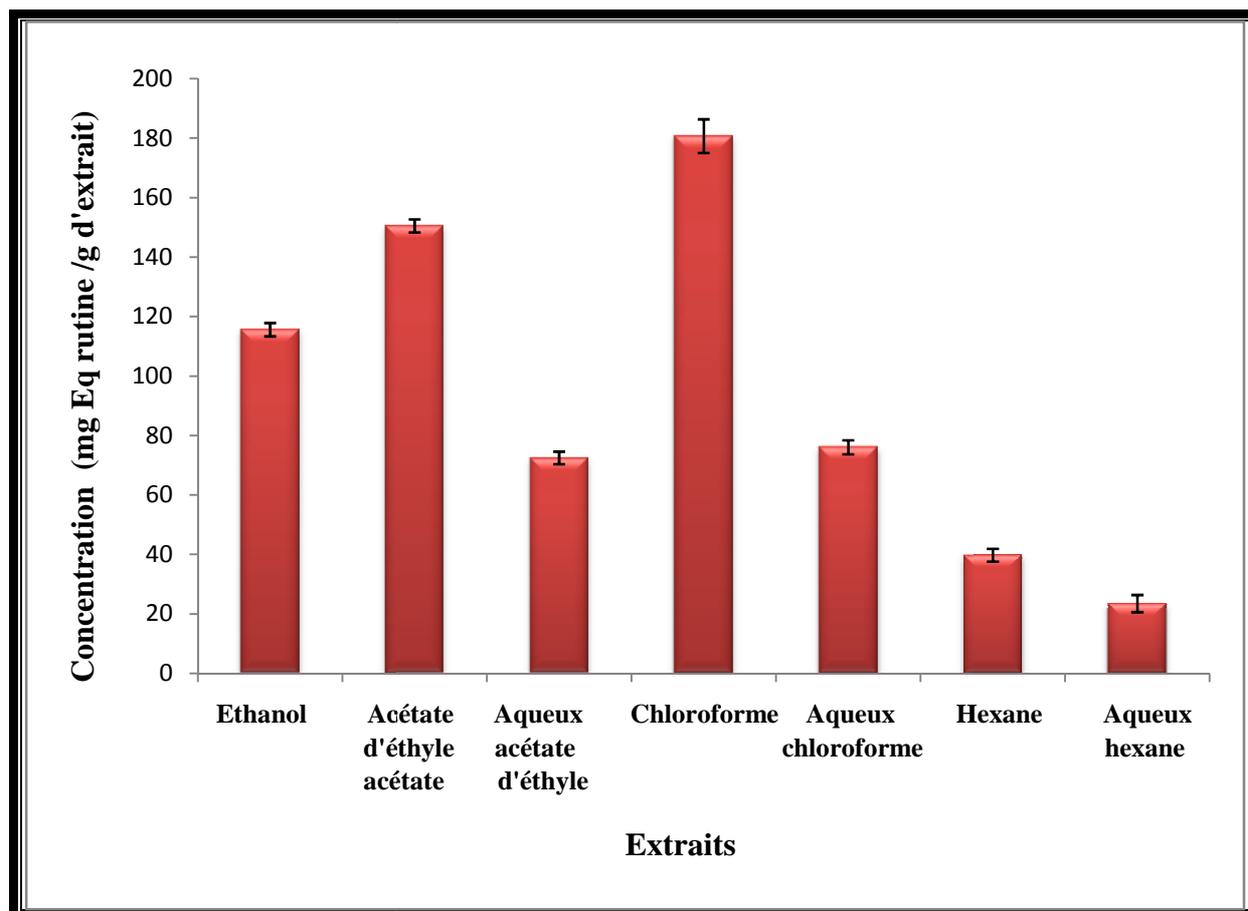
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Le dosage quantitatif des phénols totaux des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa* a révélé que les extraits d'acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme marquent les taux les plus élevés ( $P \leq 0,05$ ) avec des teneurs de  $645,58 \pm 8,77$ ,  $403,28 \pm 6,78$  et  $308,41 \pm 11,93$  mg Eq cat/g d'extrait, respectivement. Par contre, l'extrait éthanolique a montré le taux le plus faible avec  $110,71 \pm 4,56$  mg Eq cat/g d'extrait, ce qui pourrait être due à l'encombrement qui empêche le contact entre le réactif et certains composés qui se trouvent liés. D'autre part, trois valeurs importantes en phénols totaux de  $242,76 \pm 9,01$ ,  $170,46 \pm 9,82$  et  $122 \pm 25$  mg Eq cat/g d'extrait ont été enregistrées par les extraits aqueux hexane, chloroforme et hexane, respectivement. Ce qui indique que l'*I.viscosa* est riche en composés phénoliques.

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 1999 ; Macheix et al., 2005). Cette propriété est prouvée par nos résultats de dosage des phénols totaux dont l'évaluation globale des teneurs des extraits en ces composés indique qu'ils sont plus concentrés dans l'extrait organique polaire (acétate d'éthyle) et dans les phases aqueuses, que dans les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane). En effet, la richesse des extraits aqueux en phénols totaux peut être due à la présence des composés phénoliques riches en groupements hydroxyles (OH) (Topçu et al., 2007).

### II-2-2- Dosage des flavonoïdes

Pour le dosage des flavonoïdes on utilise souvent la méthode de chlorure d'aluminium basée sur la capacité de ces composés à former des complexes de couleur jaune avec l' $\text{AlCl}_3$  (Huang et al., 2004 ; Prasad, 2009). Dans notre étude, l'évaluation des teneurs des extraits de feuilles d'*I.viscosa* en flavonoïdes a été déduite de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) réalisée avec la rutine et les valeurs sont exprimées en mg Eq rut/g d'extrait. Les résultats sont représentés dans la figure suivante :



**Figure N°21** : Histogramme des teneurs en flavonoïdes des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

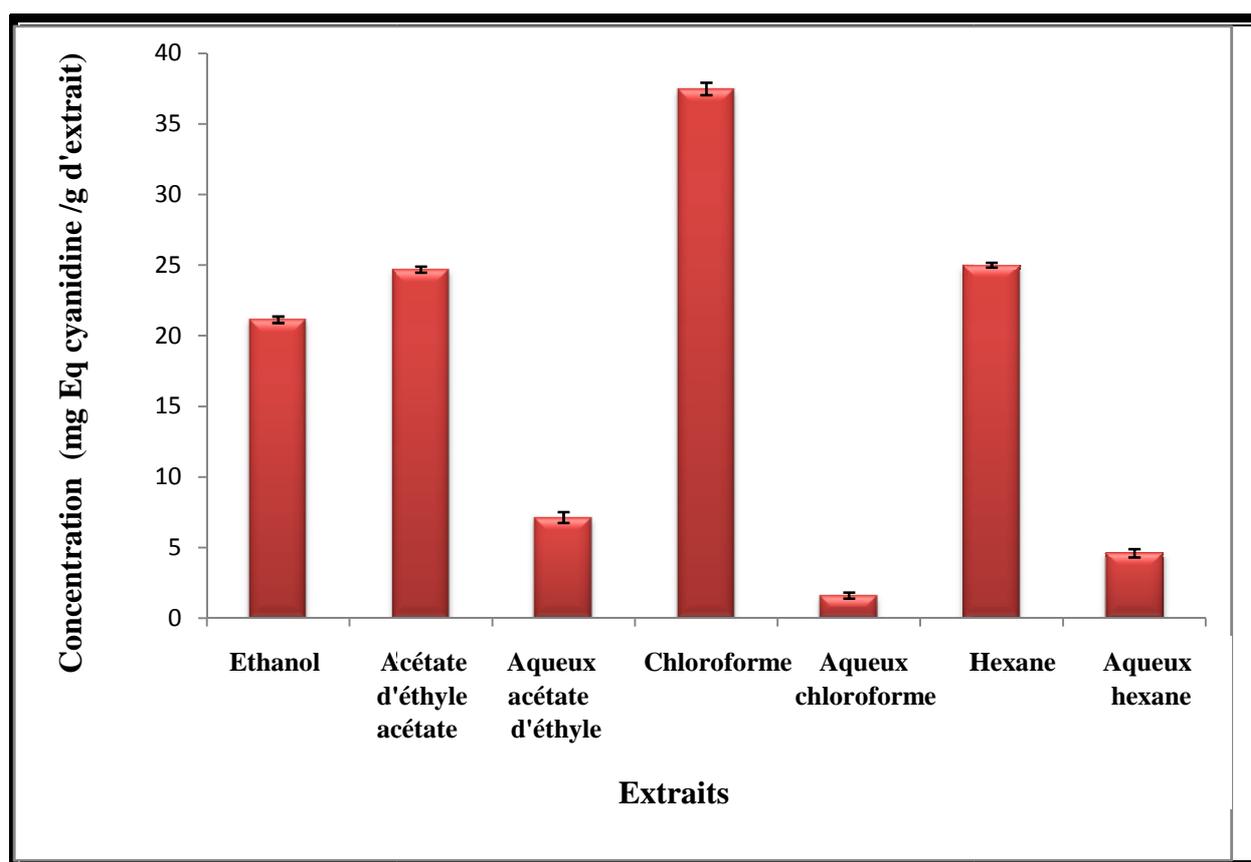
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

A la première lecture des résultats, les flavonoïdes des extraits de feuilles d'*I.viscosa* sont concentrés principalement au niveau de la phase organique de chloroforme avec  $180,69 \pm 5,64$  mg eq rutine / g d'extrait, suivi par les deux extraits éthanolique et acétate d'éthyle qui renferment les teneurs de  $115,60 \pm 2,25$  et  $150,50 \pm 2,22$  mg eq rutine / g d'extrait, respectivement. Par ailleurs, les taux les plus faibles sont observés au niveau des extraits hexane, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux d'hexane avec des taux de  $72,46 \pm 2,13$ ,  $76,05 \pm 2,33$  et  $23,50 \pm 1,23$  mg eq rutine / g d'extrait, respectivement. Ces résultats obtenus affirment la richesse de cette espèce en flavonoïdes et sont accord avec les résultats rapportés par plusieurs études (Grande et *al.*, 1985 ; Wollenweber et *al.*, 1991 ; Bruce et *al.*, 2001 ; Catalan, 2007 ; Harnandez et *al.*, 2007).

A la lumière des résultats obtenus, nous constatons qu'il y a une répartition hétérogène de ces composés entre les différents solvants d'extraction utilisés. Cela s'expliquerait d'une part, par la diversité moléculaire des flavonoïdes (Ghedira, 2005) et d'autre part, par le fait que ces composés ne se trouvent pas à l'état libre dans les tissus des végétaux ; par conséquent, leur complexation avec d'autres composés que se soit polaire ou apolaire peut influencer sur leur solubilité (Macheix, 2005). De cette présente analyse, on déduit que les extraits d'*I.viscosa* sont plutôt riches en flavonoïdes apolaires.

### II-2-3- Dosage des tannins condensés (Les proanthocyanidines)

Les taux en proanthocyanidines des extraits de feuilles d'*I. viscosa* sont exprimés en milligramme équivalent cyanidine par rapport à 100 gramme d'extraits (mg eq cyanidine/100g d'extraits). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :



**Figure N°22:** Histogramme des teneurs en tannins condensés des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

A la lumière de ces résultats, on déduit qu'il existe la même tendance de variation de la teneur en tannins condensés comme celle observée dans les résultats des dosages des flavonoïdes. En effet, les extraits organiques présentent des teneurs en proanthocyanidines nettement plus élevées ( $P \leq 0,05$ ) comparativement aux extraits aqueux. Cette répartition pourrait être expliquée par l'insolubilité des tannins condensés à haut poids moléculaire, dans les solutions aqueuses (Cheynier, 2005). En effet, Tian et al. (2009), en utilisant 5 solvants de polarité différentes, n'ont rapporté que 91,5% du totale des tannins sont solubles dans les solvants de faible polarité ou apolaires (éther et acétate d'éthyle) et que seul 8,5% des tannins sont solubles dans les solvants à forte polarité (éthanol et eau).

En analysant les résultats obtenus, il ressort d'une part, seul l'extrait chloroforme affiche un taux important estimé à  $37,84 \pm 0,43$  mg eq cyanidine / 100 g d'extrait, suivi par les extraits éthanolique, acétate d'éthyle et chloroforme qui dépassent 20 mg eq cyanidine / 100 g d'extrait. Tandis que les extraits aqueux enregistrent des teneurs inférieures à 7 mg eq cyanidine / 100 g d'extrait.

### II-3- Activité antioxydante

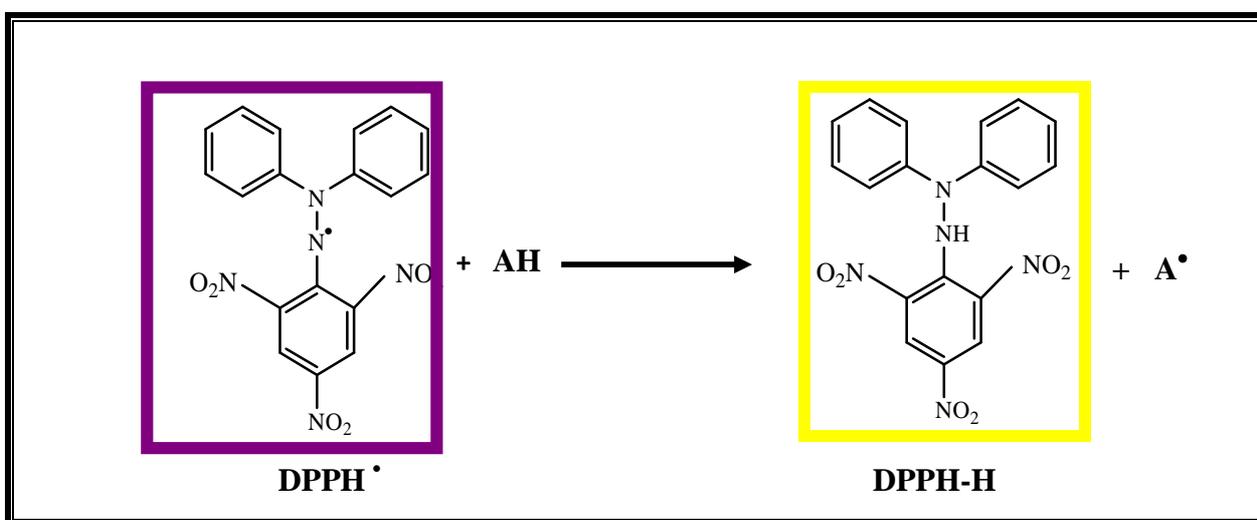
De nombreuses méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro*. Ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité réductrice, piégeage des radicaux ou chélation des ions comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant (Javanmardi et al., 2003 ; Marc et al., 2004).

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'*I.viscosa* ont été menées par trois méthodes complémentaires: piégeage du radical (DPPH<sup>•</sup>), chélation de fer et l'activité scavenger du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Comme il n'y a pas de consensus scientifique pour une méthode de référence pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, ainsi la combinaison de différents tests est un indicateur de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Amic et al., 2003).

### II-3-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

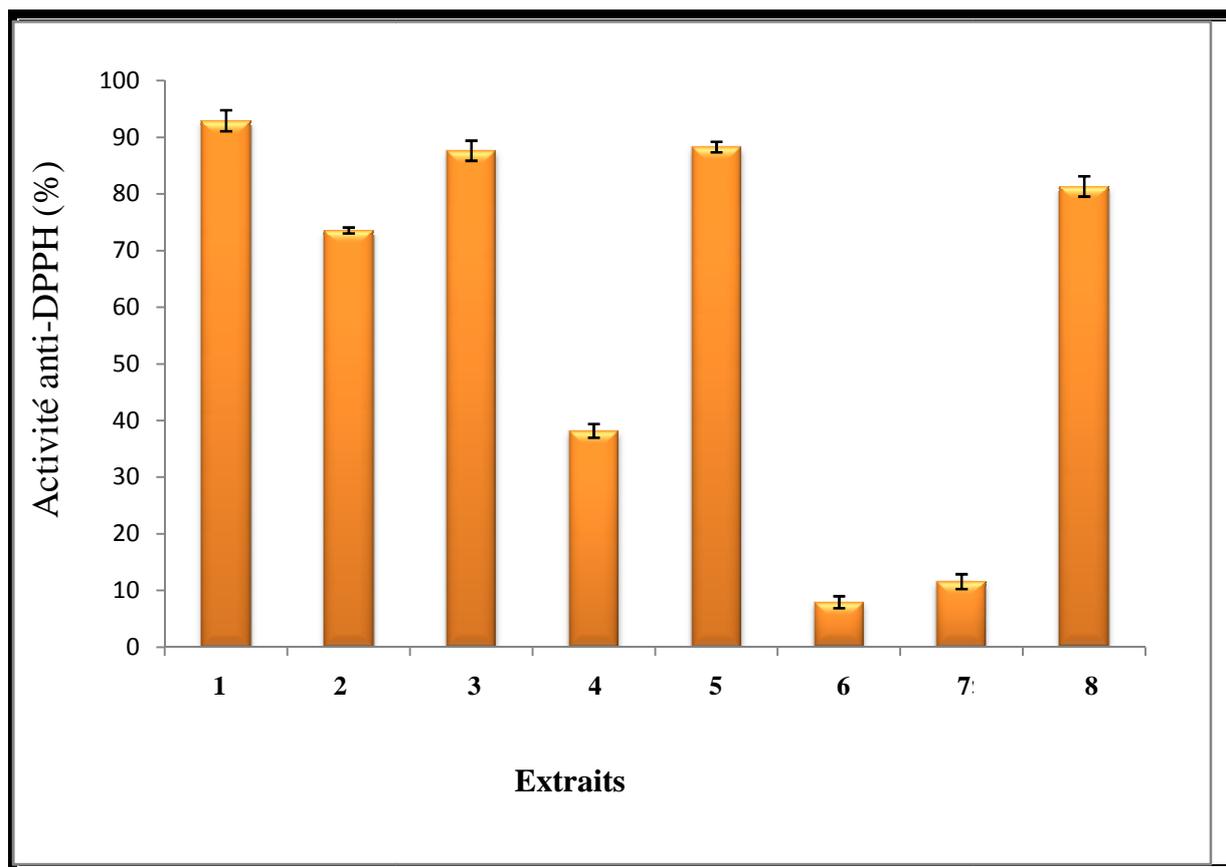
Le radical DPPH (2,2 diphényl 1-picryl hydrazyl) est largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydant des molécules biologiques, c'est un radical synthétique organique stable, qui peut être réduit en présence des antioxydants par transfert d'électron ou de proton (figure N°23). Ainsi la coloration violette typique du DPPH se dissipe et l'intensité de la réaction dépendra du potentiel antioxydant des substances testées (Elmastas et *al.*, 2006).



**Figure N°23** : Réduction du radical DPPH par un antioxydant (Amic et *al.*, 2003).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits et de standard exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la figure (N°24).

Après analyse de ces résultats, il ressort que les effets des extraits de feuilles d'*I.viscosa* sont variables d'un extrait à un autre. Cela peut s'expliquer par la teneur et la nature des composés phénoliques extraits par chaque solvant utilisé lors du procédé d'extraction. Ce résultat, est déjà observé par Shyu et ses collègues (2009) ainsi que Simirgiotis et ses collègues (2009), en utilisant plusieurs solvants d'extraction.



**Figure N°24 :** Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles d'*I.viscosa* et une molécule de référence à 1µg/ml. **1** : Ethanol ; **2** : Acétate d'éthyle ; **3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **4** : Chloroforme ; **5** : Aqueux du chloroforme ; **6** : Hexane ; **7** : Aqueux d'hexane ; **8** : Acide ascorbique.  
-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

Selon les résultats illustrés dans cette figure, on constate que les extraits organiques polaires et les extraits aqueux ont exhibé de puissants effets svacengers contre le radical DPPH à 1µg/ml. En effet, les extraits aqueux du chloroforme, aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait éthanolique présentent les meilleures activités avec des taux de 87,61% ; 88,25% et 92,45%, respectivement, et qui sont supérieurs ( $P < 0,05$ ) à celui de l'acide ascorbique (81,32%). Les mêmes constatations sont signalées par Danino et ses collaborateurs (2009) concernant l'efficacité des extraits de feuilles d'*I. viscosa* à piéger le radical DPPH par rapport aux molécules de références.

Cependant, les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane) et l'extrait aqueux d'hexane ont exhibé les plus faibles activités avec des taux de 38,17% ; 7,92% et 11,60%, respectivement.

La divergence des résultats s'expliquerait non seulement par la richesse des extraits polaires en phénols totaux, mais pourrait être attribuée à la présence des groupements hydroxyles qui jouent un rôle primordial dans l'activité anti-radicalaire (Robards *et al.*, 1999). En effet, l'acide ascorbique qui est connu comme étant un antioxydant pauvre en noyau phénolique mais avec quatre groupements hydroxyles (Erkan *et al.*, 2008), a montré une très forte activité anti-radicalaire par rapport au BHA et à l' $\alpha$ -tocophérol avec un et deux groupements hydroxyles liés à un noyau aromatique respectivement. En outre, Brand-Williams *et al.* (1995) ont montré que l'acide caféique portant deux groupements hydroxyles a eu une très forte activité scavenger contre le radical DPPH que l'acide rosmarinique, portant quatre groupements hydroxyles. Ainsi, le nombre de groupements hydroxyles présents dans la structure chimique d'une molécule antioxydante n'est pas toujours le seul facteur déterminant son activité antioxydante (Choi *et al.*, 2002 ; Jun *et al.*, 2005). La position des groupements hydroxyles, la présence d'autres groupes fonctionnelles dans la molécule telles que les doubles liaisons conjuguées avec les groupements OH également ainsi le caractère hautement nucléophile du noyau aromatique jouent des rôles importants dans les activités antioxydantes (Erkan *et al.*, 2008). Tous ces paramètres permettent une délocalisation des électrons offrant une résonance et une structure stable à cette molécule antioxydante.

D'après ces résultats, on conclut que les extraits aqueux de feuilles d'*I.viscosa* possèdent un potentiel anti-radicalaire hautement appréciable contre le radical DPPH. Ces résultats se justifieraient par les teneurs variables et la diversité des molécules contenues d'un extrait à un autre.

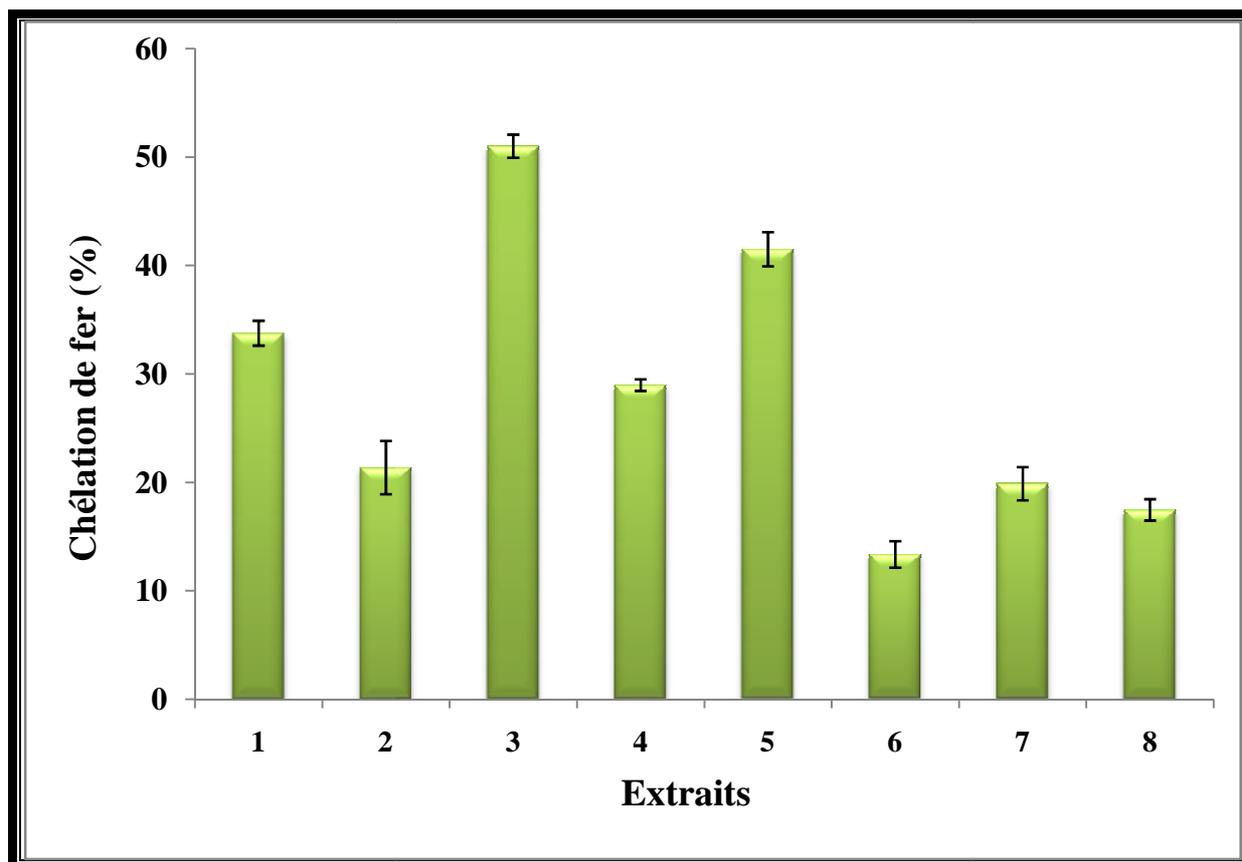
Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation entre les phénols totaux et les flavonoïdes a révélé des valeurs positives moyennes pour les extraits des feuilles d'*I.viscosa* avec  $r=0,66$  et  $r=0,46$  (annexe N°3 et N°4), respectivement. Il a été rapporté par plusieurs auteurs que les composés phénoliques sont les antioxydants majoritaires des extraits de plantes médicinales (Cai *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2006). Cependant, la corrélation entre l'effet anti-DPPH des extraits de feuilles d'*I. viscosa* et leurs teneurs en tannins condensés est de 0,27 (annexe N°5), suggérant probablement un rôle modeste des tannins. Ce résultat s'expliquerait par le fait que les tannins, à des concentrations élevées, peuvent interagir entre eux et réduit par conséquent la disponibilité des fonctions hydroxyles des groupements galloyles impliqués dans cette activité.

D'après tous ces résultats obtenus, il est clair qu'il y a une contribution des antioxydants dans l'effet anti-DPPH tels que les terpènes, vitamines, caroténoïdes (Javanmardi et al., 2003). Effectivement, il a été rapporté que l'*I. viscosa* est riche en monoterpènes oxygénés, en sesquiterpènes et en huiles essentielles (Robertet, 2000 ; Hernández et al., 2007 ; Máñez et al., 2007; Rozenblat et al., 2008).

### II-3-3- Chélation de fer des extraits de feuilles d'*I.viscosa*

La chélation est un processus physico chimique au cours duquel est formé un complexe entre un ligand, dit chélateur ou chélatant, et un cation métallique (ion de fer ou de cuivre), on appelle le complexe formé un chélate. En effet, le fer est responsable de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton et Haber-Weiss (Pietta, 2000). Ces radicaux peuvent mener à la peroxydation de lipide, à la modification de protéine et aux dommages d'ADN. Les agents de chélation peuvent inactiver ces ions métalliques (Finefrock et al., 2003). Les polyphénols considérés comme des bons chélateurs, ont un pouvoir de capter, stocker et transporter des métaux de transition tel que le fer (Stadtman, 1992).

Cette étude a été effectuée dans le but de mesurer la capacité des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* à inhiber la formation du complexe ferrozine-Fe<sup>2+</sup>. Les pourcentages d'inhibition des extraits ainsi que celui d'un standard EDTA sont présentés dans la figure (N°25).



**Figure N°25 :** Activité chélatrice des extraits de feuilles d'*I.viscosa* et une molécule de référence à 1µg/ml. 1 : Ethanol ; 2 : Acétate d'éthyle ; 3 : Aqueux d'acétate d'éthyle ; 4 : Chloroforme ; 5 : Aqueux du chloroforme ; 6 : Hexane ; 7 : Aqueux d'hexane ; 8 : EDTA.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

A la première lecture des résultats illustrés dans la figure (N°25), on constate que l'activité chélatrice de fer diffère d'un extrait à un autre, et que la plupart des extraits affichent des taux d'inhibition, allant de 20% à 52%, hautement supérieure à celle de molécule de référence EDTA (30,97%). La raison de cette différence dans les activités peut être due à la quantité variable des composés phénoliques contenue dans les extraits (Laughton et *al.*, 1989). En effet, la meilleure activité chélatrice de fer a été obtenue à partir de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle 51,89%, suivi de l'extrait aqueux de chloroforme et l'extrait éthanolique qui présentent une activité de 41,51% et 33,76%, respectivement. Les activités les plus faibles mais qui restent satisfaisantes par rapport aux standard utilisé, ont été obtenues avec l'extrait organique et aqueux d'hexane avec des taux de 13,37% et 19,89%, respectivement.

On remarque que les phases aqueuses et les extraits organiques polaires (éthanol, acétate d'éthyle) ont enregistré des valeurs appréciables. Cela peut être expliqué par le fait

qu'ils contiennent des composés polaires riches en groupements hydroxyles (responsables de l'effet scavenger) tel que les flavonoïdes et les phénols simples.

En outre, il a été démontré par plusieurs auteurs que la chélation des métaux  $Fe^{2+}$  par les polyphénols est due principalement aux flavonoïdes (Davis et Brodbelt, 2004 ; Valko et *al.*, 2006). En effet, il a été démontré que l'effet piègeur des flavonoïdes dépend de leur structure, ils sont connus pour leurs capacités de chélation des métaux (Morel et *al.*, 1994). Ainsi, la rutine et la quercétine sont de très bons chélateurs de fer et de cuivre impliqués dans la génération des radicaux libres. Ils peuvent prévenir l'oxydation et empêchent la formation du radical OH, inhibant ainsi le développement de la réaction de Fenton (Wei et *al.*, 2002 ; Lee et *al.*, 2004; Cillard et Cillard, 2006).

Malgré la richesse des deux extraits organiques d'acétate d'éthyle et chloroforme en flavonoïdes, comme il a été rapporté par les résultats de dosage (150.3mg eq rut/g d'extrait et 180.23mg eq rut/g d'extrait, respectivement) et malgré le puissant effet anti-radicalaire de cette classe de composés phénoliques, qui intervient en chélatant le fer comme expliqué précédemment, le rendement de ces deux derniers extraits reste modéré en les comparant à celui des extraits aqueux. Par ailleurs, il n'y a pas une bonne corrélation entre l'activité chélatrice du fer et la teneur en phénols totaux, ainsi que les flavonoïdes des extraits ( $r=0,09$ ) et ( $r=0,1$ ), respectivement (Annexe N°6 et N°7).

Notre résultat témoigne encore une fois, comme s'est fait par Chen et ses collaborateurs (2002) et Chung et son équipe (2006) que l'activité chélatrice est fortement associée à la structure chimique des composés et pas uniquement à leur concentration. En effet, d'après Pietta (2000), les groupements fonctionnels responsables de cette chélation de  $Fe^{2+}$  peuvent être :

- Les groupements en position 3', 4' dihydroxyle dans le noyau B.
- La fonction 4-oxo et le groupement 3-OH du cycle C.
- La fonction 4-oxo et le groupement 5-OH entre les cycles A et C.

Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas les groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice, par exemple la conjugaison d'un composé phénolique à structure catéchol avec une partie glucidique entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong et

*al.*, 2006). Une autre étude réalisée par Andjelkovic et al. (2006) a montré que le pouvoir chélateur du  $\text{Fe}^{2+}$  par les acides phénoliques dépend de la nature et la structure des différents composés testés, avec une activité très importante exhibée par les acides phénoliques à groupements catéchols et moins efficace avec ceux présentant le groupement galloyls. Tandis que l'acide férulique, l'acide syringique et l'acide vanillique (composés dépourvus des groupements catéchols et galloyls) n'ont démontré aucun effet chélateur de fer.

D'autre part, cette étude de corrélation nous a permis de constater qu'il ya une corrélation positive entre la teneur en tannins condensés des extraits de feuilles d'*Inula viscosa* et l'activité chélatrice du fer ( $r= 0,45$ ) (Annexe N°8). Ce résultat est en accord avec ceux d'une étude menée par Karamac (2009) sur les extraits de noix qui présente une activité chélatrice du fer grâce à leur richesse en tannins condensés.

Tous ces résultats rejoignent ceux obtenus par plusieurs auteurs, qui indiquent que la structure des polyphénols est le facteur clé de leur pouvoir chélateur (Pietta, 2000), Andjelkovic et *al.*, 2006).

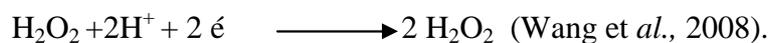
### II-3-2- Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés, plus stable que le radical superoxyde, mais c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile et peu réactive en milieux aqueux et la majeure part de sa toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle ( $\text{HO}\cdot$ ).

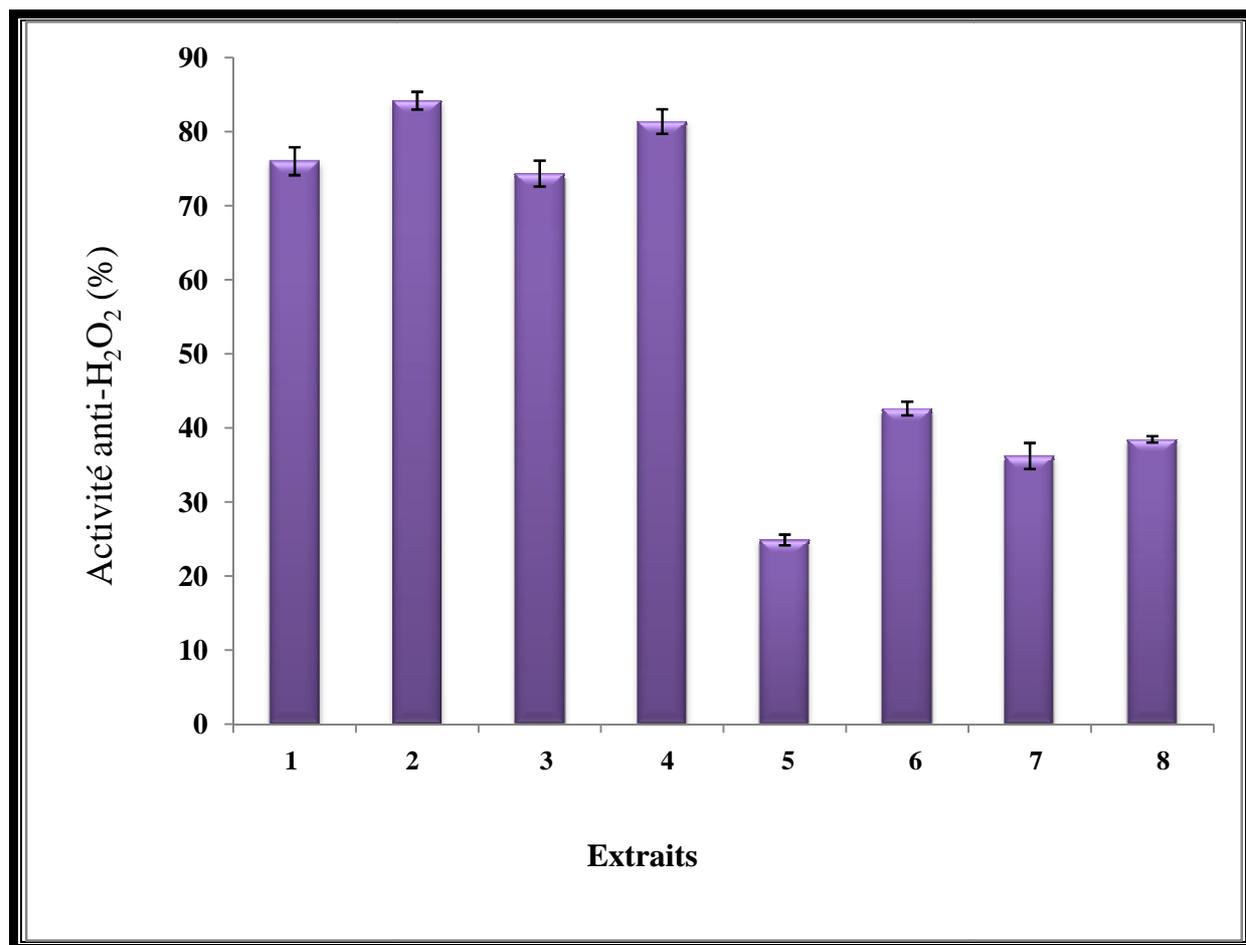
En effet, le peroxyde d'hydrogène en présence des ions ferriques ( $\text{Fe}^{2+}$ ) donne le radical hydroxyle par la réaction de Fenton ou bien par la réaction de Haber-Weiss (De Leiris, 2003 ; Vamecq et *al.*, 2004 ; Edreva et *al.*, 2005).



Le test  $\text{H}_2\text{O}_2$  choisi pour cette étude, est basé sur le piégeage du radical libre stable  $\text{H}_2\text{O}_2$  par une molécule anti-radicalaire, ce qui entraîne sa décomposition en molécule d'eau (Rajeshwar et *al.*, 2005 ; Wang et *al.*, 2008) selon la réaction suivante :



A la première lecture des résultats illustrés dans la figure (N°26) et contrairement aux effets des deux premiers tests anti-oxydants réalisés, discutés précédemment, nous remarquons qu'il n'y a pas une grande diversification dans les valeurs obtenues pour l'effet anti-  $\text{H}_2\text{O}_2$  des divers extraits. Ainsi, tous les extraits (organiques, aqueux, polaires et apolaires) ont exhibé des effets svacengers importants contre le  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $1\mu\text{g/ml}$ , avec une moyenne d'inhibition de 65%, alors qu'elle n'est que de 38,47% pour  $\alpha$ -tocophérol. Le taux le plus élevé est enregistré au niveau de l'extrait d'acétate d'éthyle (84.19%), ce qui pourrait être attribuée à sa richesse en composés phénoliques, suivi par les extraits chloroforme, éthanolique et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui ne présentent pas d'ailleurs de différence significative ( $P < 0,05$ ) avec une moyenne d'inhibition de 77,24%. Le plus faible taux est obtenu par l'extrait aqueux de chloroforme (26.86%). Par ailleurs, il existe une très bonne corrélation entre l'activité anti- $\text{H}_2\text{O}_2$  et la teneur en composés phénoliques dont les coefficients de corrélation varient de 0,46 à 0,80 .Ce résultat peut être expliqué par deux suggestions ; soit les molécules responsables de l'activité anti-  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont communes et donc présentes dans tous les extraits ou bien l'effet scavenger de cette espèce réactive n'est pas amplement lié à la structure moléculaire des composés phénoliques, donc elle peut être neutraliser par différentes classes de composés (polaire et apolaires) pourvu que ces derniers soit de bons donneurs d'électrons pour accélérer la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau.



**Figure N°26 :** Effet scavenger contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des extraits des feuilles d'*I.viscosa* et une molécule de référence à 1µg/ml. **1** : Ethanol ; **2** : Acétate d'éthyle ; **3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **4** : Chloroforme ; **5** : Aqueux du chloroforme ; **6** : Hexane ; **7** : Aqueux d'hexane ; **8** : α-tocophérol.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

Nos résultats témoignent un bon effet scavenger de l'extrait éthanolique, vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène comparativement au résultat obtenu par Wang et ses collègues (2007), sur l'extrait éthanolique de l'arachide (légumineuse), où le pourcentage d'inhibition est de 89,1% mais à la concentration de 500 µg/ml.

La faible activité scavenging de la molécule de référence par rapport aux certains extraits testés peut être expliquée par la pureté de cette molécule mais aussi par la présence d'un effet synergique entre la gamme de composés existants dans les extraits (Shukla et al., 2009). Les interactions synergiques entre les antioxydants dans le mélange font de l'activité antioxydant non seulement dépendante de la concentration, mais également de la structure et la nature de ces derniers ( Djeridane et al., 2006 ; Fellah et al., 2008).



## *Conclusion*

## **Conclusion et perspectives**

Dans le but de rechercher de nouveaux composés antioxydants naturels à intérêt thérapeutique, les extraits d'une plante médicinale, *Inula viscosa*, ont fait l'objet d'une étude détaillée, commençant par l'extraction et le dosage des composés phénoliques, l'évaluation de leur effet anti-radicalaire contre le DPPH et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enfin, l'étude de l'activité chélatrice de fer.

Le procédé d'extraction que nous avons employé a permis de retenir 7 extraits à partir des feuilles d' *I.viscosa*, où il a permis d'obtenir un rendement d'extraction avec l'extrait chloroforme organique relativement élevé (70,45%). Les résultats d'évaluation des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes montrent que ces extraits en sont riches selon leur solubilité dans les solvants utilisés lors de leur extraction. L'analyse de ces résultats révèle que les extraits polaires des feuilles de *I.viscosa*, dont les extraits les extraits d'acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme, sont marqués par les teneurs les plus élevées en phénols totaux, tandis que les extraits apolaires, en sont les plus pauvres. Les résultats des teneurs des extraits en flavonoïdes confirment que les feuilles d'*I.viscosa* sont une source importante en ces composés, notamment l'extrait de chloroforme qui renferme la teneur la plus élevée, 180,69 mg eq rutine /g d'extrait, suivi par les deux extraits éthanolique et acétate d'éthyle qui renferment les teneurs de 115, 60 et 150,50 mg eq rutine / g d'extrait, respectivement. Quant aux tannins condensés, les résultats de dosage varient des teneurs les plus élevées pour l'extrait chloroforme avec un taux de 37,84 mg eq cyanidine / 100 g d'extrait jusqu'aux teneurs les plus faibles enregistrées dans les extraits aqueux qui enregistrent des teneurs inférieures à 7 mg eq cyanidine / 100 g d'extrait.

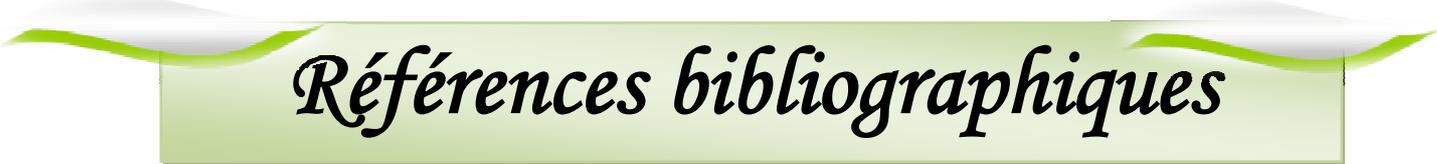
L'estimation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits de feuilles à une concentration de 1µg/ml, a prouvé que l'effet de l'extrait éthanolique présente une meilleure activité avec un taux de 92,45%, une valeur supérieure même à celui de standard (acide ascorbique).

L'évaluation de l'activité antioxydante par la chélation de fer, à la concentration de 1µg/ml a prouvé que la plupart des extraits affichent des taux d'inhibition, allant de 20% à 52%, hautement supérieure à celle de molécule de référence EDTA.

Les résultats du test anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indiquent que tous les extraits exhibent une haute activité au voisinage de 70% à une concentration de 1µg/ml. L'extrait d'acétate d'éthyle, a exprimé l'effet scavenger le plus important contre ce radical avec un taux de 84.19%.

Nous concluons à partir de cette étude que les extraits de plante d'*I.viscosa* constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité antioxydante, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies à caractère inflammatoire. Cependant, malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur cette plante s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, il serait intéressant à l'avenir :

- ❖ De déterminer les concentrations minimales d'inhibitions (IC<sub>50</sub>) de différents extraits.
- ❖ D'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* par d'autres tests complémentaires tels que l'activité scavenging de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle.
- ❖ D'étudier d'autres propriétés biologiques, à savoir les propriétés antifongiques, anti-inflammatoires, anti-virales et autres.
- ❖ De procéder à une séparation par des méthodes plus avancées telles que l'HPLC, la GC-MS et la RMN, afin d'identifier les composés responsables des activités antioxydantes.



*Références bibliographiques*

**Références bibliographiques**

**Afonso ; Champy, Mitrovic, D ; Collin, P.and Lomri, A.** (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rovue du rhumatisme* ,74 :636-643.

**Ali Shtayeh, M.S., Yaniv, Z. and Mahajna, J.** (2000). Ethnobotanical syrvey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 73: 221-232.

**Amic, D., Davidonic-Amic, D., Beslo, D. and Trinajstic, N.** (2003). Structure Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*.76 (1):55-61.

**Andrian, J., Potus, J. and Frague, R.** (2003). La science alimentaire de A à Z 3<sup>ème</sup> édition, Technique et Documentation. Paris. 259.

**Aron P. M.,** (2007). Composition of Flavonoid Phenolic Polymers Isolated from red wine during maceration and significance of flavan-3-ols in foods pertaining to biological activity. These masters. *Oregon State University*, 194 p.

**Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S et Khebri, S.** (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1) :69-79.

**Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N. and Atmani, D.** (2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food chemistry*. 112: 303-309

**Baba aissa, F.** (1991). Les plantes médecinales en Algerie. Coédition bouchéne et Ad. Diwan.111-159.

**Baba aissa, F.** (2000). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed : Librairie moderne Rouïba. 252-253.

**Balasundram, N.; Sundram, K and Sammam, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products, antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99: 191-203.

- Balasundram, N., Uyttendaele, M. and Debevere, J.** (2007). Antioxydant proprieties of palm fruits extracts. *ASIA Pac J Clin Nutr* ; 4(4) : 319-324.
- Barouki, R.** (2006). Stress oxydant et vieillissement. Article : *M/S : médecine science*, 22 :266-272.
- Beaudeau, J.L., Dellattre, J., Therond, P., Bonnefond-Rousslot, D., Legrand, A. and Peyner, J.** (2006). Le stress oxydant, composante Physiopathologique de l'athérosclérose. Oxidative stress in the atherosclerotic Process. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 21: 144-150.
- Bennick, A.** (2002). Interaction of plants polyphénols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13 (2), p. 184-196
- Berard, E** (1997). Métabolisme et regulation des monoxydes d'azote : un médiateur de contrôle difficile, 4 : 1004-1011.
- Berger, M.M.** (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20:48-53.
- Bhur, A.B. and Stuessy, T.F.** (2001). Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae). Springer verlg Wien Australia. 17-23.
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudeau, J.L., Théroud, P., Legrand, A.B. and Delattre, J.** (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16 : 260-267.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*. 28 : 97- 107.
- Bruneton, J.,** (1999). Composés phénoliques. *In Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. (3<sup>ème</sup> édition), Technique et Documentation Lavoisier. Paris : 228-387.
- Bruce, A and Tod, F.S.** (2001). Flavonoids of the sun flower family (Asteraceae). Springer Wien, New York Edition.
- Bssaibis, F., Gmira, N., Meziane, M.,** (2009). Activité anti-bactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Microbiol. Ind. San et Environn*. 3 (1) : 44- 55.

**Bossokpi, I.P.L.** (2003). Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (Rutaceae). *Thèse doctorat, université de Bamako*, p : 8-10.

**Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H.** (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74 : 2157- 2184.

**Catalan J.** (2007). Sintesis de terpenoides bioactivos usando sintones terpènicosy ciclaciones mediadas por Ti(III). Thèse de doctorat. Universidad de Granada. p 13.

**Chen, J-W., Zhu, Z-Q., Hu, T-X et Zhu, D-Y.** (2002). Structure-activity relationship of natural Flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol.* 23(7): 667- 672.

**Cheyrier, V.** (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 223-229.

**Chiang, H.S., Juilo, Y., and Lu, F.J.,** (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila Spinolosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, 8(1): 61-71.

**Choi, Y-J., Kang, J-S., Park, J-H., Lee, Y-J., Choi, J-S. et Kang, Y-H.** (2002). Polyphénolic Flavonoids Differ in Their Antiapoptotic Efficacy in Hydrogen Peroxide-Treated Human Vascular Endothelial cells. *Food and Nutrition*. 133: 985- 991.

**Chung, Y., Chein, C., Teng, K., and Chou, T.** (2006). Antioxidant and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Food Chemistry*. 97: 418- 425.

**Cillard, J and Cillard, P.** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 13(1): 24-9.

**Contini, C., Seraceni, S., Castellazzi, M., Granieri, E., Fainardi, E.** (2008). *Chlamydophila pneumonia* DNA and mRNA transcript levels in periphèrol blood mononuclear celles and cerebrospinal fruid of patiets with multiple sclerosis, *Neuroscience Research*, 62: 58- 61.

**Danino, O., Gottlieb, H. E., Grossman, S., and Bergman, M.** (2009). Antioxidant activity of 1, 3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*, 42: 1273-1280.

**Davis, B. D., Bobelt, J. S.** (2004). Determination of the Glycosylation Site of flavonoid Monoglucosides by Metal Complexation and Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 15: 1287- 1299.

**De Leiris, J.** (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism.* 19:40-44.

**Delemasure, S.; Vergely, C.; Zeller, M.; Cottin, M. and Rochette, L.** (2006). Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de Cardiologie et d'Angéologie*, **55** : 104-112.

**Demichel, N.** (2010). [http :// www. Plumart. Com/ vf 1300 / htm / body 6163 pice/ html.](http://www.Plumart.Com/vf/1300/htm/body/6163/pice/html)  
Page consultée.

**Demoffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J. and Lekeux, P.** (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animal. Médecine. Vétérinaire.* 149 : 1-9.

**Desport, J.C and Courtier, P.H.** (2002). Nutrition et stress oxydant : Stress oxydant et maladies neurodégénératives, *édition scientifiques et médicales Elsevier SAS*, 16: 253-259.

**De-Rijike, E.; Out, P.; Nissen, W. M. A. Ariese, F. Gooijer, C. and Brinkman, U. A. T. b.** (2006). Analytical separation and detection methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112a: 31- 63.

**Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida MLM.** (1994). Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N.** (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry.* 97: 645- 660.

**Dutta, D., Chaudhur, U.R. and Chakiaborty, R.** (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of caroténoïde. *African Journal of Biotechnology.* 4 (13):1510-1520.

**Edreva, A.** (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 119-133.

**Elmastase, M., Gulçin, I., Isildaka, O., Kufrevioglu, O.I., Ibaoglu, K. and Aboul-Enein, H.Y.** (2006). Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 3:258-266.

**Erkan, N., Ayranci, G., and Ayranci, E.** (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 110: 76- 82.

**Escibano-Bailon, M.T and Santos-Buelga, C.** (2003). Polyphenol extraction from foods. *Journal of: Royal society of chemistry*, 1-16.

**Falleh H.,Ksouri R., Chaieb K.,Karray-Bouraoui N.,Trabelsi N., Boulaaba M.et Abdely C.**(2008).phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and thier biological activities .*Comptes Rendus Biologies*. **331** :372-379.

**Favier, A.** (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimentale dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutiques. *L'actualité chimique*. 108-115.

**Fiorucci S.,** 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. These de doctorat. University Nice-Sophia Antipolis, 212 p.

**Fleuriet A, Jay- Allemand C, Macheix J.J** (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires + d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*. P : 121-216.

**Fukagawa, N.K** (1999) Aging Is Oxidative Stress a Marker or Is It Causal, *by the Society for Experimental Biology and medicine*. 222: 293-296.

**Garait, B.** (2006).Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin. Thèse doctorat, université Joseph Fourier : 22-23.

**Gardés-Albert, M.** (2006). Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 : 365-372.

**Gayou, R** (1968). Notions générales sur les composés phénoliques : Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod.

- Ghedira, K.** (2005). Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04: 162-169.
- Gaudab, J. and Favier, A.** (1997). Radicaux libres oxygènes et antioxydants, *Laboratoire biochimie, Hopital Edouard-Herriot, Lyon*, 11: 115-120.
- Grande, M., Piera, F., Cuenca, P. and Bellido. I.S.** (1985). *Planta Med.* 51:414.
- Grossman, S., Rozenblat, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y., Dovrat, S.** (2008). Induction of G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical pharmacology* 75: 369-382.
- Guignard, J.L.** (1996). Composés phénoliques, biochimie végétale. *Édition Masson Paris* : 174-214.
- Guignard, J.L.** (2001). Botanique, Systématique moléculaire. Ed. MASSON, Paris. 100-272.
- Gutteridge, J, M, C.** (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12): 1819-1828.
- Halliwel, B.,** (1996). Antioxidants' in human health and disease. *Annu. Res. Nutr.*, 16: 33-50.
- Halliwel, B., Clement, M.V. and Long, L.H.** (2002). Hydrogène peroxide in the human body. Federation of European Biochemical Societies. 486:10-13.
- Halliwel, B., Clément, M. V. and Long, L. H.** (2000). Hydrogen peroxide in the human body. Fédération of European Biochemical Societies. 486 : 10- 13.
- Handique, J.G & Baruah.** (2002). Phenolic compounds: an overview. 52: 163-188.
- Harrison, D., Kathy, K. G., Hornig, B., Drexler, H.** (2002). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 91: 7A- 11A.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J.** (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Helme, J.P., Ghazan, J.B. and Perrin, J.L.** (2004). Actifs et additifs en cosmétologie. Les antioxydants. Editions Tec & Doc. Chapitre 18: 337-352.

**Hernandez, V., Recio, M.C., Mânez, S., Prieto, J.M., Giner, R.M., and Rios, J.L.** (2001). Mechanistic Approach to the In Vivo Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. *Planta Med.* 67:726-731.

**Hernandez, V., Recio, C.M., Mânez, S., Giner, R.S and Rios, J.L.** (2007). Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences.* 81 : 480-488.

**Houée-Levin, C., Sicard-Roselli, C & Bergés.J.** (2005). chimie et biochimie radicalaires. Edition Belin.

**Huet, O., Duranteau, J.** (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *actuel in press* : 1-6.

**Huang, D.J., Lin, C.D., Chen, H.J. and Lin, Y.H.** (2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas*) Lam 'Tamong 57' constituents. *Botanical Bulletin of Académie. Sinica.* 45: 175-186.

**Javanmardi, J., Stushnoff, C., Loke, E. and Vivanco, J.M.** (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry.* 83:547-550.

**Jerer M., M. Pinelo, J. Sineiro et M. J. Nunez.** (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry.* 94: 406-414.

**Josse, E.M.** (2003). Caractérisation d'une oxydase terminale plastidiale impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes et dans la réponse au stress. *Thèse de doctorat.* Université Joseph Fourier. 29-31.

**Jun, H-C., Han, H-N., Lee, K-H., Joo, S-H. and Oh, K-H.** (2005). Hot powder pressing- An analysis of the thermo-mechanical behavior of the roller. *Journal of Materials Processing Technology.* 170 : 317- 32.

**Kahkonen, M. P., Hopia, A.I., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., and Heinonen, M.** (1999). Antioxidant Activity of plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Food Chemistry,* 47:3954-3962.

**Kaliora, G., Dedoussis, G.V.Z. and Schmidt, H.** (2006). Dietary antioxidant in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 187: 1- 17.

**Karamać.** (2009). Chelation of Cu (II), Zn (II), and Fe (II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. *International journal of molecular Sciences*. 10: 5485-5497.

**Karou, D., Dicko, M.H., Simporé, J., Yameogo, S., Sanon, S., and Traore, A. S.** (2005). Generation and scavenging of reactive species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems' and Environnement*. 106: 119- 133.

**Kirthan, P.; Rahman, I. (2006).** Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*.

**Kivcak, B. and Akay, S.** (2005). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacia lentiscus*. *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76: 62-66.

**Koechlin-Ramonatxo, N.** (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique ET metabolism*. 20: 165-177.

**Kordali, S., Cakir, A., Zenging, H and Duru, M.E.** (2003). Antifungal activities of leaves of three pistacia species grown in turkey. *Journal of fitoterapia*, 74:164-167.

**Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., and Houlst, J. R.** (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol*. 38(17): 2859- 65.

**Lee, J., Koo, N. and min, D. B.** (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxydative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3: 21-33.

**Levisou, E., Karageorgou, P., Psaras, G.K and Manentas, Y.** (2000). Inhibitory effects of water-soluble leaf leachates from *Dittrichia viscosa* on lettuce root growth, statocyte development and graviperception. *Flora*. 197: 152-157.

**Lim, Y.Y. and Murtijaya. J.** (2007). . Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods . *LWT - Food Science and Technology* : 40(9): 1664- 1669.

**Lin, C., Chen, C.S., Che, C.T., Liang, Y.C. & Lin, J.K** (2002).Molecular modeling of flavanoide that inhibition xanthine oxydase. *Biochemical and biophysical Research Communication*.294:167-172.

**Liu, H., Qiu, N., Ding, H et Yao R.** (2008). Polyphénols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*. 6: 123-155.

**Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V et Biro, L.** (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta biologica Szegediensis*. 47 (4) : 119-125.

**Macheix, J. J., Fleuriet, A., et Jay-Allemande, C. H.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes* : 1-31.

**Maksimovie, Z., Malencié, N.D., and Kovacevié, N.** (2004). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8): 873-877.

**Mamary, M., Al-Meerri, A. and Al-haboui, M.** (2002). Antioxydant activities and total phénolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041-1047.

**Manez, S., Recio, M.C., Gil, I., Gomes, C., Giner, R.M., Waterman, P.G and Rios J.L.** (1999). Aglycosyl Analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*.62 (4): 601-604.

**Manez, S., Hernandez, V., Giner, R.M., Rios, J.L. and Recio, M. C.** (2007). Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*, 78: 329- 331.

**Maoz, M. and Neeman, I.** (2000). Effects of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dematophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 479-482.

**Maoz, M., Kashman, Y. and Neeman, I** (1999). Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Planta Med*. 65: 281-282.

**Marc, F., Brisbarre, F., Davin, A., Baccaunaud, M. and Ferrand, C.** (2004). Evaluation du pouvoir antioxydant (TEAC) d'extraits de végétaux en vue d'utilisation alimentaires. *An international journal of food science and technology*. 24(5) :399-414.

**Marfak, A.** (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de Depsides. Thèse doctorale : 1-220

**Martin, S. and Andriantsitohaina, R.** (2002). Article original, mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des poly phenols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51 : 304-315

**Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; and Giovannini. C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577-586.

**Mattie, M. D.; and Freedman, J. H.** (2004). Copper-inducible transcription: regulation by metal and oxidative stress responsive pathways. *The American Physiological Society*, 286: 293-301.

**Max, F.** (1996). Validation des methods d'analyses, Edition Masson.

**Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*. vol.4, N°52, p. 673-751.

**Moffarts, B; Kirshvink, N; Pincemail, J., and Lekeux, P.** (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Mèd. Vêt.* 149: 1-9.

**Moldovan, L., Mythreye, K, Goldschmidt-Clermont, P.J; Sattzrwhite, L.L.** (2006). Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD (P) H oxidase and Rac 1. *European Society of Cardiology*, 71: 236-246.

**Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P and Cillard, J.** (1994). Role of Flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods in enzymology*. 234: 437- 443.

**Morello J. R., Romero M.P., Ramo T., Motilva M.J** (2005). Evaluation of L-phénylalanine ammonia-lyase activity and phénolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant science*. 168: 65-72.

**Naczk, M.; and Shahidi, F.** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.

**Nafia, D.B.R., Nieoullon, A., Kerkerian, L et Had-Hissouni, L.** (2005). Stress oxydative cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate, Implications sur la survie neurale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24 : 502-509.

**Nagao, A., Seki, M. and Kobayershi, H.** (2002). Inhibition of xanthine oxydase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 63(10) : 1787- 1790.

**Naithani, V., Nair, S., Kakkar, P.,** (2006). Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content, *Food Research International*, 39: 176\_181.

**Narayana, K. R.; Reddy, M. R.; Chaluvadi, M.R.; and Krishna, D.R.** (2001). Bioflavonoid classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.

**Okuda, T.** (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal Plants. *Phytochemistry*, 66: 2012-203.

**Ouarkoub, B., Allafek, K et Hamdi, A.** (2008).Séchage de l'origine par DIC S. *Revue des Energies Renouvelables*. 08: 97-104.

**Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H. and Jiang, Y.** (2009). Flavonoids contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. P.1-25.

**Perret C.,** (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat .Université de Neuchâtel, 184 p.

**Phillis, J. W.** (1994). Aradical View of cerebral ischemic injury. *Progress in Neurobiology*, 42 : 441- 448.

**Pietta, P.G.** (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*. 63 : 1035-1042.

**Pincemail, J., Bonean, K., Cayeux, K., and Defraigne, J.O.** (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, Physiological action of antioxydant défenses. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233- 239.

**Pincemail, J., Defraigne J.O. and Limet, R.** (2001). Vitamines, acides gras et prevention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphere*. 130.

**Pincemail, J., Defraigne J.O. and Limet, R.** (1998). Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère*. 130.

**PoKorny, J.** (2001). Antioxidants and food stability. In "Antioxidants in food, Practical applications". Ed. Woodhead Publishing LTD: 7- 20.

**Rahman, I., Biswas, S.k. and Kode, A.** (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airways diseases. *European Journal of Pharmacology*. 533: 222- 239.

**Rajeshwar, Y., Senthil Kumar, G. P., Guta, M. and Mazumder, U. K.** (2005). Études on in vitro antioxidant activities of méthanol extracts of *Mucuna pruriens* (FABACEAE) seeds. *Euraopean Bulletin if Drug Research*. 13 (1) : 31- 39.

**Ré, D.B., Nafia,I., Nieoullon,A., Kerkerian Le Goff, L.& Had-Aissouni, L.**(2005).Stress oxydatif cérébral : les astrocyte sont-ils vulnérarable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate , Implication sur la survie neuronale. *Annales françaises d'Anesthésie et de réanimation*.24 :502-509.

**Ribereau-Gayon, J. ; Emile, P. ; pierre, S et sudrand, P.** (1982). Analyse et control des vins. Edition Dunod : 477-519.

**Ribereau-Gayon, P.** (1968). Notions generals sur les composés phénoliques. In : les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*. p : 1-27.

**Robard, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.** (1999). Phénolic compouds and their rol in oxidative processes in fruits. *Food Chemistr*, 66 : 401-436.

**Robertet, S.A.** (2000). Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (I.) w. greuter. *Rivista Italiana Ventinovesimo numer-Giugno. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 : 1327- 1332.

**Rochette, L.** (2008). Stress oxydant et species. *Réanimation*. 3 : 1-4.

**Rolland, Y.** (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*. 11 :419-424.

**Roussel, A.M et Ferry, M.** (2002). Stress oxydant et vieillissement oxydative stress, nutrition and aging. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 285-291.

- Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gettlieb, H., Cohen, Y. and Dovrat, S.** (2008). Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical pharmacology* .75:369-382.
- Servais, S.** (2004). Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en repense a l'ozone : Effect de l'âge et d'une supplémentaire en Omega-3. Thèse doctorat, université Claude Bernard-Lyon. 12-14.
- Shyu, Y. S., Lin, J. T., Chang, Y. T., Chiang, C.J. and Yang, D.J.** (2009). Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) *flower*. *Food Chemistry*. 115:515-521.
- Simirgiotis, M.J. Caligari, P.D.S. and Schmeda-Hirschmann, G.** (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. *Food Chemistry*.115:775-784.
- Simon C.** (2003). Structure et dynamique de proteins de la salive humaine en Interaction avec les tanins du vin de bordeaux. Thèse de doctorat : Bordeaux : *l'université Bordeaux 1-école doctorale des sciences chimiques*. p 219.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma. O. I et Bahorn, T.** (2005). Phenolics as potentials antioxidant therapeutic agent: Mechanism and action. *Mutation Research*. 579: 200-213.
- Stadtman, R.** (1992). Protein oxidation and ageing. *Sciences* 257 (5074): 1220-4.
- Stahl, W. and Sies, H.** (2004). Bioactivity and protective effect of natural caroténoides. *Biochimia et biophysica. Acta*. 1740: 101-107.
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G.** (2006). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*. 56: 293-300.
- Tanguy, M., Beguè-Simon, A-M.** (2009). Antioxydants, unite de nutrition, CHU Pontchaillon Rennes, Département de santé publique. 257- 260.

- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zang, G., Chen, Y. and Luo, Y.** (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactives. *Food Chemistry*. 113: 173-179.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikurkcu, C., Ozturk, M. and Ulubelen, A.** (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103: 816- 822.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160: 12-13.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-48
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P. and Bordet, R.** (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La lettre du Pharmacologue*.18(1) : 16-23.
- Velázquez, L. Durán, E., Ramírez, I., Mas, J-F., Bocco, G., Ramírez, C.**(2003). Land use-cover change processes in highly biodiverse areas: the case of Oaxaca, Mexico Original Research Article *Global Environmental Change*, 13(3):175- 184.
- Vercautren, J, Cheze C, Triaud J.** (1698). *Plyphénols 96*, Inra édition, paris : p31.
- Vermerris, V and Nicholson, R.** (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Chapter I: Families of phenolic compounds and means of classification Edition Springer, 1-32.
- Wang, W., ben-Daniel, B.H. and Cohen, Y.** (2004). Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*. *The American Physiological Society*. 94 (10): 1042-1047.
- Wang, B. S., Li, B. S., and Zeng, Q. X.** (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food Chemistry*.107: 1198- 1204.
- Wei, T., Sun, H., Zhao, X., Hou, A., Zhao, Q and Xina, W.** (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, *Pistafolia A. Life Sciences*. 70: 1889- 1899.
- Wollenweber, E., Mayer, K., Roitman, J.N.** (1991). Exudate flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochem*, 30: 2445-2446.

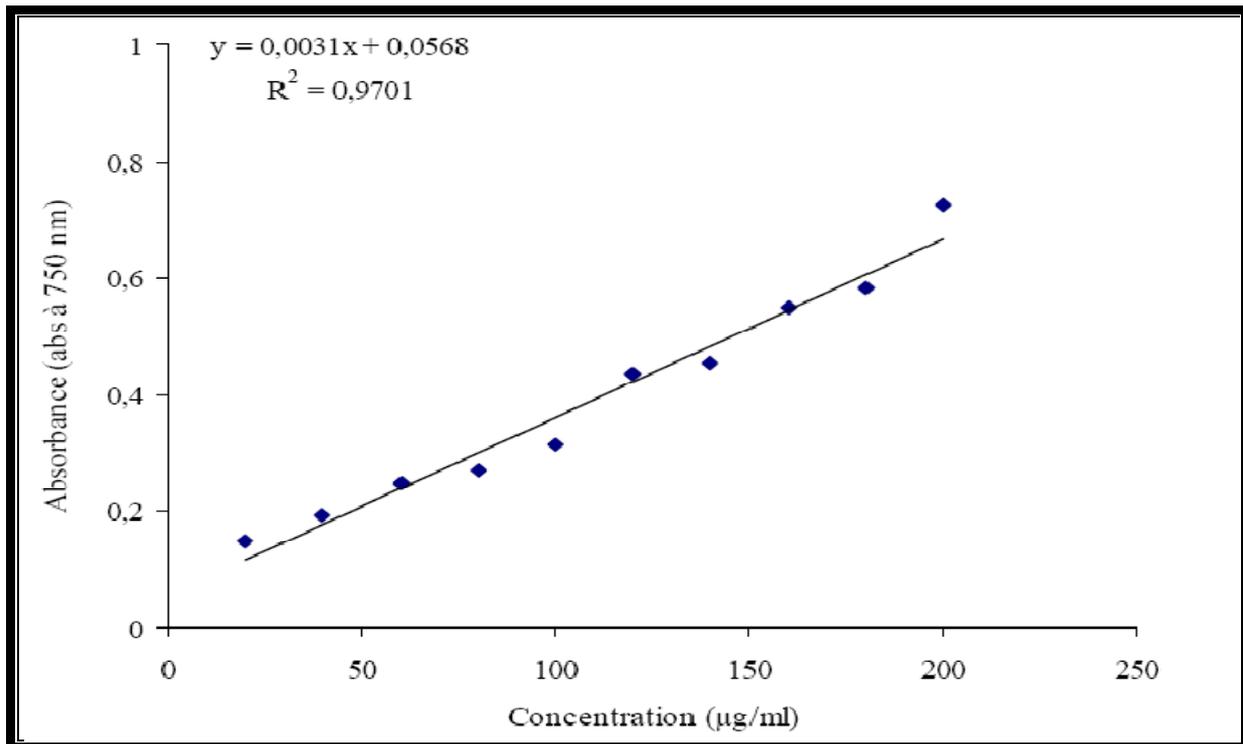
**Wong, S.P., Leong, L.P et William Koh, J.H.** (2006). Antioxydant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99:755-783.

**Wu, C-R., Huang, M-Y., Lin, Y-T., Ju, H-y. and Ching, H.** (2007). Antioxidant properties of Cortex fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*. 104: 1464- 1471.

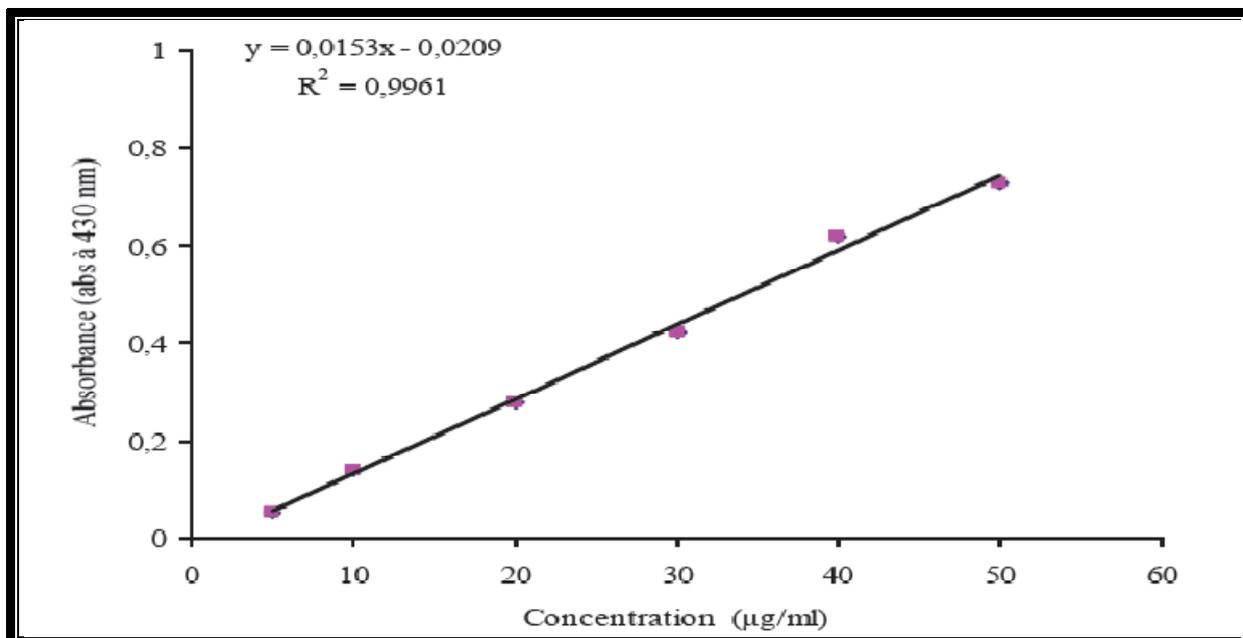
**Xiao, Z.P., D.H. Shi, H.Q. Li, L.N. Zhang, C. Xua et H.L. Zhua.** (2007). Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15:3703-3710.



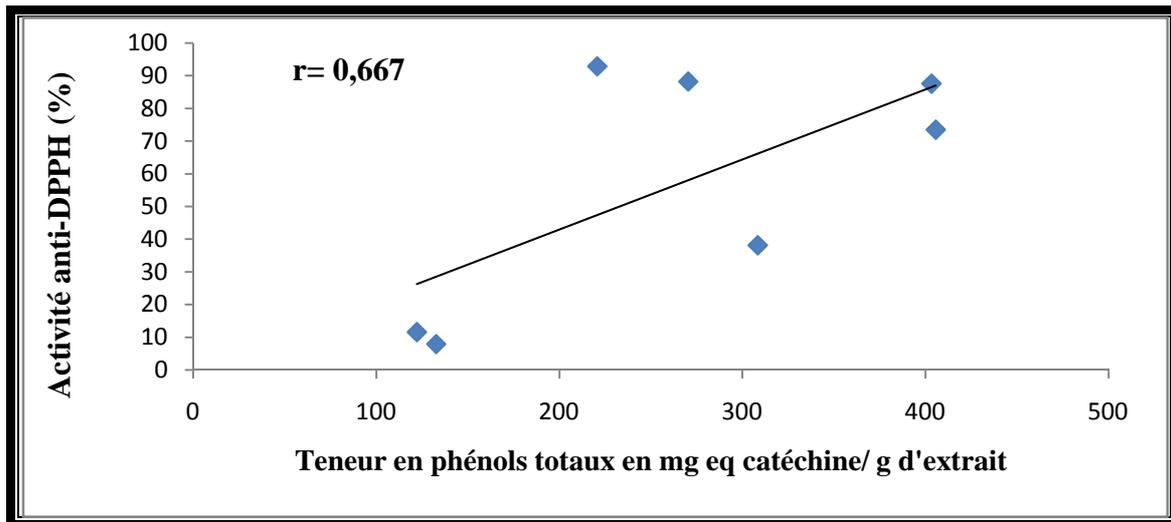
*Annexe*



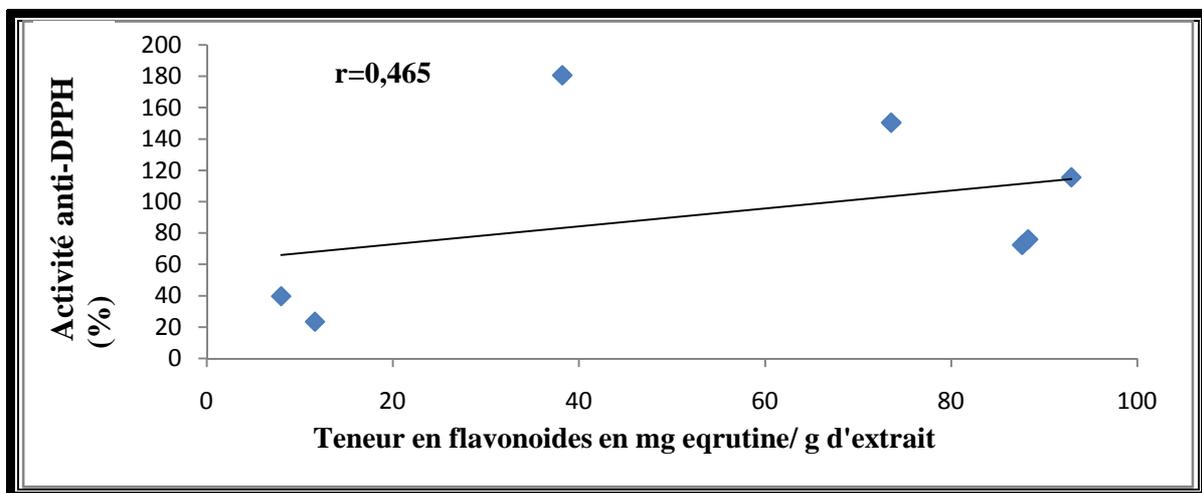
**Annexe N°1 :** Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux.



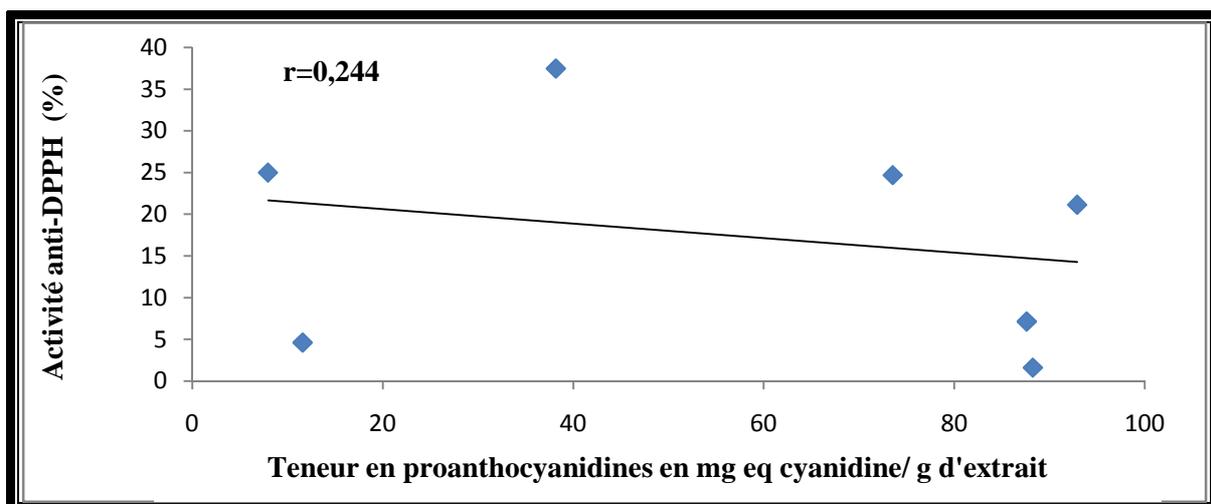
**Annexe N°2:** Courbe d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes.



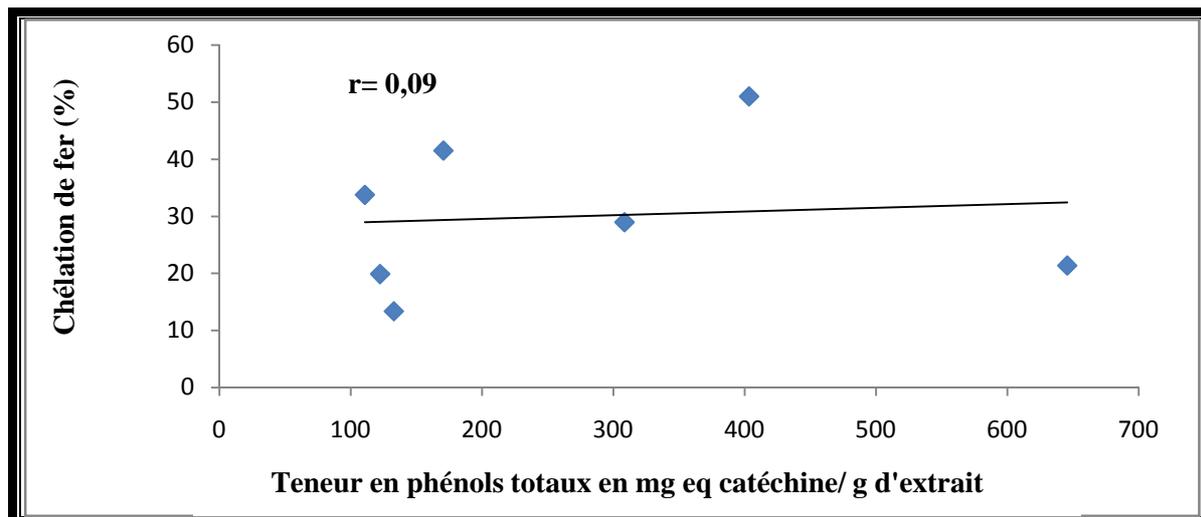
**Annexe N°3** : Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité anti-DPPH.



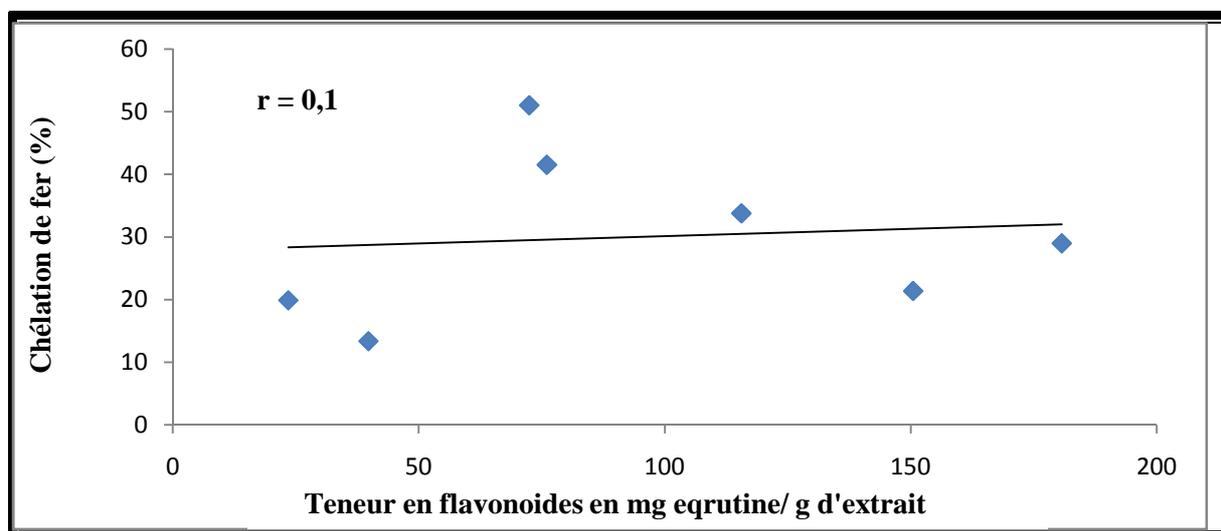
**Annexe N°4** : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité anti-DPPH.



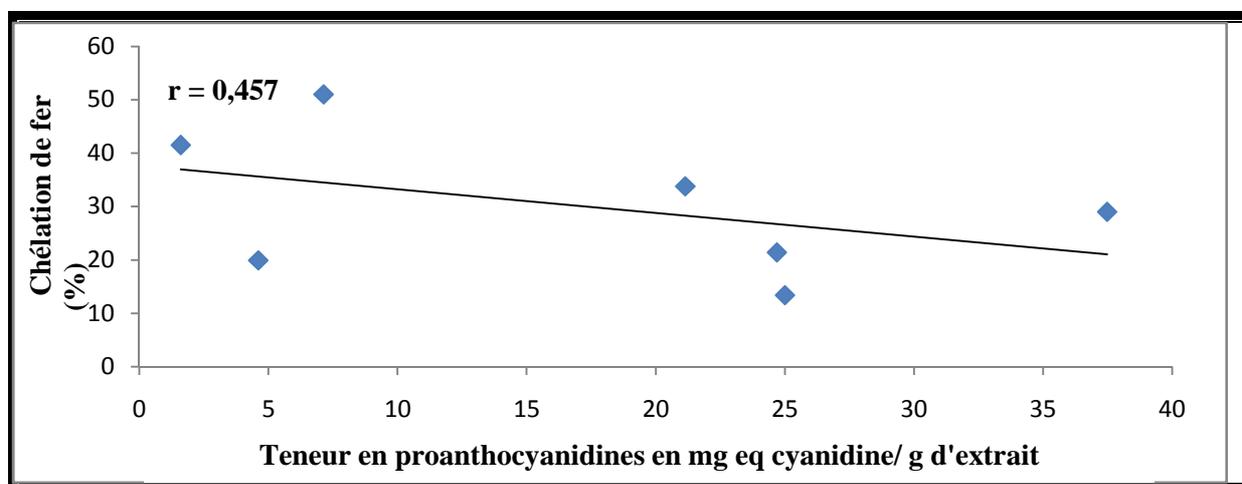
**Annexe N°5** : Corrélation entre les teneurs en proanthocyanidines et l'activité anti-DPPH.



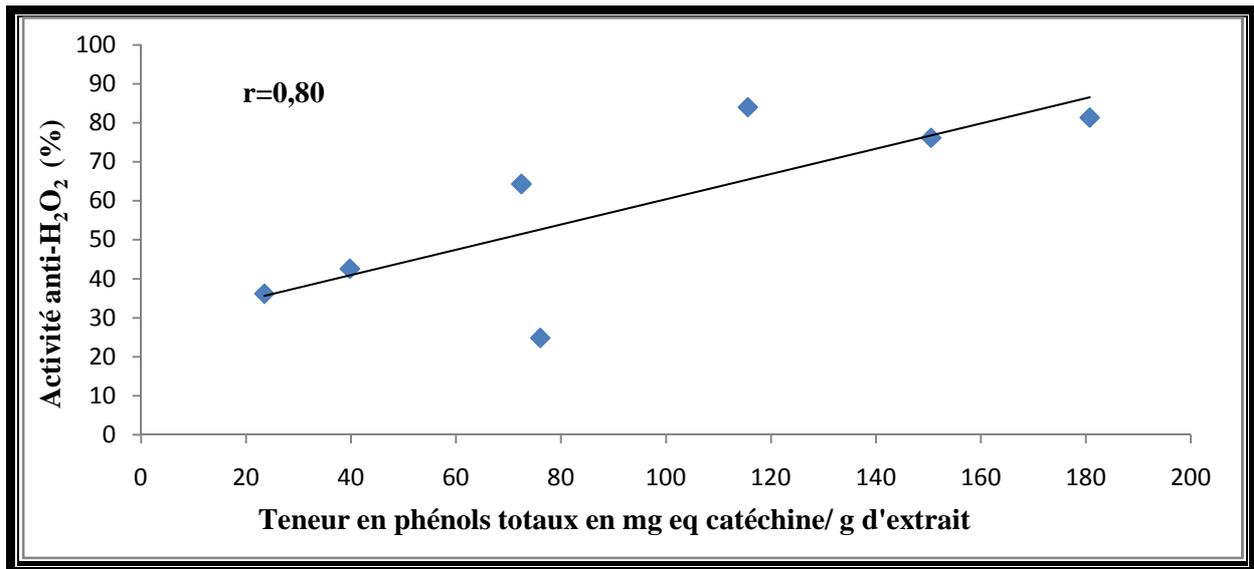
**Annexe N°6** : Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et la chélation de fer.



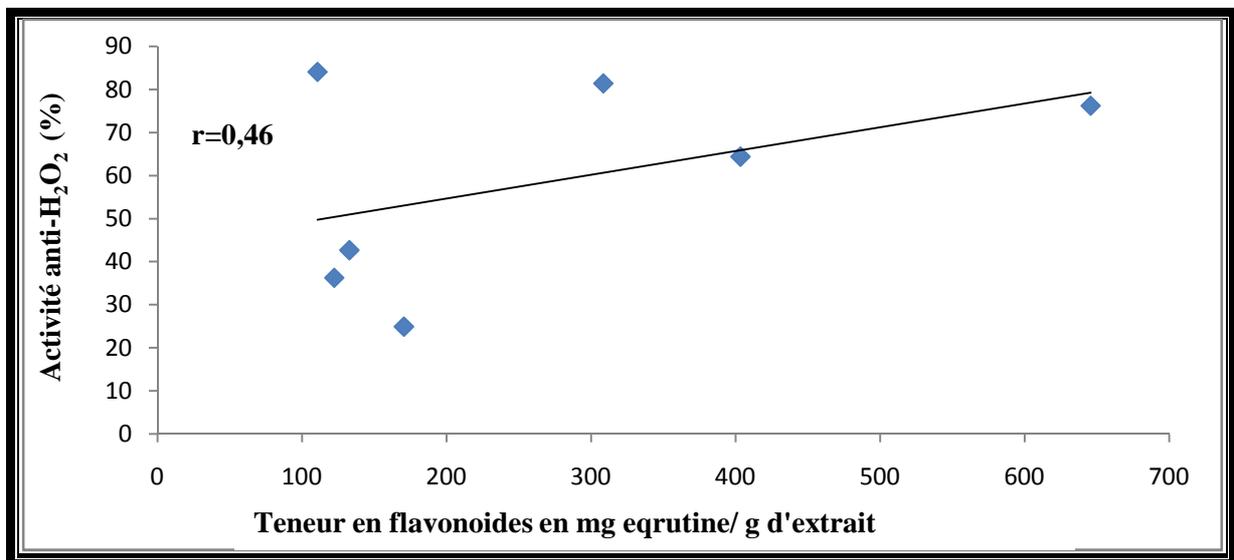
**Annexe N°7** : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et la chélation de fer.



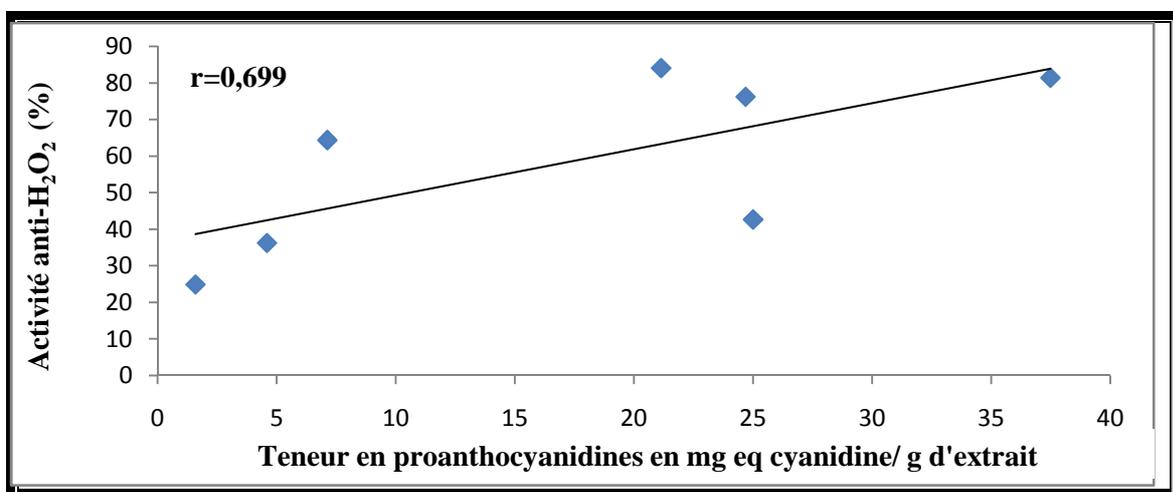
**Annexe N°8** : Corrélation entre les teneurs en proanthocyanidines et la chélation de fer.



**Annexe N°9** : Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Annexe N°10** : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Annexe N°11** : Corrélation entre les teneurs en proanthocyanidines et l'activité anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène qui est à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Inula viscosa*, et cela en faisant deux types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits de feuilles de la plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés), pour pouvoir faire une appréciation quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité antioxydante par trois méthodes complémentaires: piégeage du radical (DPPH•), chélation de fer et l'activité scavenger du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats expérimentaux ont montré que la plante a présenté des teneurs appréciables en composés phénoliques. Quant aux résultats de l'activité antioxydante, nous constatons qu'*Inula viscosa* a exhibé un pouvoir antioxydant très important. Ces constatations nous laissent penser à réaliser des études plus approfondies sur d'autres composés de cette plante.

**Mots clé :** *Inula viscosa*, activité antioxydant, DPPH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Chélation de fer, composés phénoliques.

## Abstract

The antioxidants play a fundamental role in the elimination of toxic excess reactive in species of the oxygen and at the origin of various degenerative diseases. Thus, the exploitation of the natural vegetable molecules would be very beneficial for the human health. Consequently, we was interested in the evaluation of the antioxidant activity of the phenolic compounds extracted starting from a local medicinal plant, *Inula viscosa*, and that by making two types of manipulations, of course, after getting, the various extracts of the leafs of the plant. Initially, we carried out the proportioning of the phenolic compounds (total phenols, flavonoïdes and condensed tannins), to be able to make a quantitative appreciation; then, we passed to the measurement of the antioxidant activity by three complementary methods: trapping of radical (DPPH•), iron chelation and the scavenger activity of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The experimental results showed that the plant presented appreciable contents of phenolics compounds. As for the results of the antioxidant activity, we note that *Inula viscosa* exhibé a very important antioxidant capacity. These noted let themselves think of making thorough studies on others composed of this plant.

**Keywords:** *Inula viscosa*, antioxidant activity, DPPH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iron Chelation, phenolic compounds.