

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Béjaia



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme Master en

Sciences biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et
anti-inflammatoire des extraits de plante :**

Inula viscosa L.

Présenté par :

M^{elle} BOUCHEBBAH Souhila

M^{elle} KARA Karima

Composition du jury :

M^{me} S. KARA

Maître Assistante A, A-Mira, Béjaia

Président

M^{me} N. KHEYAR

Maître Assistante A, A-Mira, Béjaia

Promoteur

M^r N. BELKACEM

Maître Assistant B, A-Mira, Béjaia

Examineur

Promotion : 2015 - 2016

Remerciements

✎ Louange à **ALLAH** de nous avoir guidé dans le bon chemin en l'implorant dans nos prières afin de nous donner non seulement le courage, la force et la patience de réaliser ce travail.

✎ Nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice **M^{me} KRAOUCHE** née **KHEYAR .N.** Merci pour votre encadrement et votre disponibilité. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous nous aviez témoignée pendant la réalisation de ce travail. Malgré vos importantes obligations, vous aviez toujours été présente pour nous recadrer dans la bonne direction et ceci a été fondamental dans la bonne réalisation de ce travail.
Soyez assurées de nous profonde gratitude.

✎ Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury : **M^{me} KARA. S.**, qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de président de jury.
M^r BELKACEM. N pour avoir accepté d'examiner ce travail.

✎ Nos remerciements les plus cordiaux à **M^{me} Arkoub. L.**, pour son aide et pour avoir accepté de suivre ce travail, Veuillez deviner ici le terme de nos honnêtes explorations.

✎ Nos remerciements vont aussi tout particulièrement à **M^{me} Nassima** technicienne du laboratoire de Chimie qui nous a permis de travailler dans le laboratoire sur la quelle elle est responsable.

✎ Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles et tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin par leurs recommandations et leurs renforts afin de finaliser ce travail.

Merci

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 :

✎ Pour toi ma chère maman, je suis à jamais reconnaissante pour tes multiples encouragements et marques de soutien tu as été présente à mes côtés tout au long de mon cursus universitaire. Je prie Dieu tout puissant de te prêter une longue vie et bonne santé.

✎ Une pensée à mon très cher papa, je prie Dieu tout puissant de le garder dans son vaste Paradis.

✎ A toute ma famille, mes sœurs Lynda et Sabiha, mes chers grands parents, tantes, oncles, cousines, cousins, et tout particulièrement à mon très cher Mohamed.

✎ A ma binôme Souhila que j'ai partagé ce 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.

Karima ✍

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

✿ À mes très chers parents, ma mère **Khadidja** et mon père **Khellaf** pour leurs confiances, leurs amours, leurs sacrifices et de m'avoir suscité ma vocation et permis d'achever mes études tant je suis actuellement.

✿ À mon très cher mari **Yacine** qui s'est montré très compréhensif, et m'a beaucoup encouragé et soutenue durant toutes les épisodes difficiles que j'ai connus pendant la réalisation de ce travail.

✿ À mon frère **Fatah** ainsi que à toutes mes sœurs.

✿ À ma binôme et amie **Karima**.

✿ À tous ceux qui m'ont aidés.

✿ À toute personne qui je connais.

Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.

Souhila 

Liste des abréviations

5-LPO : 5-Lipoxygénase.

AAPH :2,2' - Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride .

AGPI : Acides gras polyinsaturés.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

BFU-E: Burst-Forming Unit-Erythroid cells.

BHA: Hydroxyanisole butylé.

BHT: Hydroxytoluène butylé.

CAT: Catalase.

CFU-E: Colony-Forming Unit-Erythroid cells.

COX : Cyclo-oxygénase.

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène.

EAG: Equivalent acide gallique.

EAA : Equivalent Acide Ascorbique.

EC: Equivalent catéchine.

EC₅₀: Concentration équivalente à 50 % d'inhibition du radical.

EQ: Equivalent quercétine.

GSH: Glutathion.

GSSG : Glutathion oxydé.

GPx: Glutathione peroxydase.

Hb : Hémoglobine.

IgG : Immunoglobuline G.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HOCl : Acide hypochloreux.

LOX : Lipoxygénase.

nm : nanomètre.

NO[•] : Oxyde nitrique.

NOS : Oxyde nitrique synthase.

NSAIDs: Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs.

O^{•-}₂ : Anions superoxyde.

•OH : Radical hydroxyle.

PGs : Prostaglandines.

PLA2: Phospholipase A2.

Pm : Picomètre.

R[°] : Radical libre.

RBC: Membrane des globules rouges.

RNS : Espèces réactives de l'azote.

ROO[•] : Radical de peroxyde.

ROS : Espèces réactifs de l'oxygène

SOD : Superoxide dismutase

TAC: Capacité antioxydante total.

Trolox: Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylique.

Liste des FIGURES

Figure	Titre	Page
1	La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	3
2	Neutralisation des radicaux libres par le système antioxydant	5
3	Les différentes causes de l'inflammation et ses effets physiopathologiques	6
4	Mécanisme d'action proposé de flavonoïdes.	9
5	Organisation structurale de la membrane érythrocytaire humaine	13
6	Les principales voies du métabolisme des radicaux libres dans les érythrocytes humains	14
7	Photo d' <i>Inula viscosa</i> L.	17
8	Structure chimiques de quelques composés identiques dans les feuilles d' <i>Inula viscosa</i> L	20
9	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	22
10	Protocole de dosage des phénols totaux	23
11	Protocole de dosage des flavonoïdes totaux	24
12	Protocole de dosage des tanins condensés	25
13	Protocole de l'évaluation de la capacité antioxydante totale	26
14	Protocole d'évaluation de l'activité scavenger contre le radical hydroxyle	27
15	Protocole d'évaluation de test de décoloration au β -carotène	29
16	Protocole d'évaluation du test de cytotoxicité	30
17	Protocole d'évaluation de l'effet anti-hémolytique	32
18	Protocole d'inhibition de la dénaturation d'albumine	33
19	Histogramme des teneurs en phénols totaux des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i>	36
20	Histogramme des teneurs en flavonoides des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	38
21	Histogramme des teneurs en tannins condensés des différents extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	39
22	Histogramme de l'activité antioxydant totale des extraits des feuilles d' <i>I.viscosa</i>	41

23	Histogrammes de l'effet scavenger contre le radical OH des extraits d' <i>I.viscosa</i> et le standard à 100µg/ml.	42
24	Histogrammes des concentrations inhibitrices à 50 % (IC ₅₀ %) des extraits d' <i>I.viscosa</i> et le standard contre le radical hydroxyle OH.	44
25	Cinétique de blanchissement du β-carotène en présence des extraits d' <i>I.viscosa</i> et des standards.	45
26	Histogrammes d'inhibition de la peroxydation lipidiques des extraits d' <i>I.viscosa</i> et des standards.	45
27	Histogramme des taux d'hémolyse (%) des globules rouges traitées avec les différents extraits d' <i>I.viscosa</i> .	47
28	Photos de globules rouges traitées avec l'extrait éthanolique d' <i>I.viscosa</i> et du témoin négatif vu sous microscope optique (GX1000).	49
29	Histogramme d'inhibition de la dénaturation d'albumine des différents extraits d' <i>I.viscosa</i> .	50
30	Histogrammes des effets protecteurs des globules rouges humains contre l'hémolyse induit par l'AAPH en fonction des temps d'analyse des échantillons étudiés.	53

Liste des TABLEAUX

Tableaux	Titre	Page
I	Différents dénominations en fonction des régions et des pays	17
II	Taux d'extraction (%) de feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	34

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie bibliographique

I-1-ACTIVITE ANTIOXYDANT

I-1-1- Stress oxydant.....	2
I-1-1-1- Définition.....	2
I-1-1-2- Origine du stress oxydant.....	2
I-1-1-3- Pathologies liés aux stress oxydant.....	3
I-1-2- Antioxydants.....	4
I-1-2-1- Antioxydants endogènes	4
I-1-2-2- Antioxydants exogènes.....	4
I-1-2-3- Antioxydants d'origine végétale.....	5

I-2- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

I-2-1-Inflammation.....	6
I-2-1-1-Définition	6
I-2-1-2-Types d'inflammation.....	7
II-2- Anti-inflammatoires	7
II-2-1- Anti-inflammatoires non stéroïdiens	7
II-2-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	8
II-2-3- Anti-inflammatoires d'origine végétale	8
II-3- Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	9
II-3-1- Inhibition de la dénaturation protéique	9
II-3-2-Stabilisation membranaire.....	10
II-3-3- Inhibition des enzymes pro-inflammatoires.....	10

I-3- GLOBULE ROUGE

I-3-1- Propriétés physico-chimique.....	11
I-3-1-1- Définition.....	11
I-3-1-2- Origine.....	11
I-3-1-3- Morphologie.....	12
I-3-1-4- Membrane des globules rouges.....	12
I-3-2- Globule rouge, stress oxydant et systèmes antioxydants.....	13
I-3-3- Hémolyse.....	15
I-3-3-1- Définition.....	15
I-3-3-2- Mécanisme d'hémolyse osmotique.....	15

I-4- INULE VISQUEUSE

I-4-1- Famille des Astéracées.....	16
I-4-2- Genre Inula.....	16
I-4-3- Espèce <i>Inula viscosa</i> L.....	17
I-4-3-1- Description botanique.....	17
I-4-3-4- Répartition géographique.....	18
I-4-3-5- Donnée pharmacologique.....	18
I-4-3-6- Donnée phytochimique.....	19

Partie expérimentale

II-Matériels et méthodes

II-1-Etude phytochimique.....	21
II-1-1-Matériel végétal.....	21
II-1-2-Extraction des composés phénoliques.....	21
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	23
II-2-1- Dosage des phénols totaux.....	23
II-2-2- Dosage des flavonoïdes.....	24
II-2-3- Dosage des tanins condensés.....	24
II-3- Evaluation de l'activité antioxydant.....	25
II-3-1- Capacité antioxydant totale (TAC).....	25
II-3-2- Activité scavenger contre le radical hydroxyle.....	26
II-3-3- Test de décoloration au β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	28
II-4- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (<i>in vitro</i>).....	29

II-4-1- Etude du stress oxydant sur le globule rouge humain.....	29
II-4-1-1-Isolements des globules rouge humains.....	29
II-4-1-2- Test de cytotoxicité.....	30
II-4-1-3- Test anti-hémolytique.....	31
II-4-2- Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine.....	32
II-5- Etude statistique.....	33

III-Résultats et discussions

III-1- Etude phytochimique.....	34
III-1-1- Rendements en composés phénoliques.....	34
III-1-2- Teneurs en composés phénoliques.....	36
III-1-2-1- Teneurs en phénols totaux.....	36
III-1-2-2-Teneurs en flavonoïdes.....	37
III-1-2-3-Teneurs en tannins condensés.....	39
III-2- Activité antioxydante.....	40
III-2-1- Capacité antioxydant totale (TAC).....	40
III-2-2- Activité scavenger contre le radical hydroxyle.....	42
III-2-3- Test de décoloration au β -carotène.....	44
III-3- Activité anti-inflammatoire (in vitro).....	47
III-3-1- Etude de cytotoxicité des différents extraits d' <i>I.viscosa</i>	47
III-3-2- Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine.....	Erreur ! Signet non défini.50
III-3-3- Résistance au stress oxydatif induit par le AAPH.....	51
Conclusion	54
Références bibliographique	56

Annexes

INTRODUCTION

Le stress oxydant est devenu un réel problème de santé, très fréquent dans notre vie moderne. Ce dernier est à l'origine de plusieurs maladies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardiovasculaires et l'arthrite rhumatoïde. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production de dérivés oxydants et la défense des antioxydants (**Lay et al., 2014**). D'une autre part, l'inflammation est également un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, elle se trouve impliquée dans un très grand nombre de pathologies humaines (**Zhang et al., 2015**).

L'utilisation des plantes médicinales comme remèdes date de la préhistoire (**Karou et al., 2005**). Actuellement beaucoup de recherches se sont orientées vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté, l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour leur usage. Par ailleurs, la recherche de substances d'origine végétale douées d'activités antioxydante et/ou anti-inflammatoires s'avère très utile pour l'amélioration de la sante humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse.

Les feuilles de la plante *Inula viscosa*. L ou inule visqueuse, connue en Algérie sous le nom : Amagraman ont été choisies sur la base de leurs utilisations en médecine traditionnelles locale comme antipyrétique, antiseptique et anti-inflammatoire, mais aussi dans le traitement d'hypertension artérielle, des bronchites, les infections respiratoires et le diabète (**Baba Aissa, 2000**).

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'étudier *in vitro* les activités biologiques de différents extraits de cette plante. D'une part, l'extraction et le dosage de quelques classes de composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés), par la suite l'étude de l'activité antioxydante des différents extraits utilisant trois méthodes expérimentales : le test de blanchissement du β -carotène, l'activité antioxydante totale et l'effet scavenger contre le radical hydroxyle. D'autre part, l'étude des propriétés anti-inflammatoire à travers le test de cytotoxicité, inhibition de la dénaturation d'albumine humaine et l'étude de l'effet des substances actives d'*I.viscosa* sur la résistance des hématies au stress oxydant induit par l'AAPH.

I-1- ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les réactions d'oxydation et de réduction dans les systèmes biologiques (réactions redox) représentent la base pour de nombreux mécanismes biochimiques. Un agent réducteur, ou antioxydant, est une substance qui donne des électrons, tandis qu'un oxydant, ou agent pro-oxydant, est une substance qui accepte des électrons. Les cellules sont constamment exposées aux oxydants produits par des processus physiologiques, tels que la respiration mitochondriale et physiopathologique telles que l'inflammation, le métabolisme de composés étrangers, et les radiations (**Toro et Rodrigo, 2009**).

I-1-1- Stress oxydant

I-1-1-1-Définition

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des espèces réactives de l'azote (RNS) et les systèmes de défense antioxydants en faveur des premiers, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (**Gammoudi et al ., 2013**).

I-1-1-2- Origine du stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont des molécules contenant de l'oxygène et qui sont produites lors du métabolisme physiologique, car ils sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. (**Filaire et Toumi, 2012**).

Cependant, une surproduction de DRO entraîne un déséquilibre dans la balance entre agents oxydants et agents antioxydants au sein des cellules et des tissus. La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ROS. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique.

Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus (**Filaire et Toumi, 2012**). Dans ce cas de figure 01, Les ROS et RNS, sont très instables et réagissent avec les macromolécules biologiques, infligeant ainsi des dommages à l'ADN, des protéines et des lipides provoquant ainsi plusieurs pathologies (**Favier, 2006**).

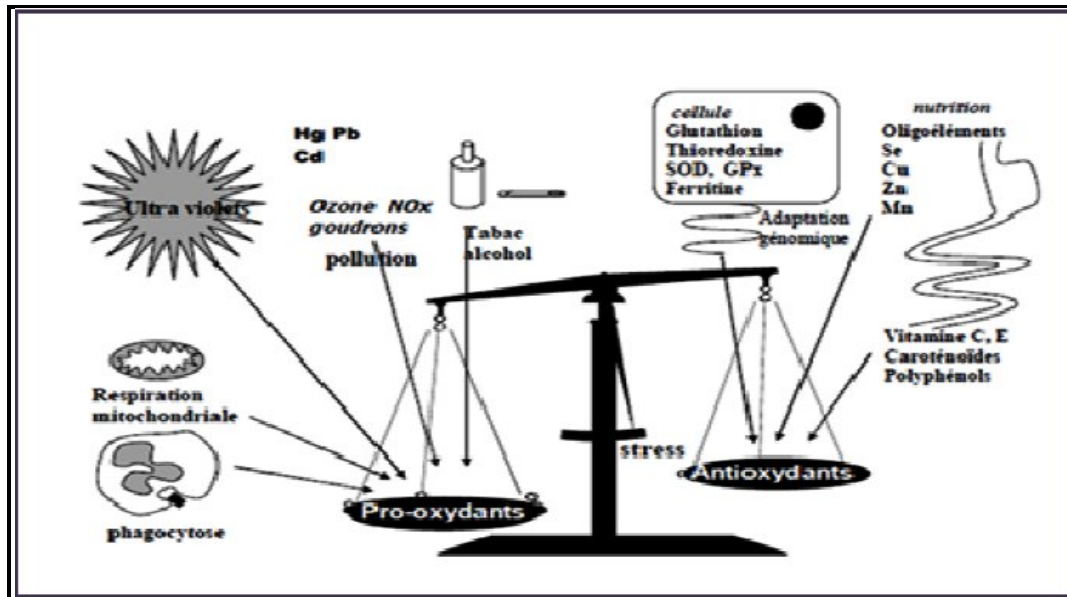


Figure 01 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro-oxydant et antioxydants (**Favier, 2006**).

I-1-1-3-Pathologie lié aux stress oxydant

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 (**Favier, 2006**). Les ROS peuvent provoquer des dommages aux macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaires...), et peuvent entraîner la mort cellulaire qui joue un rôle important dans de nombreuses pathologies, incluant : la cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré (**Favier, 2006 ; Pisoschi et Pop., 2015**). Le stress oxydant serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer et parkinson 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. 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 libres (**Favier, 2006**).

I-1-2- Antioxydant

D'après **Halliwell (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules. 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 (**Karou et al., 2005 ; Berger, 2006**).

I-1-2-1- Antioxydant endogène

L'organisme possède ses propres mécanismes de défense (endogènes). Il s'agit principalement d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase et le complexe enzymatique de la thioredoxine) dont l'action est de neutraliser les ERO par leur transformation en molécules stables et non réactives (**Sharma et al., 2012**).

I-1-2-2- Antioxydant exogène

Les antioxydants exogènes, tels que les vitamines E et C, sont localisés sur la membrane cellulaire, dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ils réagissent avec les ROS et les neutralisent. L'intérieur lipidique hydrophobe des membranes exige un éventail différent d'antioxydants. La vitamine E liposoluble est l'antioxydant le plus important dans cet environnement et qui préserve l'intégrité membranaire (**Niki ,2014; Noctor et al ., 2015**).

Les antioxydants liposoluble sont importants, ils empêchent les acides gras polyinsaturés membranaire (AGPI) de subir la peroxydation lipidique. Les antioxydants hydrosolubles comprenant la vitamine C qui jouent un rôle principal dans la neutralisation des ROS dans la phase hydrophile (**Toro et Rodrigo, 2009 ; Pisoschi et Pop, 2015**).

D'autres oligoéléments sont essentiels au métabolisme cellulaire comme : le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) qui sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent un rôle de cofacteurs indispensables pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydants (**Silva et al., 2013; Pisoschi et Pop, 2015**).

I-1-2-3- Antioxydants d'origine végétale

Les herbes et les épices ont été identifiées comme sources de divers composés phytochimiques, dont certains possèdent une puissante activité antioxydante. Les antioxydants d'origine végétale existent sous diverses formes, avec les polyphénols et les caroténoïdes comme les plus grands groupes de composés. Ceux-ci ont différentes fonctions et sont produits par les plantes pour protéger leurs cellules contre des dommages oxydants (Mahmoudi et al., 2015 ; Noctor et al., 2015). La figure 02 illustre les différents types d'antioxydants contribuant à la neutralisation des radicaux libres.

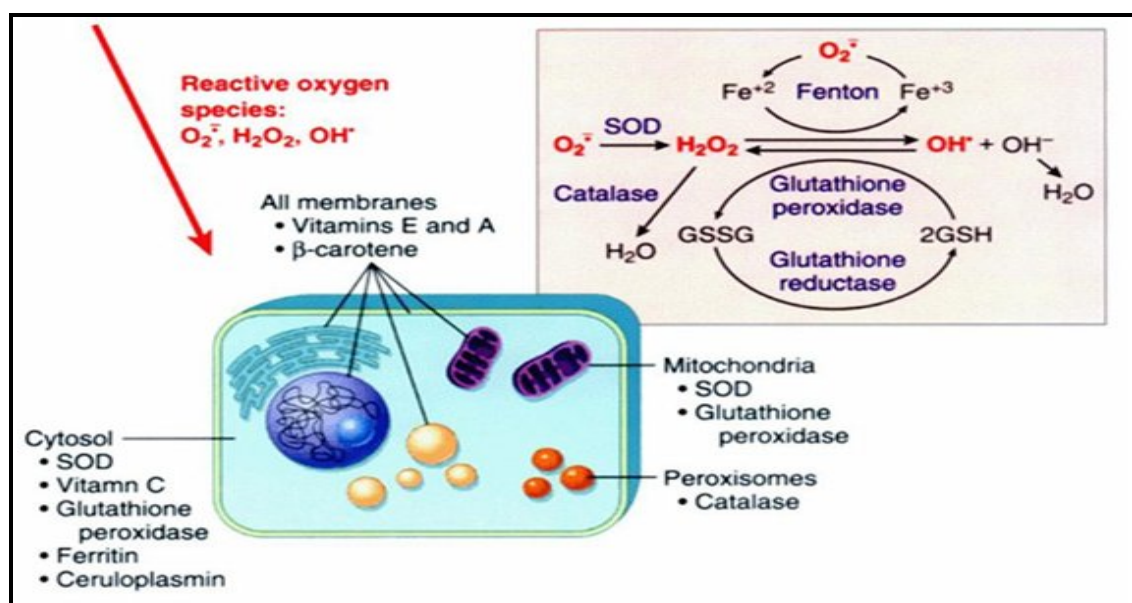


Figure 02 : Neutralisation des radicaux libres par le système antioxydant (Lee et Davis, 2012).

I-2- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

L'organisme est pourvu d'un système de protection contre les pathogènes qui menacent son intégrité. Ces derniers peuvent affecter des fonctions vitales. La connaissance du processus inflammatoire s'est affinée au cours des siècles. Jusqu'au 19^e siècle, l'inflammation était définie comme elle l'avait été par Cornélius Celsus dans l'antiquité par des signes cardinaux : *rubor* (rougeur), *tumor* (tuméfaction), *calor* (chaleur), *dolor* (douleur). Ensuite, Claude Galien y ajouta le cinquième signe cardinal: *functio laesa* «perte de fonction». (Russo-Marie *et al.*, 1998).

I-2-1- Inflammation

I-2-1-1- Définition

L'inflammation est un phénomène réactionnel mis en œuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée. L'inflammation est une réponse protectrice normale à des dommages tissulaires (chaleur ou exposition au froid, réperfusion, ischémie, traumatisme, etc.) dans laquelle le corps essaye de restituer le tissu à son état initial. L'inflammation est caractérisée par de la chaleur, rougeurs, douleurs et gonflements (Sharma et Singh., 2013). La figure 03 représente les différentes causes de l'inflammation et ses effets physiopathologiques.

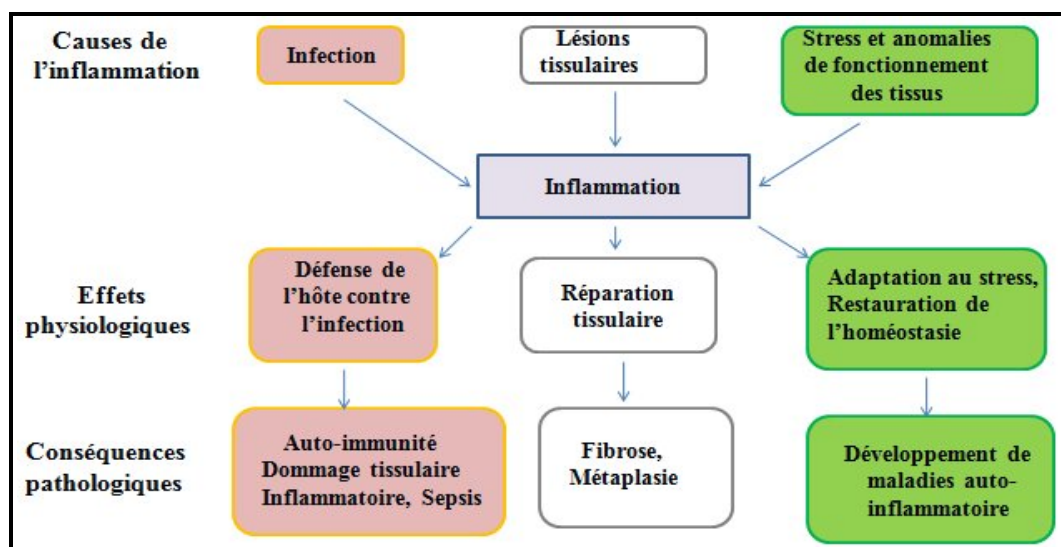


Figure 03 : Les différentes causes de l'inflammation et ses effets physiopathologiques (Medzhitov, 2008).

I-2-1-2-Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire :

I-2-1-2-1- Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë représente la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, apparaissant généralement en quelques minutes ou en heures, une fois que l'agent est éliminé, l'inflammation disparaît. Le processus de l'inflammation aiguë est initié par des cellules provenant du sang (lymphocytes et leucocytes) ou du tissu conjonctif local (mastocytes et macrophages). Elle est caractérisée par la vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire qui sont induites par les actions des différents médiateurs inflammatoires (**Anosike et al., 2012 ; Akinwunmi et al., 2015**).

I-2-1-2-2- Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une réponse inflammatoire prolongée qui conduit à un changement progressif dans le type de cellules présentes au niveau du site de l'inflammation, elle peut persister pour de longues périodes (mois ou année). La réponse inflammatoire chronique est caractérisée par la dominance de la présence des lymphocytes, des macrophages, et des cellules de plasma dans les tissus lésés (**Anosike et al., 2012**).

I-2-2- Agents Anti-inflammatoires

Ce sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires. On distingue les anti-inflammatoires stéroïdiens, dérivés de la cortisone et les non stéroïdiens et les anti-inflammatoires naturels à base de plantes (Figure 04).

I-2-2-1- Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement prescrits en raison de leur efficacité dans la prise en charge de la douleur, de la fièvre, de l'inflammation et des troubles rhumatismaux. Cependant, leur utilisation thérapeutique à long cours est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (**Ouédraogo et al., 2012**).

L'activité pharmacologique des AINS est liée à la suppression de la biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, par l'inhibition de la prostaglandine endoperoxydase, communément appelée cyclo-oxygénase (Cox).

Deux iso-enzymes de la Cox sont identifiés, Cox-1 et Cox-2, qui sont régulées et exprimées différemment. La Cox-1 qui joue un rôle physiologique en maintenant l'intégrité des tissus, alors que la Cox-2 est surexprimée localement lors d'états inflammatoires et de la synthèse des prostaglandines (**Ziltener et al., 2010 ; Dave et Bansaln, 2013**).

I-2-2-2- Anti-inflammatoire stéroïdien

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de substances dérivées du cortisol qui agissent en diminuant la migration des polynucléaires, monocytes et macrophages vers les sites de l'inflammation et en bloquant la production de médiateurs comme la sérotonine, l'histamine et les cytokines. Le mécanisme d'action de ces anti-inflammatoires passent par l'inhibition de la production des prostaglandines par blocage de la phospholipase A2. Ce blocage est obtenu par l'induction de la synthèse de la lipocortine (protéine de 40 kDa) qui inhibe directement la PLA2 (**Russo-Marie et al., 1998**).

L'usage des AIS est associé à de nombreux effets indésirables tels que les troubles gastro-intestinaux, l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse des glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (**Russo-Marie et al., 1998**).

I-2-2-3- Anti-inflammatoires d'origine végétale

Dans ce contexte, le recours aux ressources naturelles, et plus particulièrement aux plantes médicinales, devient une importante voie alternative à explorer afin de découvrir des médicaments efficaces à moindres effets secondaires. Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste et leur spectre d'activité est aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (**Ouédraogo et al., 2012**).

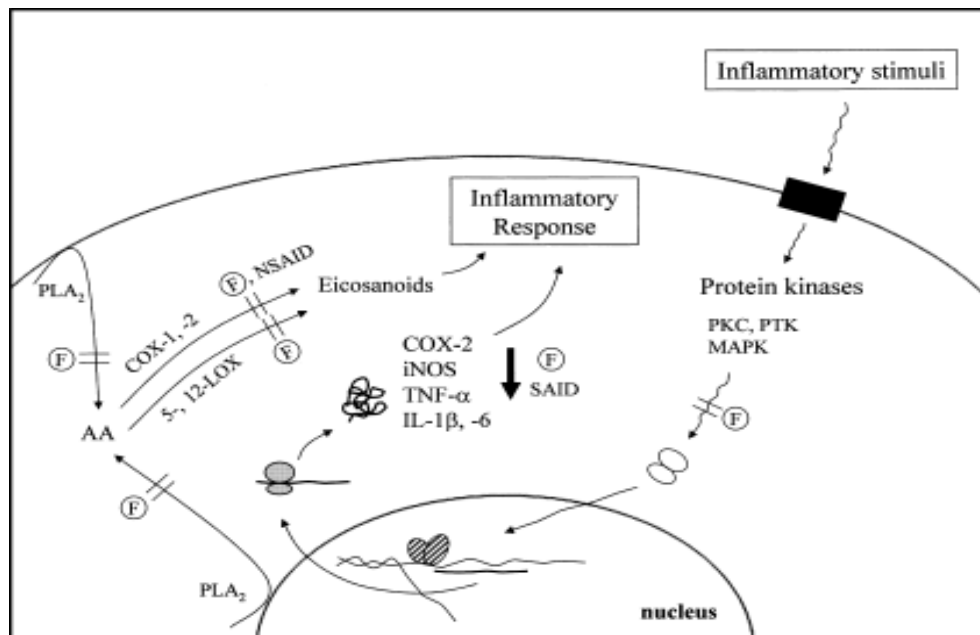


Figure 04 : mécanisme d'action proposé de flavonoïdes. Flavonoïde (F), médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), médicament anti-inflammatoire stéroïdien (SAID). "=" et "↓" désignent inhibition de l'enzyme et la diminution de la régulation de l'expression, respectivement (Kim *et al.*, 2004).

I-2-3- Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer divers processus biochimiques impliqués dans l'activité anti-inflammatoire.

I-2-3-1- Inhibition de la dénaturation protéique

Les peroxydes et les radicaux hydroxyles formés pendant l'inflammation peuvent causer l'oxydation, la décarboxylation, la désamination, et les dommages structurels aux acides aminés tels que le clivage et la modification des chaînes polypeptidique (Fuchs et Packer, 2005). La modification des protéines par des médiateurs de l'inflammation peut mener à leur dénaturation ce qui peut potentiellement rendre ces protéines non fonctionnelles. Par exemple, la carbonylation de la lysine affecte des fonctions de protéine pendant le processus de signalisation. On observe souvent ces protéines modifiées dans les patients présentant la maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, et le cancer (Roy *et al.*, 2013).

Selon Lemk et Williams. (2013), la dénaturation des protéines rend ces derniers antigéniques. De ce fait lançant une immuno-réaction et produisant les changements biochimiques tissulaires, qui mène finalement au rhumatisme articulaire. Le facteur

rhumatoïde est un anticorps dirigé contre l'IgG du soi et qui est régulièrement trouvé dans les sérums des patients présentant les maladies auto-immunes. L'antigénicité du soi de l'IgG est provoqué par un changement dans la structure de l'immunoglobine (**Fuchs et Packer, 2005**).

I-2-3-2- Stabilisation membranaire

La stabilisation membranaire est un processus de maintien de l'intégrité des membranes biologiques tels que les érythrocytes et les membranes lysosomales contre osmose et les lyses induites par la chaleur. Les membranes biologiques ont des structures asymétriques qui sont thermodynamiquement stables et métaboliquement actives qui forment des frontières fermées entre les différents compartiments qui se composent principalement des protéines et des lipides. Certains critères peuvent affecter l'état physique général de la membrane biologique telle que la température, les ions environnementaux et la composition de la membrane en acides gras, phospholipides et de la présence ou non de cholestérol. De nombreux stabilisateurs des membranes (acide méfénamique, la phénylbutazone...) et déstabilisateurs (Vitamine A, des sels biliaries...) pourraient agir sur l'intégrité et la fluidité des membranes cellulaires (**Thinagaran et Dharman, 2014**).

I-2-3-3- Inhibition des enzymes pro-inflammatoires

L'inflammation induite par le stress oxydant est médiée essentiellement par l'activation des enzymes pro-inflammatoire, telles que la phospholipase A2 (PLA2), les cyclooxygénases (Cox), les lipooxygénases (Lox), et l'enzyme productrice du NO ; l'oxyde nitrique synthase (NOS). Diverses études ont montré que certaines substances médicinales ; les polyphénols par exemple ; sont capables d'inhiber l'action de la phospholipase A2 (PLA2), les cyclooxygénases (Cox), et la 5-lipoxygénase (5-LPO) (**Clavin et al., 2007 ; Cia et al., 2016**). En effet, **Kim et al. (2004)** ont montré l'effet inhibiteur des flavonoïdes (sakuranetine, 7-O-méthylaromadendrine, nepetine, 3,3'-di-O-méthylquercetine) sur le métabolisme de l'acide arachidonique en inhibant l'activité de la Cox-2.

I-3- GLOBULE ROUGE

Le globule rouge, de part de sa fonction de transfert d'oxygène, est soumis à des conditions où le stress oxydant est important (Zhu *et al.*, 2005 ; Çimen, 2008). Le maintien de la structure et de la dynamique de sa membrane est essentiel à l'accomplissement de sa fonction. En effet, l'oxygène doit pouvoir diffuser à travers la membrane, et la cellule doit être capable de se déformer pour progresser dans les capillaires à diamètres réduits. La structure et, donc, la fluidité de la membrane influencent ses propriétés. Le globule rouge présente des défenses antioxydantes accrues qu'elle dépasse ses défenses aboutissant à des lésions irréversibles de la membrane cellulaire (Portier *et al.*, 2007). En raison de sa particularité, avec absence d'organites et du noyau, le globule rouge reste un bon modèle d'étude du stress oxydant.

I-3-1- Propriétés physico-chimique

I-3-1-1- Définition

Les globules rouges, ou hématies, ou érythrocytes sont des petites cellules les plus nombreuses du sang : $5 \cdot 10^6$ par mm^3 soit environ $25 \cdot 10^{12}$ hématies dans le sang d'un homme. Les hématies sont dépourvues de noyau, ce qui limite leur survie à 120 jours avec une forme discoïdale biconcave, tous les globules rouges ont une même forme, même diamètre et même coloration à l'état normal, toutes modifications de ces critères traduisent un phénomène pathologique (Richard *et al.*, 2010).

I-3-1-2- Origine

La fabrication d'hématies par la moelle osseuse est appelée érythropoïèse. Ce processus biologique débute au niveau des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces dernières vont d'abord générer des progéniteurs érythroïdes de type (BFU-E) qui vont ensuite se différencier en progéniteurs de type (CFU-E). Au-delà du stade de progéniteurs érythroblastiques les précurseurs vont se différencier successivement en proérythroblastes puis en érythroblastes (polychromatophiles, basophiles, acidophiles). Les différences morphologiques entre ces cellules sont reflétées par l'accumulation progressive de l'hémoglobine, la diminution de la taille du noyau. Une fois le noyau condensé, il sera

expulsé de la cellule donnant ainsi naissance aux réticulocytes caractérisés par la persistance d'organites cytoplasmiques (**Mazurier et Douay, 2013**).

Après une brève période dans la moelle osseuse, les réticulocytes sont libérés dans la circulation sanguine où ils subissent une ultime étape de maturation en globule rouge (2 à 3 jours). Durant cette période des changements majeurs apparaissent : perte des organites, changements de la perméabilité membranaire et de la mobilité cellulaire, diminution de la surface cellulaire, changements dans l'organisation des protéines membranaires. Le globule rouge adopte alors sa forme typique, indispensable pour acquérir sa capacité de déformabilité et sa fonctionnalité (**Mazurier et Douay, 2013**).

I-3-1-3- Morphologie

La morphologie sous microscope sur frottis sanguin indique que les hématies normales se présentent toutes comme des disques biconcaves réguliers de diamètre environ 7,2 μm avec une variation naturelle de 6,8 à 7,5 μm et d'une couleur claire au centre et colorée à la périphérique (**Manaargadoo-Catin et al., 2016**).

I-3-1-4- Membrane du globule rouge

La membrane des érythrocytes a servi pendant de nombreuses années comme un modèle simplifié des membranes plasmiques des mammifères. Elle est constituée essentiellement de lipides et de protéines (figure 05) qui s'intriquent intimement par des interactions non-covalente tel que : interaction de Van der Waals, liaisons hydrogènes, forces électrostatiques et hydrophobes pour former une structure complexe (**Franco et Low, 2010 ; Manaargadoo-Catin et al., 2016**).

➤ Les lipides membranaires : Ils sont représentés principalement par les phospholipides, sphingolipides et le cholestérol. Il existe en outre de faible quantité d'acides gras et de glycolipides dont certains sont porteurs d'antigènes de groupe sanguin. Les phospholipides se répartissent en deux couches opposées par leurs groupements hydrophobes, la répartition des différents types de phospholipides varie entre les feuillettes internes, formée essentiellement par la phosphatidylserine, l'inositol et l'éthanolamine et les feuillettes externes, constituées par la phosphatidyl choline et sphingomyéline (**Manaargadoo-Catin et al., 2016**).

➤ Les protéines membranaires : elles sont classées en deux groupes : le premier est celui des protéines extrinsèques situées en dehors de la bicouche lipidique qui constituent le squelette membranaire, principales sont : la spectrine, l'actine, la protéine bande 4.1 et l'ankyrine. Le second groupe présenté par des protéines intrinsèques (intégrale ou transmembranaire) qui traversent la bicouche lipidique, principales sont : La protéine bande 3 et les glycophorines A, B et C (Franco et Low, 2010 ; Manaargadoo-Catin *et al.*, 2016).

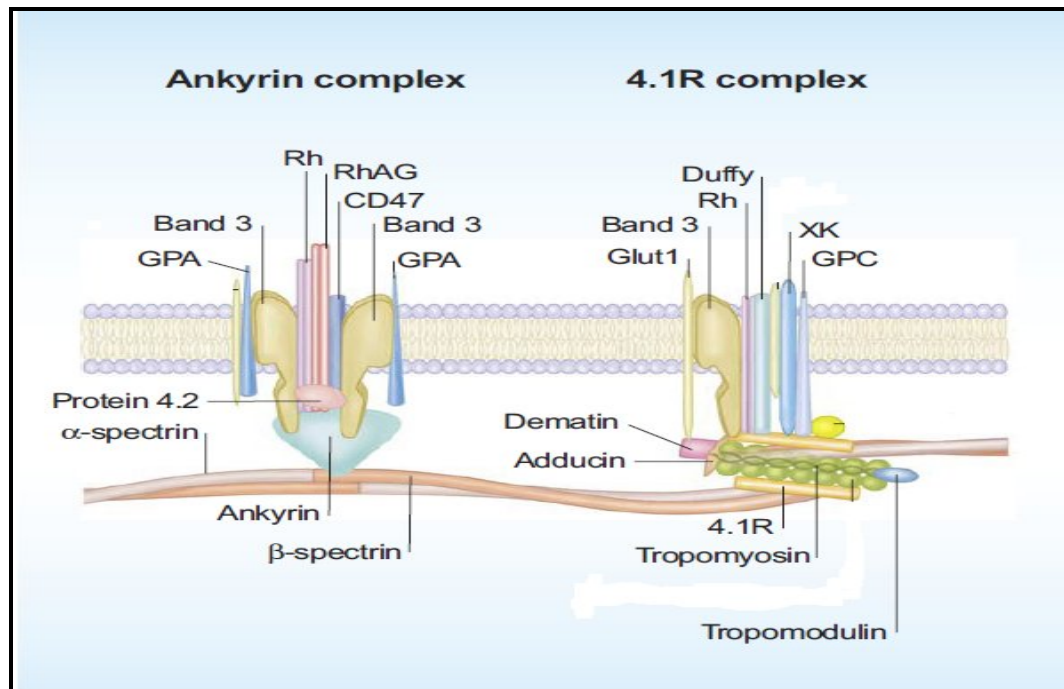


Figure 05 : Organisation structurale de la membrane érythrocytaire humaine (Mohandas et Gallagher, 2008).

I-3-2- Globule rouge, stress oxydant et systèmes antioxydants

Les érythrocytes jouent un rôle essentiel dans le transport de O₂ et de CO₂ pour la respiration et le maintien du métabolisme des nutriments. Elles sont très sensibles aux dommages oxydatifs et peuvent continuellement produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en raison de leur forte concentration cellulaire en acide gras polyinsaturé, en hémoglobine et en oxygène (Li *et al.*, 2013). La production de ces dernières est accompagnée par l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine avec la production de l'anion superoxyde (Andriichuk *et al.*, 2016). La dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase constitue la principale source du peroxyde d'hydrogène dans les globules rouges (Mossa *et al.*, 2014). L'accumulation du

peroxyde d'hydrogène diminue la demi vie des érythrocytes à cause de la peroxydation des phospholipides membranaires mais aussi par l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine, laquelle contient du fer à l'état ferrique oxydé, incapable de fixer l'oxygène (Neupane *et al.*, 2008).

Afin de se prévenir et de se protéger, les globules rouges possèdent des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques efficaces, qui corrigent les dommages oxydatifs (García-Becerra *et al.*, 2016). La superoxyde dismutase (SOD) facilite la conversion de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et ce dernier est décomposé par la catalase (CAT) en oxygène (O_2) et en eau (H_2O). La glutathion peroxydase (GPx) réduit le H_2O_2 en eau par oxydation de deux molécules de glutathion (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Le glutathion (GSH) est le principal antioxydant non enzymatique dans les érythrocytes, il peut piéger les ROS directement en agissant comme un substrat pour la (GPx) au cours de la détoxification du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques (Mossa *et al.*, 2014 ; Andriichuk *et al.*, 2016). La figure 06 représente les principales voies du métabolisme des radicaux libres dans les érythrocytes humains.

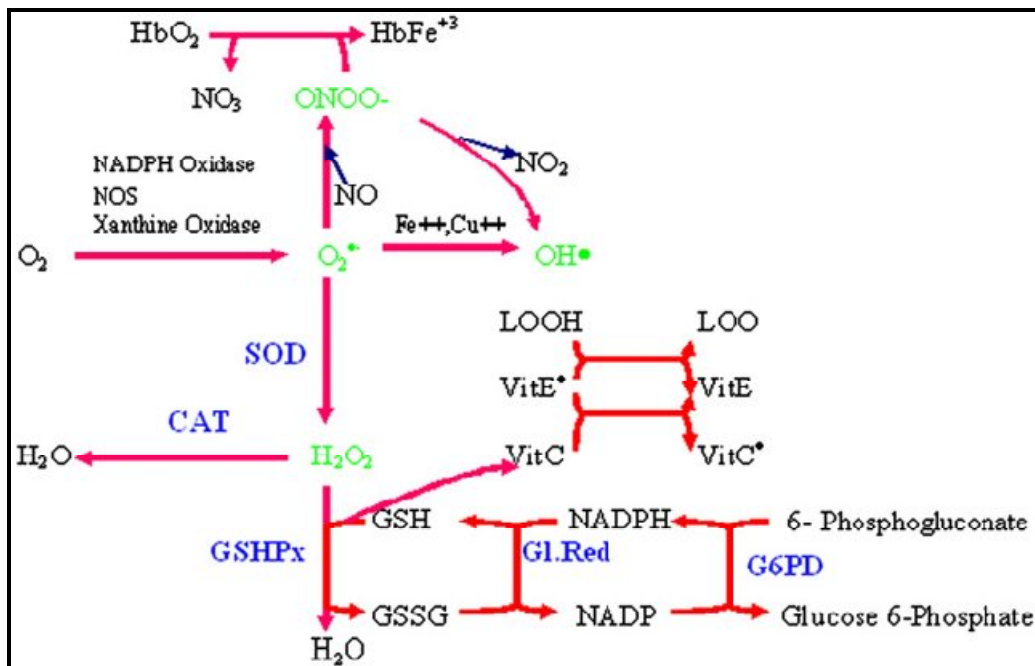


Figure 06: Les principales voies du métabolisme des radicaux libres dans les érythrocytes humains (Çimen *et al.*, 2008).

I-3-3- Hémolysse

I-3-3-1- Définition

L'hémolysse présente la répartition ou la perturbation de l'intégrité de la membrane des globules rouges (**Sowemimo - coker, 2002**). Par définition l'hémolysse est la rupture de la membrane des globules rouges (RBC), provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant (plasma ou solution additive) (**Kalaiselvi et Vidhya, 2015**).

I-3-3-2- Mécanisme d'hémolysse osmotique

Mécanisme de lyse osmotique est similaire à l'hémolysse dans les médias hypotonique qui est principalement expliquée par des changements conformationnels ou associatives de protéines membranaires conduisant à la formation de trous et l'hémolysse ultérieure. Au cours de l'hémolysse en milieu hypotonique, les érythrocytes gonflent et la réorganisation de composants de la membrane se produit avec l'association des ankyrines et la Band 3 ainsi que la modification du rapport spectrine dimère / tétramère. L'intervention de la protéine bande 3 est spécifique de la membrane érythrocytaire par rapport à d'autres cellules. L'augmentation de la mobilité latérale et de rotation de la bande 3 conduit à la formation d'anneau créant des trous membranaires d'une dimension d'environ 3 pm. Ces pores permettent la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (**Manaargadoo-Catin et al., 2016**).

I-4- INULE VISQUEUSE

Les plantes ont toujours été une source commune de médicaments, que ce soit sous la forme de préparations traditionnelles ou comme principes actifs purs (**Farnsworth et al., 1985**). Bien que cela varie fortement selon les pays, la connaissance de la valeur clinique, pharmaceutique et économique des substances naturelles notamment celles d'origine végétale, ne cesse de croître (**Ji et al., 2009**).

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques (**Gaussen et al., 1982**). Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

I-4-1- Famille des Astéracées

La famille des Astéracées ou Composées, est l'une des plus distribuées dans le règne végétal. Cette famille appartenant aux dicotylédones comprenant environ 1600 genres et plus de 25000 espèces . Ce sont des plantes herbacées, arbres, arbustes ou lianes largement répartis à l'échelle mondiale, avec un intérêt particulier dans les régions tempérées ; la région méditerranéenne et l'Europe orientale. Les plantes de cette famille sont considérées comme une excellente source d'antioxydants naturels avec des utilisations potentielles en médecine et dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Elles sont très riches en sesquiterpènes notamment les lactones sesquiterpéniques (**Bessada et al., 2015 ; Aronson, 2016**).

I-4-2- Genre *Inula*

Le genre *Inula* comprend une grande variété, d'environ 112 espèces (**Seca et al., 2014**). Ce sont des plantes herbacées, vivaces, à feuilles altères. Capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées. Bractées en plusieurs séries. Fleurs périphériques pastillées, à ligules tridentées. Anthères sagittées à la base (**Parolin et al., 2014**). Le genre *Inula* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France ...), Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc...).

I-4-3-Espèce *Inula viscosa* L.

I-4-3-1- Description botanique

Inula viscosa L. Aiton (syn : *Dittrichia viscosa* L. Greuter) est une espèce de plantes qui appartient à la famille des Astéracées de forte odeur (Hernández et al., 2007), elle se produit dans des environnements rudérales (par exemple, le long des routes). C'est une plante herbacée vivace (figure 07), les racines peuvent être assez importantes avec une longueur d'environ 116 cm. Elle a des tiges droites, avec bifurcation commençant au bas de la tige. Les branches sont nombreuses avec un angle irrégulier. Les fleurs sont nombreuses de couleur jaune (Parolin et al., 2014).



Figure 07: Photo d'*Inula viscosa* L

➤ Noms vernaculaires

Tableau I : Différentes dénominations en fonction des régions et des pays :

Langue	Noms	Références
Français	Inule visqueuse	Baba Aissa, 2000
Anglais	Stichkyfleabane	Wang et al., 2004
Berbère	Amagramane	Baba Aissa, 2000

➤ Classification botanique

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** : Astéraceae
- **Genre** : *Inula*
- **Espèce** : *Inula viscosa* L.

I-4-3-2- Répartition géographique

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. Cette espèce pousse sur les lieux incultes et rocailleux dans des sols secs et calcaires (**Parolin et al., 2014**).

I-4-3-3- Donnée pharmacologique

La médecine traditionnelle a attribué plusieurs propriétés thérapeutiques à l'inule visqueuse. La plante est utilisée pour le traitement de plusieurs maladies: Le diabète et l'inflammation dans la médecine traditionnelle d'Afrique du Nord, la tuberculose, l'anémie et comme cataplasme pour les douleurs rhumatismales en Jordanie. Elle est utilisée pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoire, antipyrétique, antiseptique, antiphlogistique et dans le traitement du diabète (**Rozenblat et al., 2008, Chahmi et al., 2015**).

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, Chahmi et al., 2015**).

I-4-3-4- Données phytochimiques

Plusieurs groupes chimiques se retrouvent dans différentes parties de la plante. Il s'agit des flavonoïdes, des triterpènes, des lactones et des acides sesquiterpènes (**Mamoci et al., 2011**). Tomentosine et inuviscolide sont deux lactones sesquiterpènes présents dans les feuilles d'*I.viscosa* (**Rozenblat et al., 2008**). Les principaux flavonoïdes présents dans la partie aérienne de la plante sont : sakuranetine, 7-O-méthylaromadendrine, nepetine, 3,3'-di-O- méthylquercetine, 3-acetyl-7-O- ethylaromadendrine (**Hernández et al., 2007**). Les acides phénoliques présents dans les feuilles d'*I.viscosa* sont principalement des dérivés de l'acide cafféoylquinique. Il s'agit des acides 3-O-, 1-O-, 4-O- 5-O-, 1,3-di-O-, 3,4-di-O-, 1,5-di-O-cafféoylquinique (**Danino et al., 2009**). Acide ilicique, costique et le dihydrocostique sont des acides sesquiterpéniques isolées dans des feuilles d'*I. viscosa*. La figure 08 représente la structure chimique de quelques composés chimiques identifiés dans la plante *Inula viscosa*.

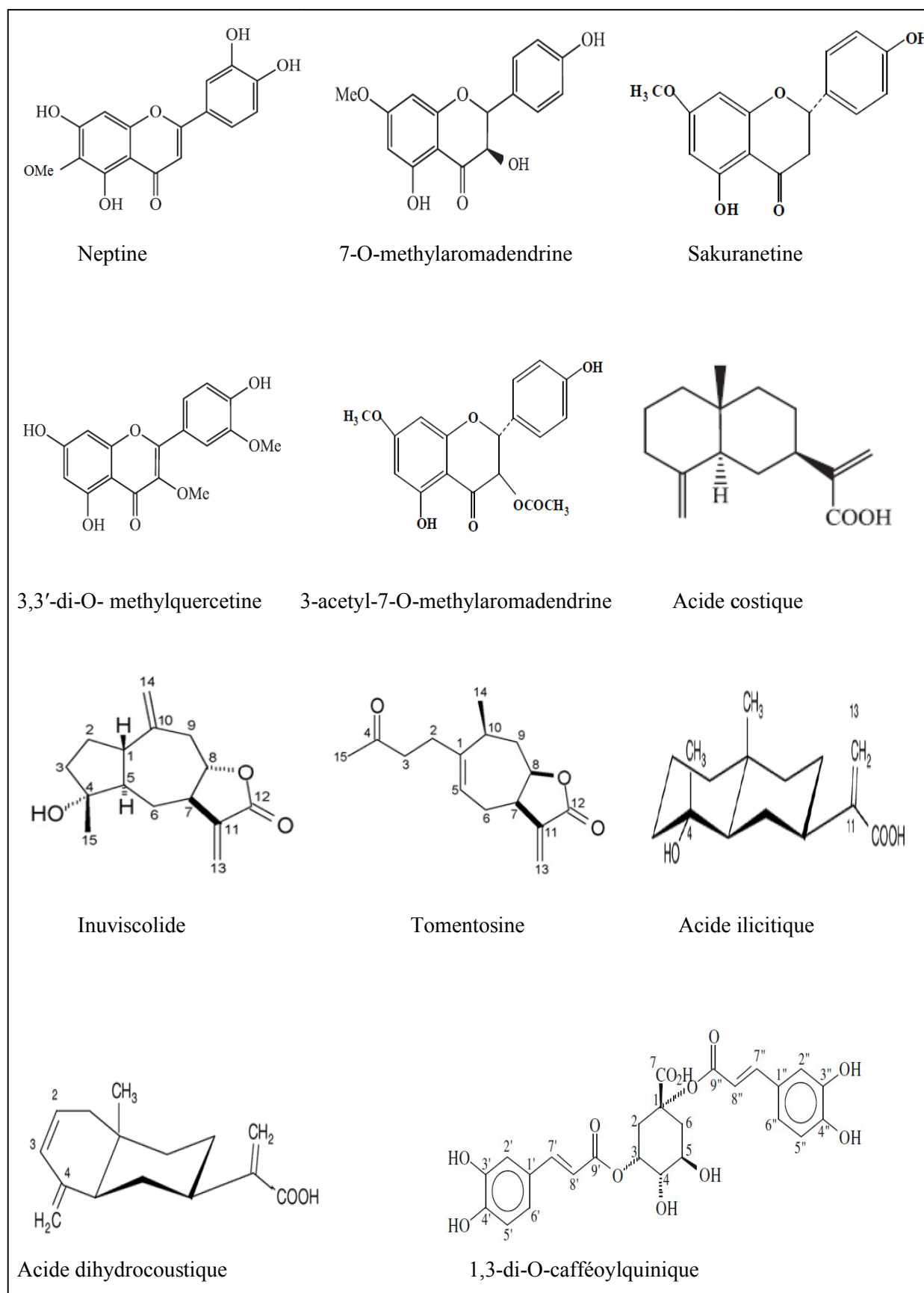


Figure 08: Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles d'*Inula viscosa*.
(Hernández et al., 2007 ; Rozenblat et al., 2008 ; Danino et al., 2009).

II-MATERIELS ET METHODES

II-1- Etude phytochimique

II-1-1- Matériel végétal

➤ Récolte

L'étude est effectuée sur les feuilles d'*I. viscosa* qui ont été récoltées en novembre 2015 dans la forêt d'Akfadou ; un site situé dans la localité de Chemini, wilaya de Bejaia, dans un endroit propre, loin de tout impact de pollution et après la disparition de la rosée du matin.

➤ Séchage et broyage

Les feuilles d'*I. viscosa* ont été séchées à l'air libre et à une température ambiante puis mises à l'étuve pour éliminer toutes traces d'humidité pendant 24 h, ensuite, broyées à l'aide d'un broyeur électrique 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 50µm qui sont utilisées pour l'extraction.

II-1-2- Extraction des composés phénoliques

➤ Principe

Le procédé d'extraction que nous employons au niveau de notre laboratoire est celui de **Chiang et al. (1994)** avec quelques modifications. Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective des composés phénoliques en utilisant des solvants de différentes polarités, allant de solvant très polaire à des solvants apolaires : l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'hexane dans le but de séparer les composés phénoliques des feuilles d'*I. viscosa* en composés de polarités distinctes.

➤ Mode opératoire

La méthode d'extraction des composés phénoliques est illustrée dans la figure 09.

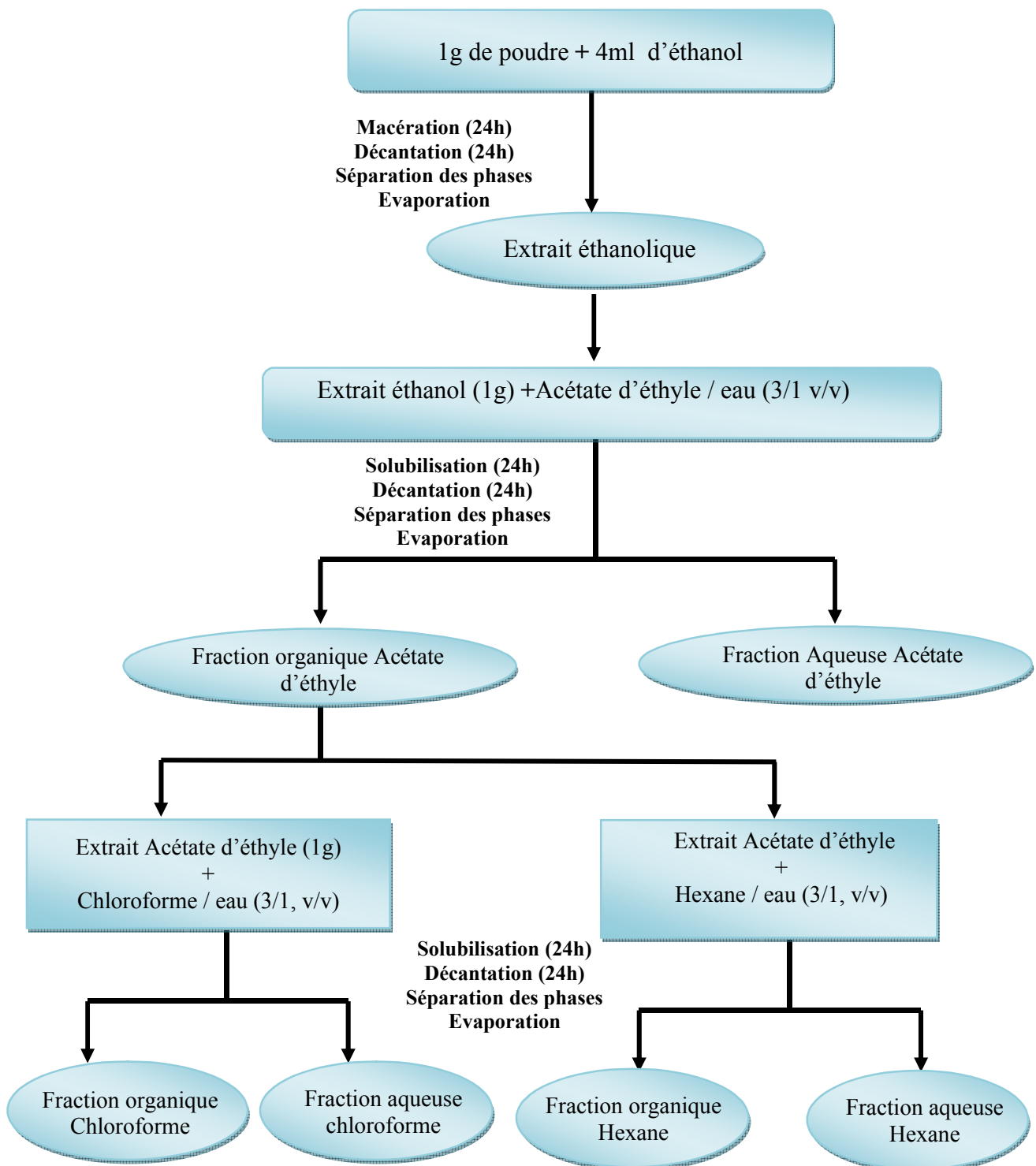


Figure 09: Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang et al., 1994).

➤ Calcul du rendement

Après l'extraction, sept extraits ont été obtenus. Le taux d'extraction de chaque extrait sec à été calculé suivant la formule ci-dessous :

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

Où :

P_1 : poids d'extrait après évaporation du solvant (g).

P_0 : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

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

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1- Dosage des phénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur bleue est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans les extraits (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

➤ Mode opératoire

La teneur en phénols totaux des extraits de plante a été déterminée par la méthode de **Kähkönen et al (1999)** ; exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG)/ g d'extrait et déduite à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 1) provenant de la régression linéaire des valeurs obtenues pour la solution standard. La figure 10 reprend les principales étapes du protocole expérimental du dosage des phénols totaux.

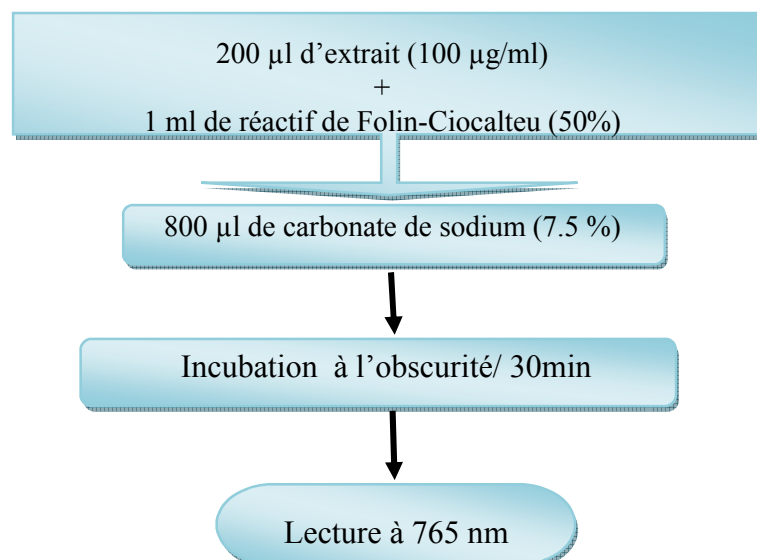


Figure 10: Protocole de dosage des phénols totaux (**Kähkönen et al., 1999**).

II-2-2- Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les différents extraits est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium. elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le trichlorure 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 (**Grazul et Budzisz , 2009 ; Bessada et al., 2015**).

➤ Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes totaux (figure 11) a été effectué par une méthode colorimétrique adaptée par **Maksimovié et al. (2005)**. Une gamme étalonnage est établie séparément avec la quercétine (Annexe 2) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/ g d'extrait).

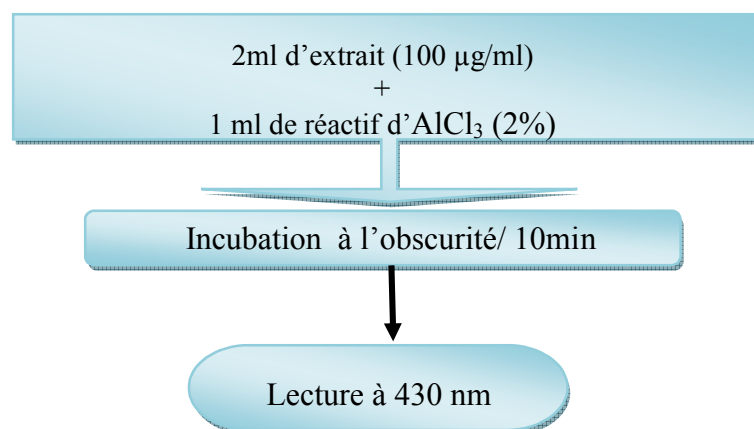


Figure 11 : Protocole de dosage des flavonoïdes totaux (**Maksimovié et al., 2005**).

II-2-3- Dosage des tannins condensés

➤ Principe

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Elle est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe vert mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (**Price et al., 1978**).

➤ Mode opératoire

Les quantités des tannins condensés (figure 12) sont déterminées selon la méthode de **Sun et al. (1998)**, et estimées en milligramme équivalents de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 4).

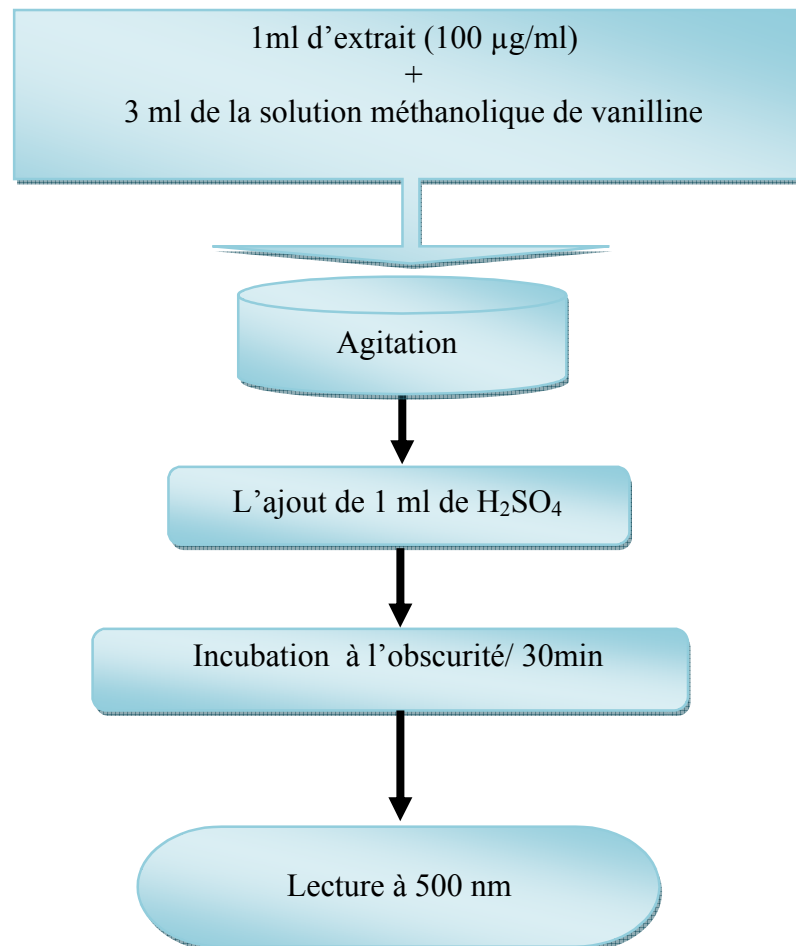


Figure 12: Protocole de dosage des tanins condensés (Sun et al., 1998).

II-3- Evaluation de l'activité antioxydante

II-3-1- Capacité antioxydante totale (CAT)

➤ Principe

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de feuilles *d'I. viscosa* est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto et al. (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction du molybdène Mo (VI) présent sous forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo (V) à pH acide (**Alam et al., 2013**).

➤ Mode opératoire

La détermination de la capacité antioxydante totale est réalisée selon la méthode de **Prieto et al. (1999)** représentée dans la figure suivante :

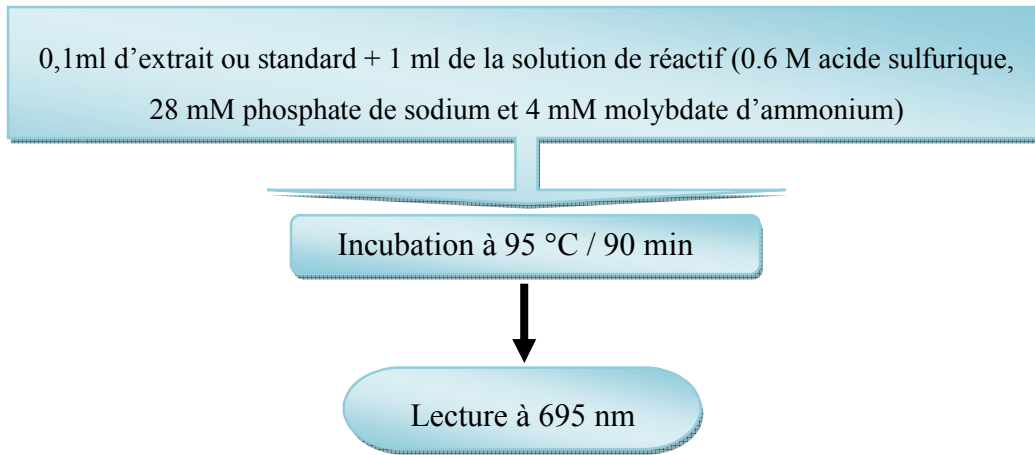


Figure 13: Protocole de l'évaluation de la capacité antioxydante totale (**Prieto et al., 1999**).

➤ Expression des résultats

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g d'extrait).

II-3-2- Activité scavenger contre le radical hydroxyle

➤ Principe

Le complexe (1,10-phénanthroline- Fe^{+2}) ayant un maximum d'absorption à 536 nm est utilisé comme un indicateur redox de la réaction de fenton ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) (**Apak et al., 2007**), génératrice de radicaux hydroxyles, ainsi la présence d'extrait phénolique permet leurs neutralisation et la stabilisation de la couleur rouge de la solution (**Tian et al., 2009**).

➤ Mode opératoire

La méthode de 1,10-phénanthroline adoptée dans cette étude est celle de **Tian et al. (2009)**. La valeur IC_{50} est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait ou de standard (Trolox).

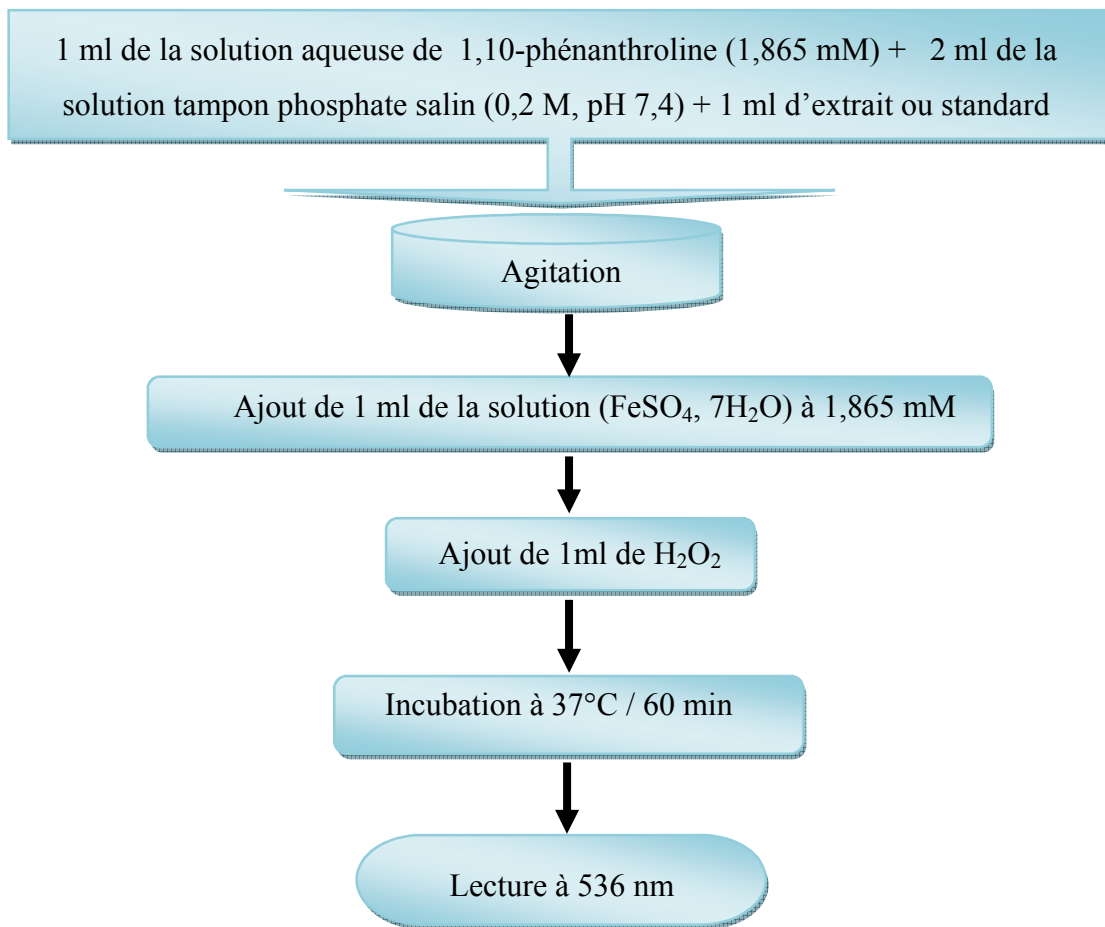


Figure 14: Protocole d'évaluation de l'activité scavenger contre le radical hydroxyle (Tian et al., 2009).

➤ **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition à 536 nm du radical Hydroxyle a été calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger de HO}^\circ = \left[\frac{A_E - A_C}{A_B - A_C} \right] \times 100$$

Où

A_E : l'absorbance de l'échantillon.

A_C : l'absorbance du control.

A_B : l'absorbance du blanc.

II-3-3- Test de décoloration au β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

➤ Principe

Les caroténoïdes peuvent être décolorées par auto-oxydation induite par la lumière, la chaleur ou par les radicaux peroxydes (ROO^\cdot) (Karadag *et al.*, 2009). Cependant, dans le test de décoloration du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant l'oxydation du β -carotène via l'application de la chaleur de façon perpétuelle en menant à la décoloration progressive du mélange réactionnel. Cependant, la présence des molécules réductrices comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système (Laguerre *et al.*, 2007 ; Bessada *et al.*, 2015).

➤ Mode opératoire

Le test de décoloration de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plante est celui du Khadri *et al.* (2010). Les différentes étapes de ce protocole sont illustrées dans la figure 15. Le BHT est utilisé comme standard et les IC_{50} sont calculées à partir des courbes à régression linéaire.

➤ Expression des résultats

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_E(0) - A_E(120)}{A_C(0) - A_C(120)} \right) \right] \times 100$$

Où

$A_E(0)$: l'absorbance de l'échantillon à l'instant $t=0$.

$A_E(120)$: l'absorbance de l'échantillon à l'instant $t=120$.

$A_C(0)$: l'absorbance du control à l'instant $t=0$.

$A_C(120)$: l'absorbance du control à l'instant $t=120$.

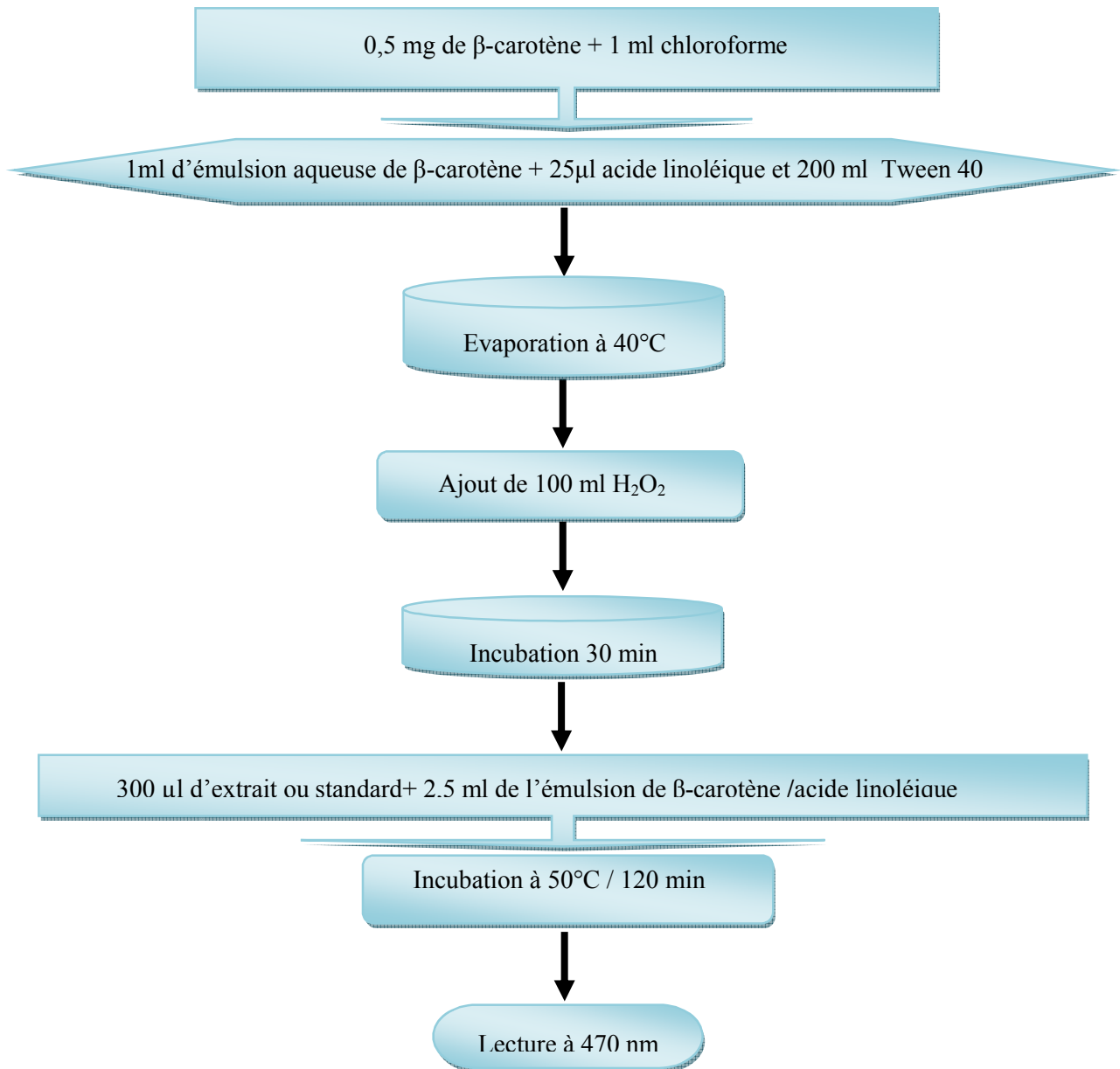


Figure 15: Protocole d'évaluation de test de décoloration au β-carotène (Khadri et al., 2010).

II-4- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

II-4-1- Etude du stress oxydant sur le globule rouge humain

Dans le présent travail, le recours à l'utilisation de globule rouge vise à étudier l'effet probable des extraits d'*I.viscosa* sur la stabilisation de la membrane cytoplasmique, par le test de cytotoxicité et anti-hémolytique. Ce dernier est quantifié par le dosage des cellules hémolysées et par examen microscopique.

II-4-1-1- Isolements des globules rouge humains

Le sang est collecté au-dessus du coude d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les 48h qui précèdent le prélèvement. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur des tubes héparines.

- ✓ Centrifugation du sang à 3000 rpm pendant 10 min,
- ✓ Lavage des érythrocytes 3 fois dans une solution isotonique (NaCl 0,9%)
- ✓ Les globules rouges sont reconstitués sous forme de suspension à 10% toujours la solution isotonique.

II-4-1-2- Test de cytotoxicité

➤ Principe

L'évaluation de la cytotoxicité de différents extraits, vis-à-vis des globules rouges humains, a été réalisée par mesure du pourcentage d'hémolyse et par l'observation sous microscope. Le principe de ce test est basé sur le contact des hématies avec les extraits d'*I.viscosa* à différentes concentrations dans une solution isotonique et le suivie de la concentration des cellules hémolysées.

➤ Mode opératoire

Le protocole suivi pour étudier la cytotoxicité des extraits d'*I.viscosa* (figure 16) est celui de l'**Okoko et Ere (2012)**. Les différents extraits sont testés à des concentrations allant de 50 à 1000 µg/ml.

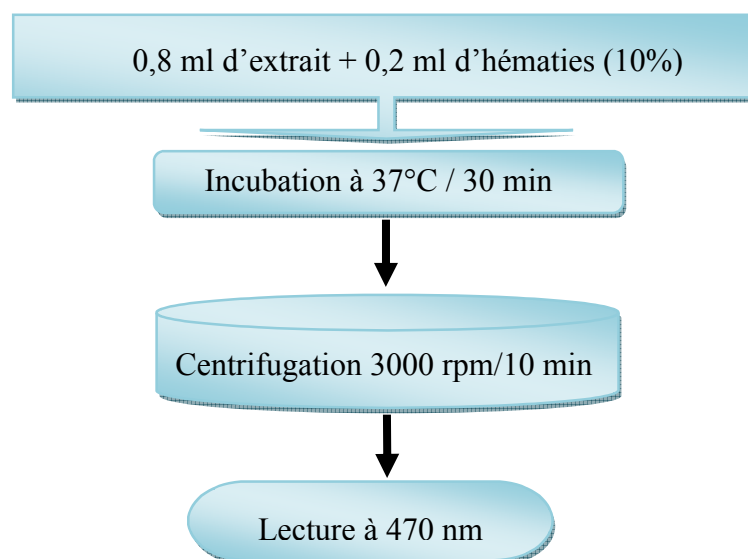


Figure 16: Protocole d'évaluation du test de cytotoxicité (Okoko et Ere, 2012).

➤ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse dans les échantillons témoins (témoin négatif et témoin positif) et les échantillons traités avec les différents extraits.

$$\% \text{ d'hémolyse} = \left[\frac{A_E}{A_C} \right] \times 100$$

Où :

A_E : Absorbance de l'échantillon.

A_C : Absorbance du control positif (solution hypotonique).

II-4-1-3- Test anti-hémolytique

➤ Principe

Dans le but de démontrer l'effet protecteur des extraits d'*I.viscosa* sur la préservation de l'intégrité cellulaire, qui est essentiellement liée au globule rouge, nous avons soumis les érythrocytes à des conditions du stress oxydant par l'ajout d'un oxydant AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride). La décomposition thermique de ce composé génère des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent la membrane des globules rouges et lorsque les antioxydants endogènes sont épuisés, la membrane des globules rouges éclate et l'hémoglobine intracellulaire est libéré (**Bessada et al., 2015**). Le suivi de l'hémolyse est évalué quantitativement par un dosage spectrophotométrie à 545 nm.

➤ Mode opératoire

L'effet anti-hémolytique des extraits d'*I.viscosa* est évalué *in-vitro* par la méthode du AAPH rapporté par **Zhang et al. (2011)**. L'acide ascorbique et le Trolox sont utilisés comme des standards (figure 17).

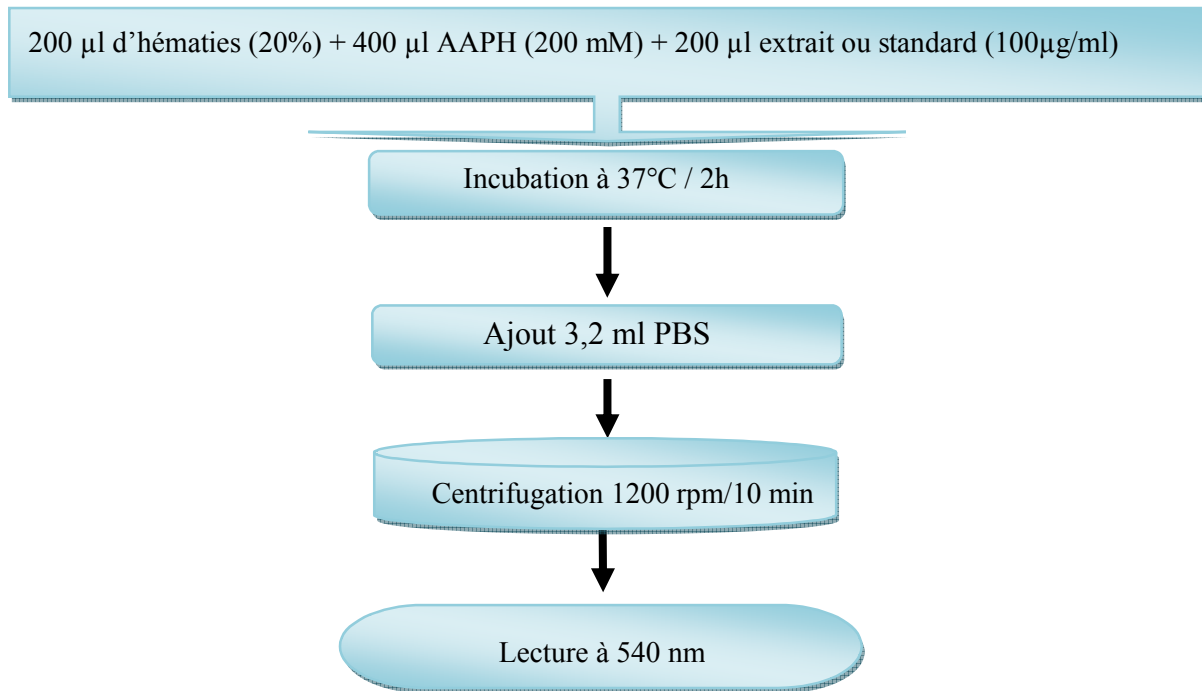


Figure 17: Protocole d'évaluation de l'effet anti-hémolytique (Yuan et al., 2005).

➤ Expression des résultats

L'effet protecteur de différents extraits est évalué en pourcentage d'inhibition d'hémolyse selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition d'hémolyse} = \left[1 - \frac{A_E}{A_C} \right] \times 100$$

Où :

A_E : Absorbance de l'échantillon.

A_C : Absorbance du control positif (hémolyse complet).

II-4-2- Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine

➤ Principe

L'albumine est mise en contact avec les extraits dans un milieu légèrement acide, la dénaturation est suivie en fonction de la turbidité de la solution d'albumine à 416 nm (Akinwunmi et Oyedapo, 2015).

➤ Mode opératoire

L'inhibition de la dénaturation d'albumine est déterminée selon la méthode de **Mizushima et Kobayachi (1968)**, le diclofénac est utilisé comme standard (figure 18).

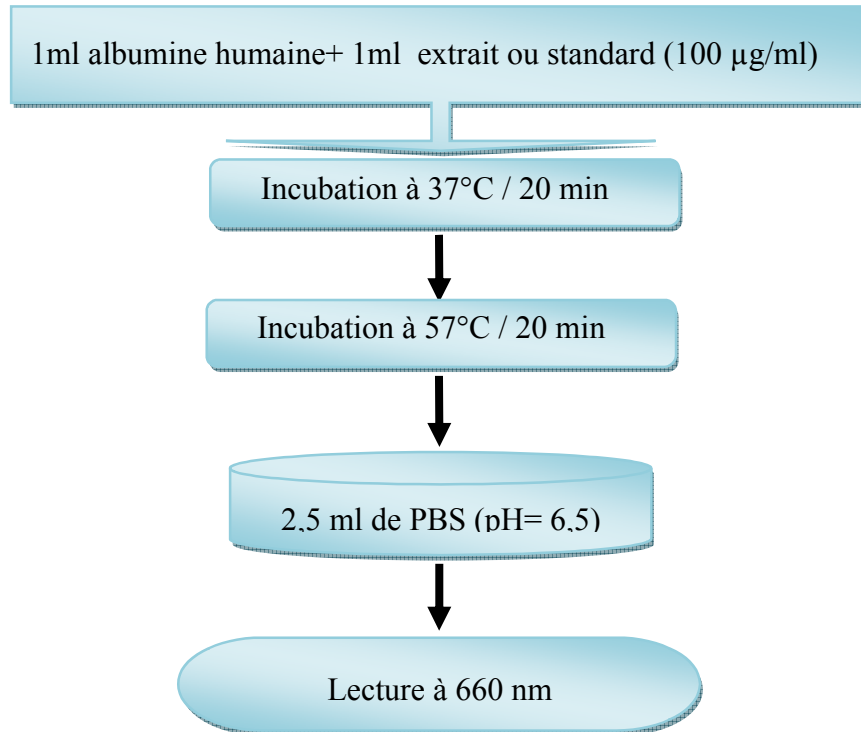


Figure 18: Protocole d'inhibition de la dénaturation d'albumine (**Mizushima et Kobayachi, 1968**).

➤ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'albumine est calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{(A_C - A_E)}{A_C} \right] \times 100$$

Où :

A_E : Absorbance de l'échantillon.

A_C : Absorbance du control.

II-5- 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 Graph Pad Prism 5 et le seuil de signification est fixé à $P < 0,05$.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans cette partie de notre travail nous allons exposer l'ensemble des résultats obtenus. En premier lieu les résultats d'étude phytochimique et dans un second lieu ceux relatifs aux activités biologiques des extraits de feuilles d'*Inula viscosa*.

III-1- Etude phytochimique

III-1-1- Rendements en composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques par des solvants de degré de polarité décroissant de la plante étudiée, nous a permis de déterminer les rendements des différents extraits (Tableau II).

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

Solvants	Taux d'extraction (%)
Ethanol	11, 54
Acétate d'éthyle	
Fraction organique	43.92
Fraction aqueuse	41.98
Chloroforme	
Fraction organique	70.45
Fraction aqueuse	21.84
Hexane	
Fraction organique	68. 34
Fraction aqueuse	15.87

Le rendement en extrait brut (11.54%) obtenu avec l'éthanol a été déterminé par rapport au poids (g) du matériel végétal ; réduit en poudre. 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**). En outre, il a la capacité de dissoudre les composées phénoliques moyennement polaires et peu aussi entrainer les substances lipophiles résiduelles (**Cowan, 1999**). Le rendement en extrait éthanolique est proche à celui obtenu par **Chahmi et al. (2015)** pour la même plante en Maroc et inférieur à celui obtenu par **Bssaibis et al. (2009)** dans une autre région du Maroc.

Il est à retenir que la variation du rendement d'extraction pourrait être attribuée à l'origine géographique de la plante, à la technique d'extraction, aux facteurs climatiques, mais également à la période de cueillette de la matière végétale et la partie de la plante étudiée **(Smith et al., 2005)**.

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 fractions organiques utilisés: acétate d'éthyle, chloroforme et hexane et leurs fractions 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 fractions 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 fraction organique largement supérieure ($P < 0.001$), de celui de la fraction aqueuse des feuilles d'*I.viscosa* (70.45% et 21.84%, respectivement). La même tendance de variation est observée lors de la comparaison des deux fractions d'extrait hexane, où le taux d'extraction de la fraction organique est beaucoup plus élevé (68.34%) par rapport à celui de la fraction aqueuse (15.87%).

Il ressort également à travers le tableau que le rendement d'extraction diffère significativement en fonction du solvant utilisé ($P < 0.05$) dont le mélange chloroforme-eau (3/1 v/v) extraire le maximum des composés phénoliques de l'ordre de 92.29%.

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins **(Garcia-Salas et al., 2010)**.

Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols **(Koffi et al., 2010)**. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante **(Garcia-Salas et al., 2010)**.

III-1-2- Teneurs en composés phénoliques

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 phytochimique qui consiste à la recherche des grandes classes de composés chimiques appartenant aux métabolites secondaires de la plante à étudier. En effet, le criblage phytochimique consiste à réaliser une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs. Les groupes phytochimiques recherchés sont entre autres : les polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tanins) (Virginie et al., 2015).

III-1-1-2- Teneurs en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols dans les extraits d'*I. viscosa* réalisé par la méthode du Folin-Ciocalteu à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique. Les résultats obtenus (figure 19) sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

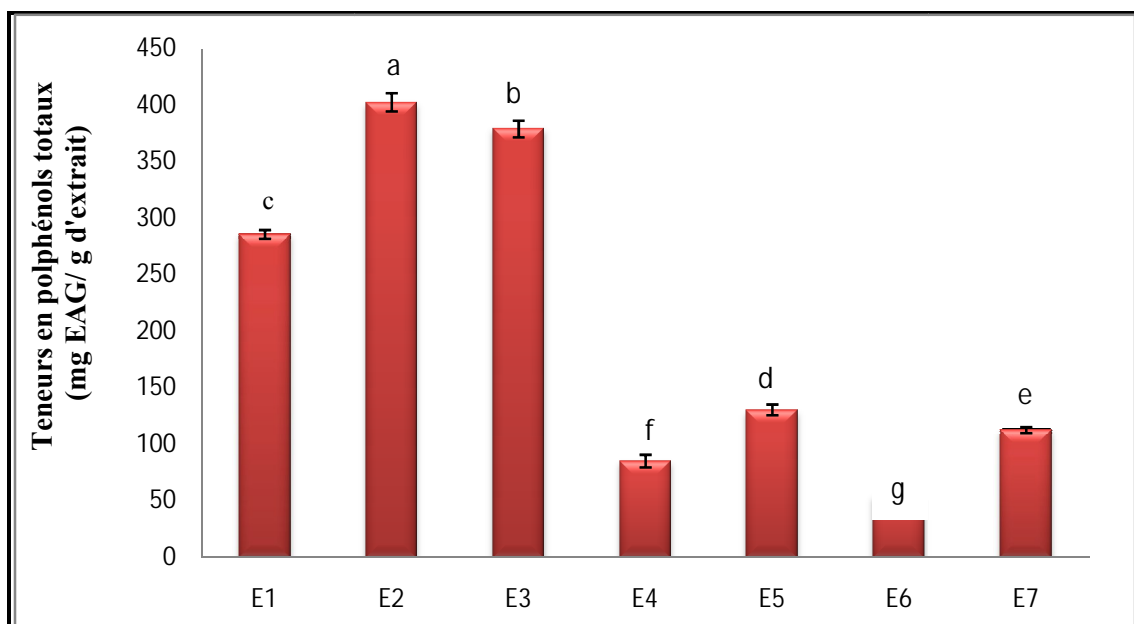


Figure 19: Histogramme des teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'*Inula viscosa*.

E1 : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux du chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane.

- Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais ($n = 3$) \pm l'écartype.
- Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($P < 0.05$).
- $a > b > c > d > e > f > g$.

A la lumière des résultats des teneurs en polyphénols rapporté dans la figure 19, il ressort que la plante *I. viscosa* est riche en polyphénols. En effet, la fraction organique et

aqueuse d'acétate d'éthyle et l'extrait éthanolique marquent les taux les plus élevés ($P < 0.001$) avec des teneurs de 402.65, 378.99 et 285.77mg EAG/g d'extrait, respectivement. Par contre, la fraction organique d'hexane a montré le taux le plus faible avec 55.11mg EAG/g d'extrait. D'autre part, trois valeurs importantes en phénols totaux de 130.48, 112.69 et 85.21 mg EAG/g d'extrait ont été enregistrées par la fraction organique de chloroforme, et les fractions aqueuses d'hexane et chloroforme, respectivement.

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Macheix et al., 2005**). Cette propriété est prouvée par nos résultats 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 fractions aqueuses, que dans les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane). Ces résultats rejoignent ceux trouvés dans la littérature pour d'autres plantes (**Sutana et al., 2007 ; Gonzalez et Gonzalez , 2010**). En effet, la richesse des extraits aqueux en polyphénols totaux peut être due à la présence des composés phénoliques riches en groupements hydroxyles (OH) (**Topçu et al., 2007**).

Une étude réalisée par **Chahmi et al. (2015)** a montrée que trois plantes d'*I.viscosa* de différentes régions de Maroc possèdent une teneur en polyphénols varie de 140 à 274 mg EAG/ g d'extrait, quand les solvants d'extraction sont l'éthyle acétate et l'éthanol. Ces valeurs sont inférieures à celle obtenues avec notre plante.

Cette différence trouve probablement son explication dans la différence d'un certains nombres de facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol..., ou bien la période de la récolte, la méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

III-1-2-2- Teneurs en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est estimée par la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), elle est déduite de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine et les valeurs sont exprimées en mg d'équivalent quercétine/ g d'extrait (mg EQ/ g d'extrait). Les résultats sont représentés dans la figure 20.

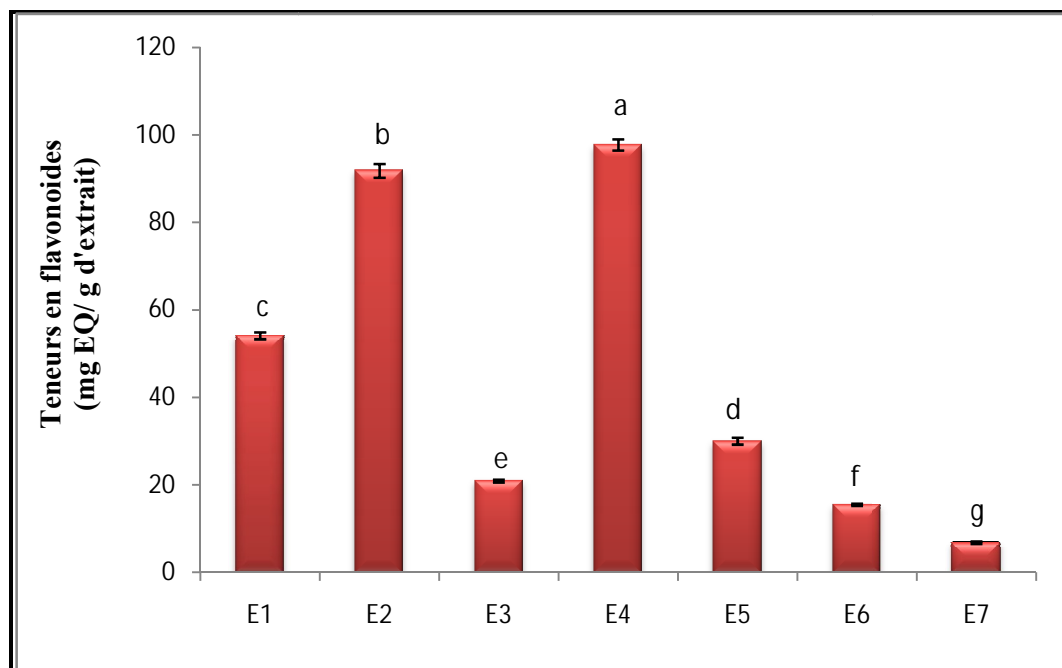


Figure 20: Histogramme des teneurs en flavonoïdes des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa*. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux du chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane.

- 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 > b > c > d > e > f > g

A la première lecture des résultats, nous avons remarqué que les flavonoïdes des extraits de feuilles d'*I.viscosa* sont concentrés principalement au niveau de la fraction organique de chloroforme et acétate d'éthyle avec 97.72 et 91.81 mg EQ/ g d'extrait, respectivement. Suivi par l'extrait éthanolique qui renferme la teneur de 54.09 mg EQ/ g d'extrait. Par ailleurs, les taux les plus faibles sont observés au niveau des fractions aqueuses, acétate d'éthyle, chloroforme et hexane avec des taux de 20.91, 30.01 et 6.8 mg EQ/g d'extrait, respectivement.

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 complexations avec d'autres composés que se soit polaire ou apolaire peut influencer sur leur solubilité (**Macheix, 2005**).

Les résultats de **Chahmi et al. (2015)** ont révélé que l'extrait éthanolique et éthyle acétate d'*I. viscosa* possèdent des teneurs inférieures par rapport à nos résultats. Au regard de

ces données les extraits de notre plante peuvent être considérées comme très riches en polyphénols et en flavonoïdes.

III-1-2-3- Teneurs en tannins condensés

Les taux en tannins condensés dans les extraits de feuilles d'*I. viscosa* sont estimés selon la méthode de la vanilline, en utilisant la catéchine pour établir la gamme d'étalonnage. Les résultats obtenus (figure 21) sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par rapport à gramme d'extraits (mg EC /g d'extraits).

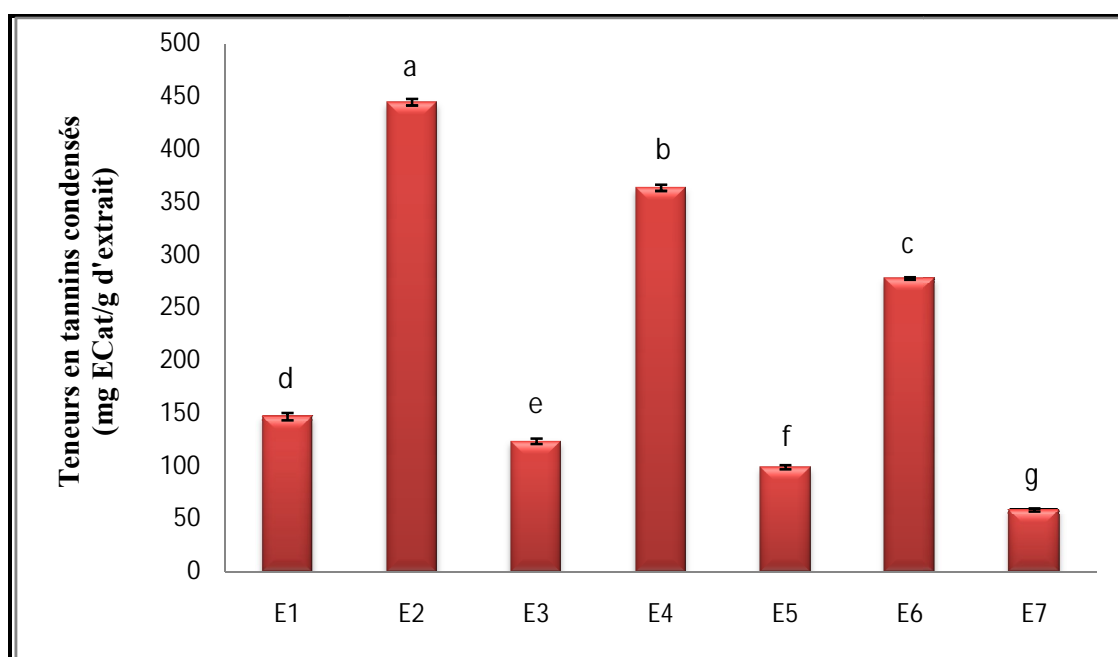


Figure 21 : Histogramme des teneurs en tanins des différents extraits des feuilles d'*Inula viscosa* **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux de chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane.

- 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 ($P < 0.05$).
- $a > b > c > d > e > f$

Comme le montre la figure 21, les tannins condensés d'*I.viscosa* sont concentrés au niveau des fractions organiques, acétate d'éthyle, chloroforme et hexane avec respectivement 444.66, 363.66 et 277.81 mg ECat/g d'extrait ($P < 0.001$), par ailleurs les extraits éthanolique, et les fractions aqueuses, acétate d'éthyle, chloroforme et l'hexane présentent les taux les plus faibles.

A la lumière de ces résultats, on déduit que les fractions organiques présentent des teneurs en proanthocyanidines nettement plus élevées ($P < 0.001$) comparativement aux fractions aqueuses. 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, 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). L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé (Chavan et al., 2001).

III-2- Activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger l'effet antioxydant global d'un extrait d'une source végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Cao et Prior, 1998).

L'activité antioxydante des extraits de feuilles d'*I.viscosa* a été déterminée en utilisant des tests chimiques, par l'évaluation de l'effet scavenger contre le radical hydroxyle (OH[°]) d'une part et l'étude du pouvoir réducteur par la méthode de la capacité antioxydante totale (CAT), d'autre part. La méthode d'inhibition de la peroxydation lipidique a été également utilisée par le test blanchiment du β -carotène.

III-2-1- L'activité antioxydante totale (TAC)

L'activité antioxydante totale (TAC) des extraits d'*I.viscosa* a été évalué à une concentration de 100 μ g/ml et les résultats ont été exprimés, en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAsc / g d'extrait) à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique (Annexe 4). Les résultats sont représentés dans la figure 22:

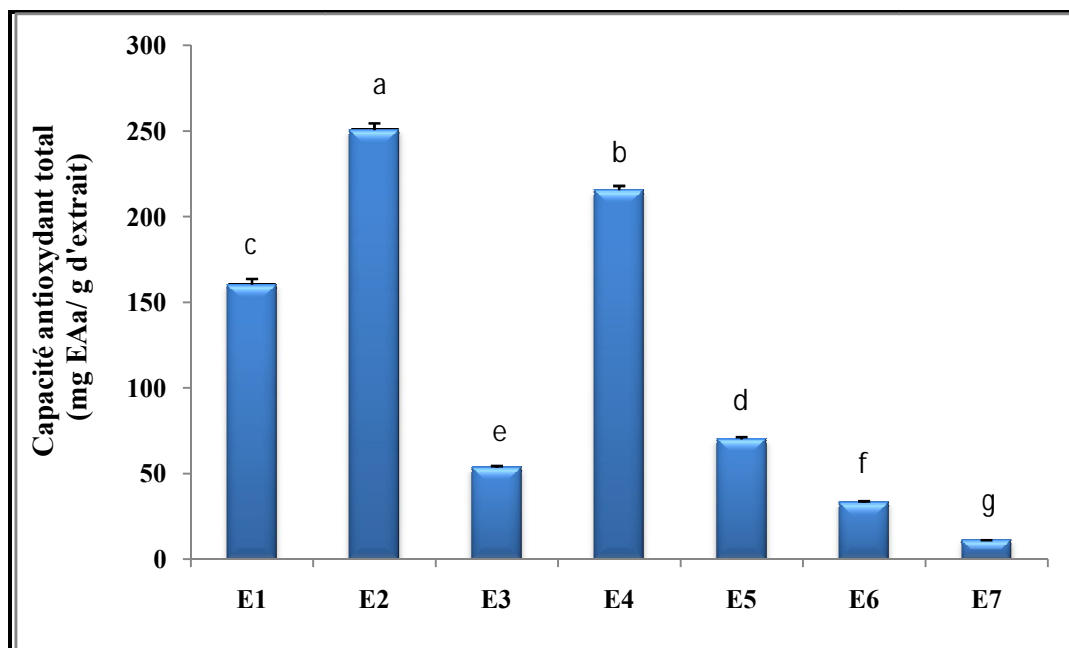


Figure 22 : Histogrammes de l'activité antioxydante totale des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux de chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane.

- 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 ($P < 0.05$).
- $a > b > c > d > e > f$.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits de feuilles d'*I. viscosa* ont exhibé des activités réductrices importantes variant en fonction du solvant utilisé. La fraction organique d'éthyle acétate et de chloroforme possèdent la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 250.46 et de 215.54 mg EAA /g d'extrait, respectivement. L'extrait éthanolique révèle une activité réductrice de l'ordre 160.22 mg EAA /g d'extrait. Les résultats rapportés par **Chahmi et al. (2015)** qui ont appliqué le même principe pour déterminer l'activité réductrice et sur la même partie de la plante étudiée sont inférieurs à ceux trouvés dans la présente étude. En effet, les teneurs élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes pourraient être à l'origine de cette différence. Les activités antioxydantes les plus faibles sont obtenues avec la fraction organique et aqueuse d'hexane (33.14 et 11.04 mg EAA/g d'extrait, respectivement). La différence dans la capacité antioxydante totale d'un extrait à un autre peut être interprété par la capacité des substances à transférer des électrons dans le milieu réactionnel (**Hinneburg et al., 2006**), ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés. Plusieurs études antérieures ont également suggéré l'implication des groupements hydroxyles ou des molécules glycosylées dans la capacité réductrice des extraits de plantes (**Soobrattee et al., 2005 ; Fu et al., 2010**).

III-2-2- Activité scavenging contre radical Hydroxyle

D'après les résultats présents dans la figure 23 on remarque que les extraits de feuilles d'*I.viscosa* ont exhibé de puissants effets scavenging contre le radical hydroxyle à une concentration de 100µg/ml.

Les fractions aqueuses ; acétate d'éthyle, chloroforme et hexane ainsi que l'extrait éthanolique présentent une grande capacité de piégeage du radical hydroxyle avec des pourcentages respectifs de 72.59% ; 69.01%, 58.07% 53.54% et plus élevés que ceux des fractions organiques (43.31% pour l'acétate d'éthyle, 33.68% pour le chloroforme et 29.51% pour la fraction organique d'hexane).

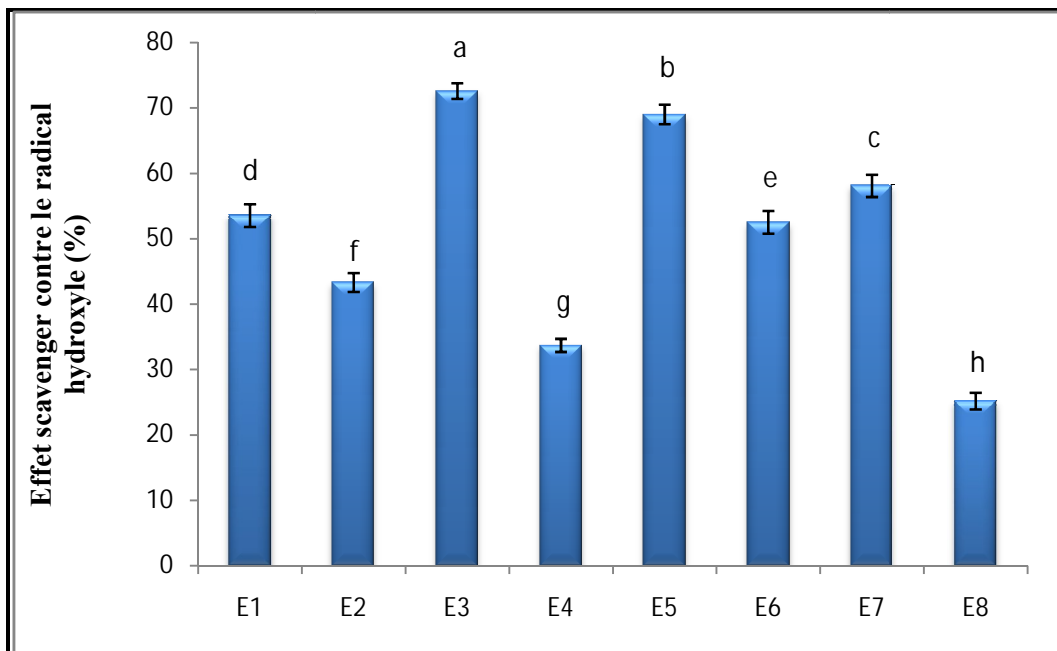


Figure 23: Histogrammes de l'effet scavenger contre le radical OH des extraits d'*I.viscosa* et le standard à 100µg/ml. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux de chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane ; **E8** : Trolox.

- 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 > b > c > d > e > g.

Comparés à la molécule de référence Trolox, tous les extraits de la plante ont exhibé une meilleure activité scavenging du radical OH. L'activité scavenging contre le radical hydroxyle par les extraits de cette plante peut être expliqué par:

- La réduction du radical hydroxyle par ces extraits qui amène à son scavenging.

- La chélation du fer sachant que les métaux comme le fer médiate la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.
- La capacité des phénols à piéger le peroxyde d'hydrogène.

L'activité scavenging du radical hydroxyle par les extraits de plantes médicinales a été attribuée d'une part à leur richesse en composés phénoliques (phénols simples, flavonoïdes et tanins) (Geethae et al., 2009). D'autre part, la nature de ces composés joue un rôle crucial dans l'activité anti-radicalaire des extraits de ces plantes (Balasundram et al., 2006).

La relation activité-structure de l'activité scavenger des extraits des plantes sur le radical hydroxyle a été peu étudiée. Seule une étude faite sur plusieurs standards a montré qu'un procyanidine oligomérique exhibe l'activité la plus élevée suivi par l'épicatéchine (Soobratee et al., 2005). Ceci est en accord avec l'activité anti-radicalaire générale des composés phénoliques. En effet, plusieurs études ont démontré que l'activité anti-radicalaire est dû à la présence de groupements hydroxyles, à la structure moléculaire du composé, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique et à la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène (Chung et al., 2006). Le nombre de groupements hydroxyles attachés aux composés phénoliques, le degré de polymérisation et la présence d'autres fonctions jouent un rôle important dans l'activité anti-radicalaire. En effet pour les flavonoïdes il a été démontré que l'activité augmente avec le nombre de groupement hydroxyles avec la présence de l'insaturation en C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-OXO, pour les tanins la présence de la forme galloyle augmente significativement cette activité (Haenen et al., 2006).

Les fractions aqueuses d'*I.viscosa* doivent contenir des composés polaires qui contiennent les groupements hydroxyles qui sont responsables de l'effet scavenger.

Les IC₅₀ calculées sont rapportées dans la figure 24. Dans le test OH, l'IC₅₀ est la concentration qui correspond à 50% d'inhibition du radical hydroxyle, la valeur la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée et par conséquent une activité anti-radicalaire plus importante (Nakiboglu et al., 2007).

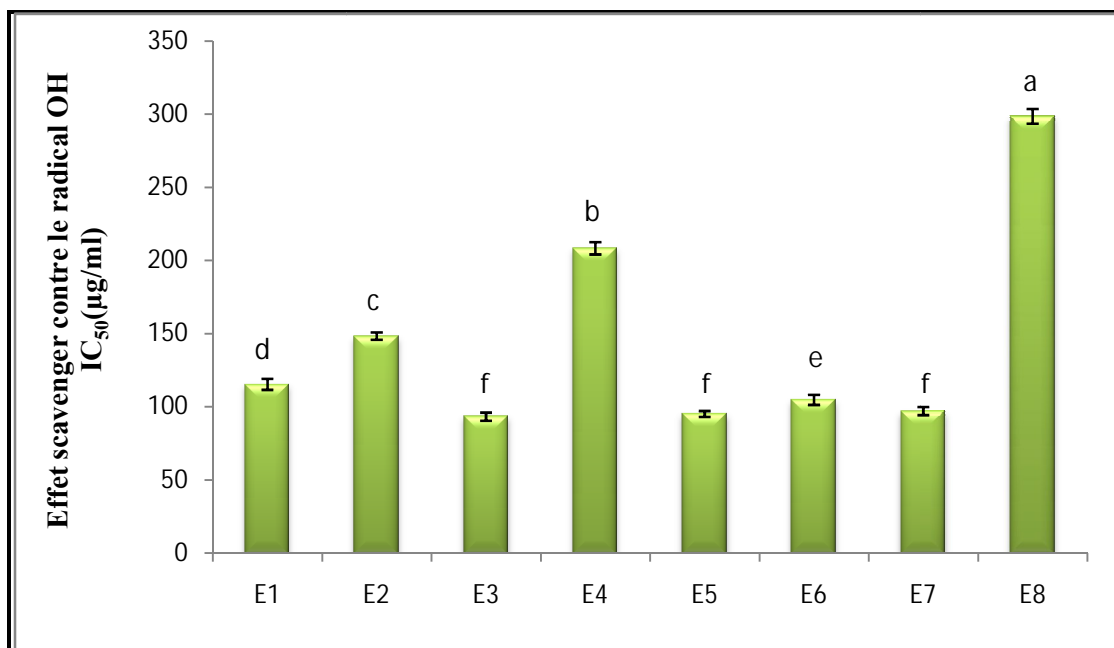


Figure 24: Histogrammes des concentrations inhibitrices à 50 % (IC₅₀%) des extraits d'*I.viscosa* et le standard contre le radical hydroxyle OH. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux de chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane ; **E8** : Trolox.

-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 > b > c > d > e > g.

D'après les résultats rapportés dans la figure 24, les IC₅₀ qui expriment le potentiel anti-radicalaire le plus important sont celles des fractions aqueuses ; d'acétate d'éthyle (93.38µg/ml), de chloroforme (95.21 µg/ml), suivis par celles d'hexane (97.21 µg/ml). Ceci confirme les résultats présentés ci-dessus où on a observé une supériorité des fractions aqueuses d'*I.viscosa*.

III-2-3-Test de blanchissement du β-carotène

La cinétique du blanchissement ou de décoloration du β-carotène en présence et en absence des extraits et des deux molécules de référence (BHT et Rutine), ainsi que les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique sont présentés dans les figures 25 et 26 respectivement.

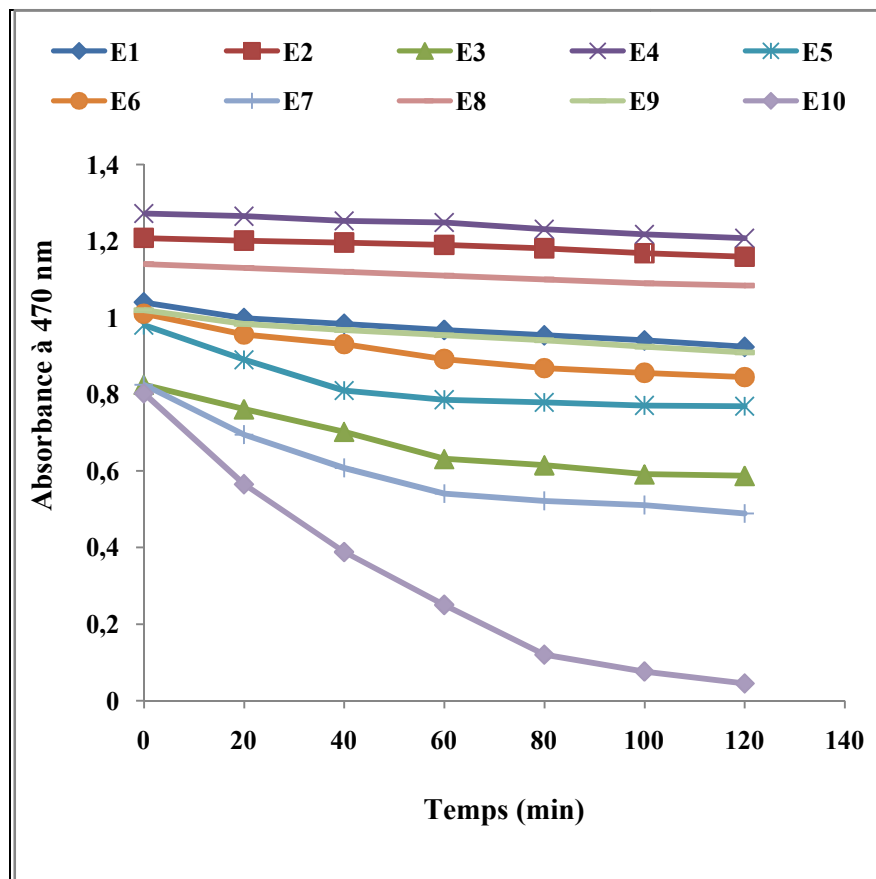


Figure 25 : Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence des extraits d'*I.viscosa* et des standards.

E1 : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux de chloroforme ;
E6 : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane ; **E8** : BHT ; **E9**: Rutine ; **E10** : Control négatif.

- 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 ($P < 0.05$)

- $a > b > c > d > e > g$.

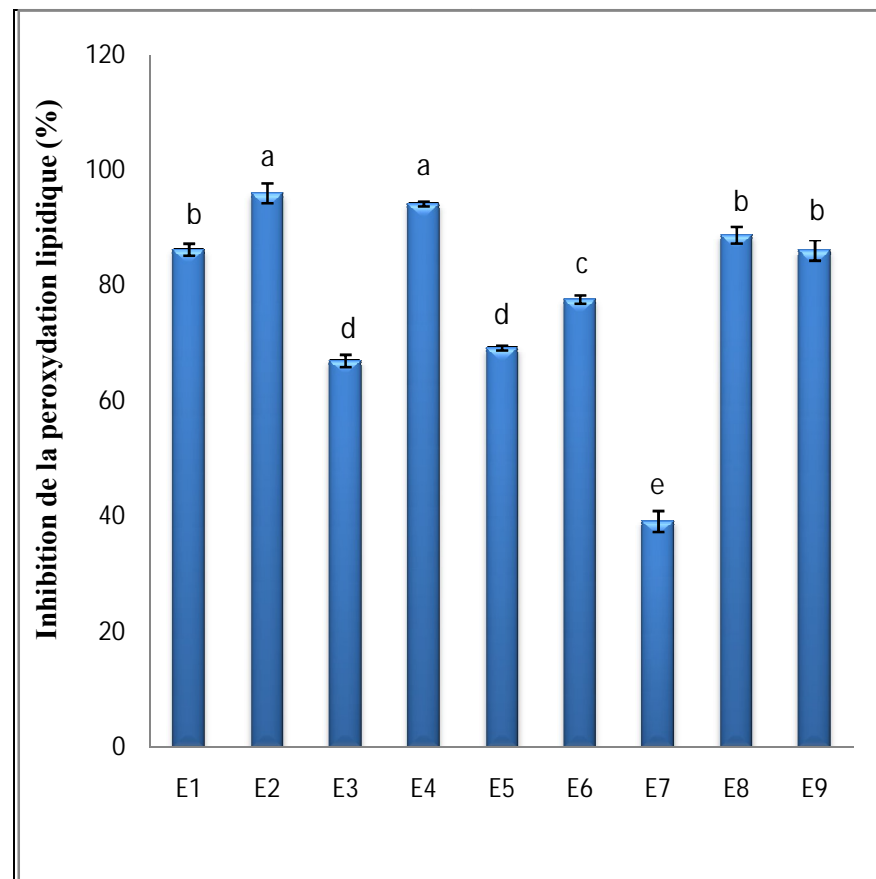


Figure 26 : Histogrammes d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits d'*I.viscosa* et des standards.

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène on remarque que les fractions organiques et l'extrait éthanolique ainsi que le BHT et la rutine exercent un grand effet préventif significatif ($p < 0.01$) contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorbance durant 120 minutes d'incubation. En comparants aux fractions aqueuses, on a remarqué que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse par rapport aux fractions organiques, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle du control, et devient sable à partir 60 min d'incubation. Cet effet retardé par rapport aux fractions organiques pourrait s'expliquer par la nécessité de temps supplémentaire d'insertion des fractions aqueuses dans les micelles.

D'après les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (figure 26), il apparait évident que les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. En effet, la fraction organique d'acétate d'éthyle et celle de chloroforme ont un très grand effet inhibiteur vis-à-vis de radical peroxyde avec des pourcentages de l'ordre de 96.06% et 94.21% respectivement, supérieur à celui du BHT (88.77%) et de la rutine (86.16%), tandis que l'extrait éthanolique ne présente aucune différence significative ($p < 0.05$) par rapport aux deux molécules de références utilisées avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre 86.27%. Une activité intermédiaire est obtenue avec la fraction organique d'hexane (77.63%). Les effets les plus faibles sont obtenus avec les fractions aqueuse d'acétate d'éthyle, aqueuse de chloroforme et la fraction aqueuse d'hexane avec des pourcentages respectifs de 66.98%, 69.23% et 39.16%.

Les résultats obtenus dans ce travail, sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs notamment **Tian et al. (2009)** et **Riaz et al. (2012)** ; où ils ont rapporté que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique par les extraits de plantes varie en fonction du solvant utilisé. Ce résultat est probablement expliqué par la grande spécificité de ce test pour les composés apolaires donc lipophiles (**Gachkar et al., 2007**). Ainsi l'extrait qui contient la quantité la plus élevée en polyphénols ou d'autres composés hydrophobes est le plus actif. L'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de plante *I.viscosa* peut être dû à deux mécanismes : La réduction (transfert d'atome H ou d'électron) des radicaux oxydes et peroxydes par les extraits aqueux, inhibant ainsi les étapes d'initiation (réduction de $RO\cdot$) et de propagation (réduction de $LOO\cdot$). Cependant, l'inhibition de la peroxydation lipidique des

extraits organiques est probablement due à leur effet protecteur de la membrane plutôt que leur activité scavenger contre le radical (LOO[•]).

III-3- Activité anti-inflammatoire

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'*I. viscosa*, trois tests ont été réalisés : le test de cytotoxicité, l'effet anti-hémolytique et l'inhibition de la dénaturation d'albumine sérique humaine.

III-3-1- Etude de cytotoxicité des différents extraits d'*I. viscosa*

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition. Les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ce qui nous a mené d'étudier l'effet cytotoxique, *in vitro*, de cette plante.

L'évolution de l'effet hémolytique est déterminé durant 30 min, dans un milieu isotonique (NaCl 0.9%) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations (50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml) des extraits d'*I. viscosa*, comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de NaCl 0.9% et la suspension érythrocytaire), et un tube témoin positif (hémolyse total provoqué par l'eau distillée). Les résultats du pourcentage d'hémolyse sont représentés dans la figure 27.

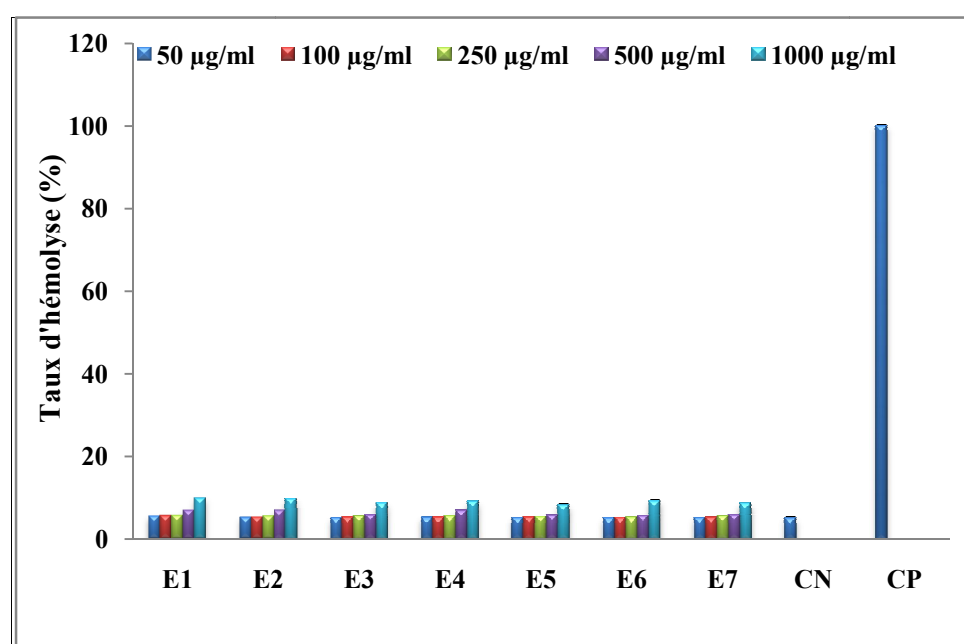


Figure 27: Histogramme des taux d'hémolyse (%) des globules rouges traités avec les différents extraits d'*I. viscosa*. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux du chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane. **CN** : Control négatif ; **CP** : Control positif.

D'après les résultats présentés dans la figure 27, nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de 5% et 6%, par rapport à l'hémolyse total pour les concentrations 50, 100, 250, 500 µg/ml. Ces taux d'hémolyse enregistrés sont non significatifs par rapport au tube témoin négatif (5%), ce qui pourrait s'expliquer par les conditions expérimentales. Cependant, un taux d'hémolyse d'ordre 9% est enregistré à la concentration de 1mg/ml de différents extraits étudiés.

Il apparait là, que les extraits d'*I.viscosa* n'ont presque pas d'effet cytotoxique sur les globules rouges, dont le pourcentage d'hémolyse est inférieur à 10%.

L'observation microscopique des frottis sanguins, n'a pas révélé des différences en termes de morphologie cellulaire entre les différents extraits et le témoin négatif, comme il est montré sur la figure 28. A l'exception, à la concentration 1mg/ml où on remarque quelques cellules hémolysées (Flèches noires) mais elles restent négligeable par rapport aux cellules non hémolysées (Flèches blanches).

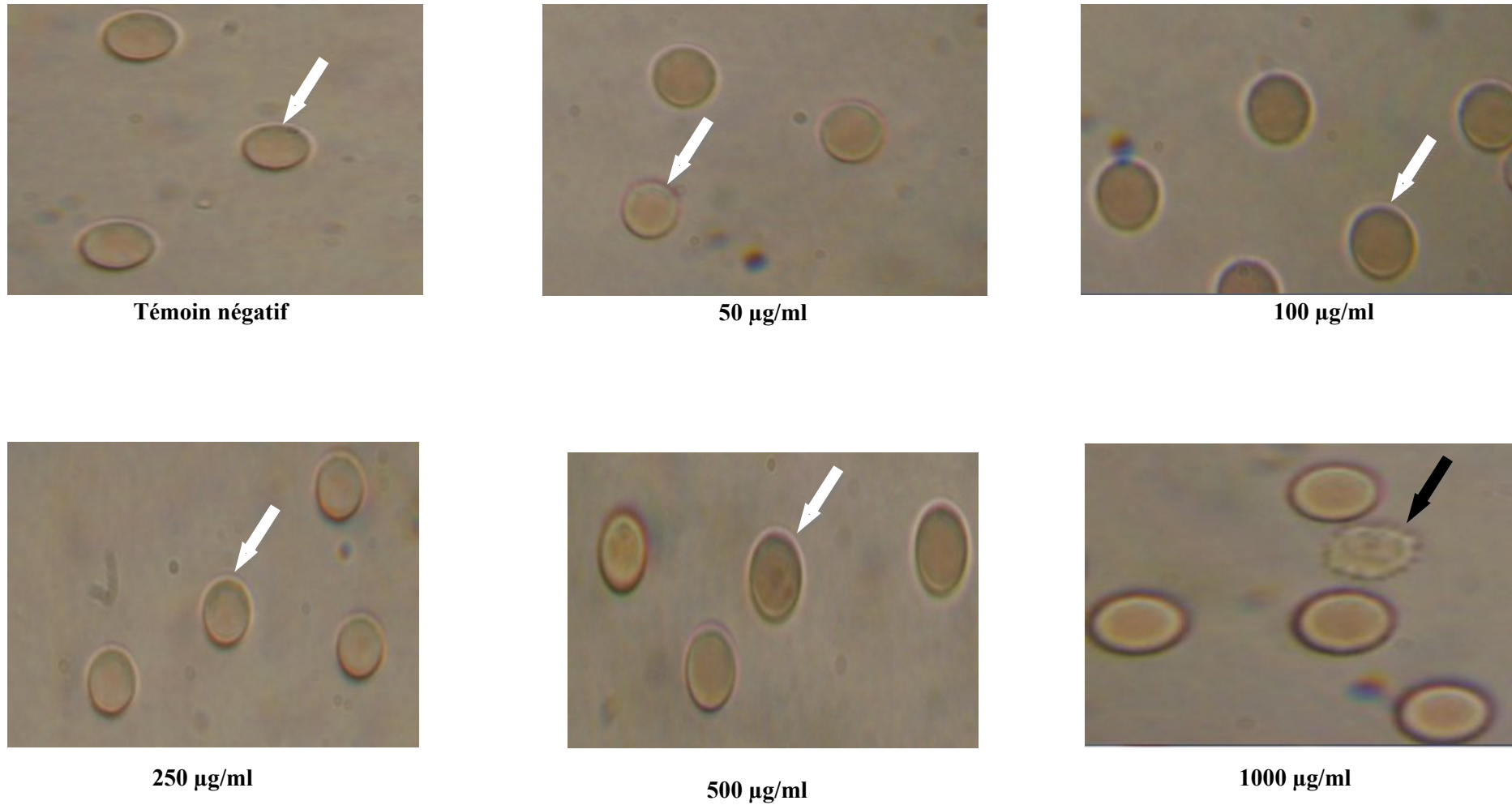


Figure 28 : Photos de globules rouges traitées avec l'extrait éthanolique d'*I.viscosa* et du témoin négatif vu sous microscope optique (GX1000).
Flèche noire : cellule hémolysée ; flèche blanche : cellule non hémolysée.

III-1- Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine

La dénaturation des protéines est un processus au cours duquel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par l'application d'un stress externe tel que la chaleur ou par certains composés comme les acides ou les bases fortes et les solvants. Le mécanisme qui aboutit à cette dénaturation implique probablement une rupture des liaisons disulfures électrostatiques, d'hydrogènes et hydrophobes (Al-Fartosy, 2013 ; Rani et al., 2014).

In vivo les propriétés antigéniques des protéines dénaturées aboutissent à plusieurs maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde et cela par l'expression des antigènes associés à la réaction d'hypersensibilité de type III (Menon et al., 2011).

L'effet des différents extraits d'*I.viscosa* et du standard à 100µg/ml sur l'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique humaine sont représentés dans la figure 29.

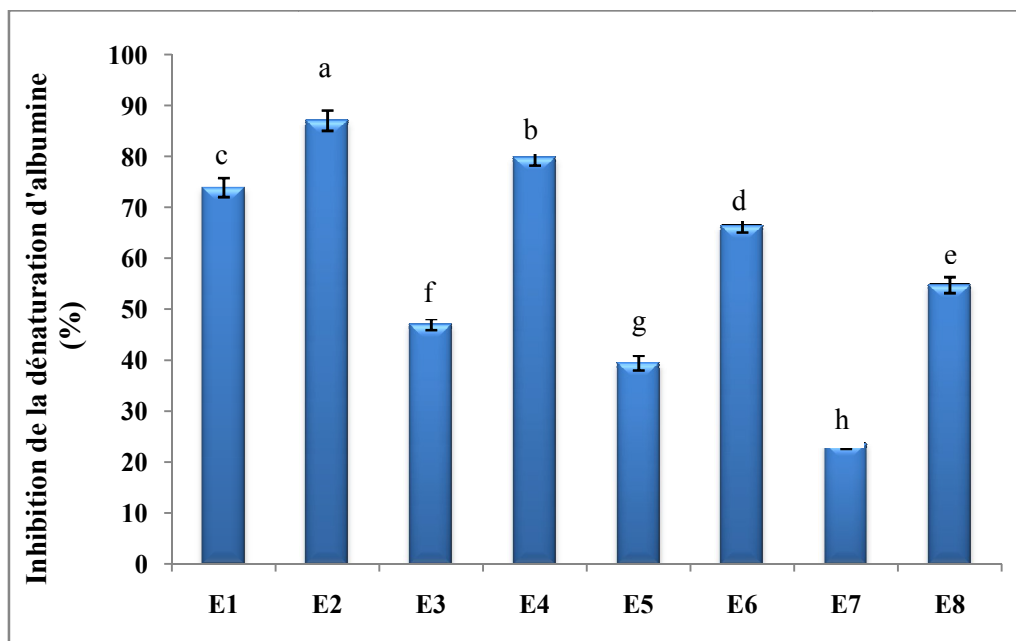


Figure 29 : Histogramme d'inhibition de la dénaturation d'albumine des différents extraits d'*I.viscosa*. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux du chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane ; **E8** : Diclofénac.

- 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 > b > c > d > e > f > g > h.

En examinant les résultats, on constate une très forte inhibition de la dénaturation d'albumine au niveau des fractions organiques. La fraction organique d'acétate d'éthyle et celle du chloroforme marquent les pourcentages les plus élevés de 87.07% et 79.78%, respectivement, suivie par l'extrait éthanolique (73.94%) et la fraction organique d'hexane (66.38%). Les fractions aqueuse d'acétate d'éthyle, aqueuse de chloroforme et la fraction

aqueuse d'hexane ont donné des inhibitions de 47.05%, 39.49% et 23.54%, respectivement. Le diclofenac a donné une inhibition maximale de 54.78% à 100µg/ml, elle est significativement ($p < 0.01$) inférieure à celles obtenues avec les fractions organiques et l'extrait éthanolique, mais elle est significativement inférieure à l'effet donné par les fractions aqueuses.

Al-Fartosy. (2013) a trouvé pour l'extrait de plante *Inula graveolens* rapporté une valeur de 37.83%, celle-ci est relativement faible à celle trouvée pour notre plante.

Cet effet anti-dénaturant serait dû à l'interaction des molécules présentes dans les extraits de plante avec les constituants protéiques de l'albumine sérique humaine, ces interactions se feraient aux niveaux de deux sites spécifiques : des tyrosines aromatiques et les chaînes aliphatiques riche en thréonine et en résidus lysine (**Williams et al., 2008**).

La production ou l'apparition des auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être dû à la dénaturation des protéines *in vivo*. Les agents qui peuvent empêcher la dénaturation de protéine donc, seraient de bon candidats pour le développement de drogue anti-inflammatoire (**Chandra et al., 2012**).

Vue les résultats qu'on a obtenu, on peut spéculer que nos extraits peuvent inhiber la formation d'auto-antigène par inhibition de la dénaturation des protéines et de ce fait ils inhibent la formation d'auto-anticorps observés dans les maladies auto-immunes.

III-3-3 - Résistance au stress oxydatif induit par l'AAPH

Les globules rouges renferment beaucoup d'acides gras insaturés, de l'oxygène moléculaire et des ions ferreux à l'état ligand, ce qui rend ces cellules plus vulnérables au stress oxydant (**Mohandas et Gallagher, 2008**). Lorsque les érythrocytes sont soumis à un stress oxydatif, les radicaux libres conduits à la formation des pores hémolytiques dans la membrane cellulaire. Ces altérations membranaires se traduisent par une fuite de potassium aux milieu extracellulaire et par conséquent une hémolyse cellulaire (**Bureau et al., 2005**). Cependant, les hématies possèdent un système antioxydant efficace qui les rend exceptionnellement résistants à la peroxydation quand des radicaux libres sont produits à l'intérieur cellulaire à des taux physiologiques (**Çimens et al., 2008**).

Nous nous sommes particulièrement intéressés dans le présent travail à évaluer l'effet protecteur que pourraient avoir les composés phénoliques d'*I.viscosa* sur la préservation de

l'intégrité cellulaire. Cette protection est étudiée en évaluant l'hémolyse en présence d'une source exogène d'AAPH. Ce dernier est largement utilisé en tant que initiateur du stress oxydatif dans les études biologiques. Il peut se décomposer thermiquement dans les milieux aqueux à une température physiologique pour produire des radicaux peroxydes, initiant la peroxydation lipidique provoquant ainsi la déstabilisation membranaire (Gilcà *et al.*, 2009).

La figure 30 montre les pourcentages d'inhibitions d'hémolyse des différents extraits d'*I.viscosa* et des standards à 100 µg/ml en fonction du temps. On peut constater que le sang traité par les extraits polaires et les fractions aqueuses présentent une meilleure résistance du globule rouge au stress oxydatif induit par l'AAPH.

Cet effet protecteur à l'égard de l'intégrité cellulaire s'exprime déjà à T_0 et reste maintenu durant les 2 heures d'analyse. Les fractions aqueuses de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'hexane donnent une protection d'ordre de 75.77%, 63.39%, et 64.58% respectivement, elle est supérieure à celle du Trolox (48.51%).

Quant à l'effet de la vitamine C, il s'exprime à T_0 et T_1 heures avec des pourcentages d'inhibition qui reste supérieures à celles obtenues avec le sang traité avec l'AAPH. A T_2 heures, le taux d'hémolyse restent proches entre ces deux échantillons (vitamine C et AAPH). Les effets les plus faibles sont obtenus avec les fractions organiques d'acétate d'éthyle, de chloroforme et d'hexane avec des pourcentages respectifs de 48.84%, 53.10% et 42.64%, mais ils sont supérieurs à celles du sang traité par les standards. Cependant cette différence ne s'exprime pas à T_0 comme pour les extraits aqueux et ne commence à être visible qu'à partir de T_1 . Cet effet retardé par rapport aux fractions aqueuses pourrait s'expliquer par la nécessité de temps supplémentaire à l'action des fractions organiques pour mieux stabiliser la membrane cytoplasmique. Le caractère hydrophobe des extraits organiques pourrait être l'origine de ce retard. Plus précisément, les fractions aqueuses devraient donc avoir une plus grande faculté à franchir la membrane plasmique des cellules afin de réduire les dommages causés par l'attaque radicalaire sur les érythrocytes (Jensen *et al.*, 2008).

Les résultats du présent travail obtenus après l'ajout de l'AAPH sont en accord avec ceux obtenus par d'autres travaux (Martínez *et al.*, 2012 ; Ramchoun *et al.*, 2015) ; les extraits de plantes sont efficaces sur la protection des globules rouges humaines contre l'hémolyse induit par l'AAPH.

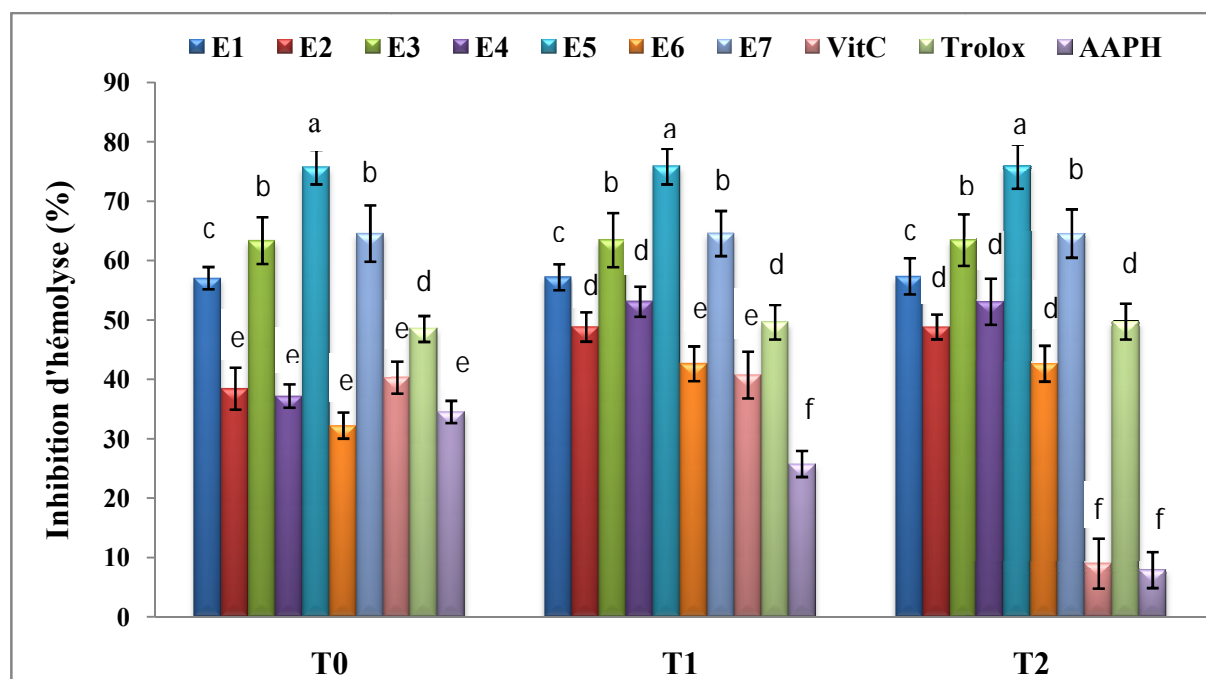


Figure 30: Histogrammes des effets protecteurs des globules rouges humains contre l'hémolyse induit par l'AAPH en fonction des temps d'analyse des échantillons étudiés. **E1** : Ethanol ; **E2** : Acétate d'éthyle ; **E3** : Aqueux d'acétate d'éthyle ; **E4** : Chloroforme ; **E5** : Aqueux du chloroforme ; **E6** : Hexane ; **E7** : Aqueux d'hexane. Standards ; **VitC** : Vitamine C ; **Trolox** ; **AAPH** : sans présence des extraits et des standards. -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 ($P < 0.05$). - $a > b > c > d > e > f > g > h$.

Il est important de noter que l'efficacité des antioxydants à piéger les radicaux libres est hautement liée aux propriétés physico-chimiques. L'acide ascorbique étant une molécule hydrosoluble comme les extraits aqueux, mais il est incapable d'inhiber la peroxydation lipidique de la membrane érythrocytaire. La raison pour la quelle l'acide ascorbique à lui seul ne protège pas les globules rouges peut être aussi expliquée par son activité prooxydante (**Carr et Frei, 1999**).

Les résultats obtenus semblent donc aller dans le sens d'une meilleure protection du globule rouge par les extraits de feuilles d'*Inula viscosa*. Cette protection pourrait être attribuée à la richesse de cette plante en polyphénols notamment les flavonoïdes.

Il a été rapporté récemment (**Martínez et al., 2012 ; Ramchoun et al., 2015**), que les flavonoïdes interagissent avec les têtes polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes. Ces composés peuvent par conséquence s'accumuler à la surface membranaire du côté extra et intra cellulaire. Par cette interaction ces flavonoïdes pourraient agir sur le maintien de l'intégrité membranaire en réduisant l'accès aux molécules délétères à la double région hydrophobe.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de la mise en évidence de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre les effets néfastes du stress oxydant, nous nous sommes intéressés à la recherche de substances naturelles issues de plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle Algérienne. Les feuilles d'*Inula viscosa* L. ont fait l'objet d'une étude détaillée, aussi bien sur le niveau phytochimique (teneurs en substances actives et pouvoir antioxydant) que sur le niveau cellulaire (effet protecteur du globule rouge contre l'hémolyse) mais aussi sur le niveau moléculaire (inhibition de la dénaturation d'albumine).

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Dans notre étude, nous avons choisi un protocole d'extraction basé sur l'utilisation de plusieurs solvants de polarité décroissante, afin de distribuer les constituants de chaque extrait selon leur polarité.

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et en tanins condensés. Les résultats obtenus nous ont révélé que la plante *I. viscosa* constitue une source prometteuse en polyphénols. Les résultats obtenus pour l'évaluation globale des teneurs des extraits en ces composés indiquent qu'ils sont plus concentrés dans l'extrait organique polaire (acétate d'éthyle) et dans les fractions aqueuses, que dans les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane). Les résultats de dosage 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 (97,72 mg EQ /g d'extrait). Cependant le dosage des tanins condensés a montré que ces composés sont concentrés au niveau des fractions organiques, acétate d'éthyle, chloroforme et hexane avec respectivement 444.66, 36.66 et 277.81 mg EC /g d'extrait ($P < 0,001$).

Les différents tests d'activité antioxydante ont montré que les extraits d'*I. viscosa* possèdent des propriétés antioxydantes très intéressantes vis-à-vis de toutes les techniques testées, elles varient en fonction du solvant utilisé et du test considéré. En effet, la capacité antioxydante totale est plus importante dans les fractions organiques, d'acétate d'éthyle et de chloroforme (250.46 et 215.46 mg EAA /g d'extrait, respectivement), alors que pour l'activité scavenger à l'égard du radical hydroxyle c'est plutôt les fractions aqueuses, d'acétate d'éthyle et de chloroforme qui présentent une grande activité antioxydante avec des pourcentages

respectifs de 72,59% ; 69,01%. Par contre, dans le système émulsifiant acide linoléique/ β -carotène, les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation du β -carotène. En effet, la fraction organique d'acétate d'éthyle et celle de chloroforme ont un très grand effet inhibiteur vis-à-vis de radical peroxyde avec des pourcentages de l'ordre de 96,06% et 94,21% respectivement, supérieur à celui du BHT (88,77%) et de la rutine (86,16%).

Dans le but d'explorer l'effet d'*I.viscosa* sur les hématies humaines, l'incubation de ces dernières avec les différents extraits de cette plante à des concentrations allant de 50 à 500 $\mu\text{g/ml}$, n'a entraîné aucun effet cytotoxique sur les globules rouges dont l'intégrité cellulaire est maintenue. Cependant un taux d'hémolyse (9%) est enregistré à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$, mais il reste négligeable. D'autre part, nous avons étudié l'effet anti-hémolytique que pourraient avoir les composés phénoliques d'*I.viscosa* sur la préservation de l'intégrité cellulaire. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de feuilles de cette plante peuvent protéger les globules rouges contre le stress oxydant induit par l'AAPH.

Dans un second temps, nous avons évalué également l'activité anti-inflammatoire des différents extraits sur une molécule protéique du vivant « Albumine ». Les résultats obtenus montrent que tous les extraits sont aussi capables d'empêcher la dénaturation de l'albumine.

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 et anti-inflammatoire, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement des divers maladies. 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 :

- D'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* par d'autres tests complémentaires tels que le dosage des marqueurs du stress oxydant.
- 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.
- D'étudier la toxicité aigüe et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de pouvoir vérifier les propriétés biologiques, de cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

Références bibliographiques

- **Akinwunmi, K.F., Oyedapo, O.O. (2015).** *In vitro* Anti-inflammatory Evaluation of African Nutmeg (*Monodora myristica*) Seeds . *European Journal of Medicinal Plants*, 8(3): 167-174.
- **Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmacology*,J. 21:143–152.
- **Al-Fartosy, A.J.M. (2013).** Some pharmacological studies on the methanolic extract of *Inula graveolense* L. *J. Biomedical Science and Engineering*, 6: 1040-1049.
- **Andriichuk, A., Tkachenko, H et Tkachova, I. (2016).** Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*, 36 : 32-43.
- **Anosike, C.A., Obidoa , O., Ezeanyika, L.U. (2012) .** Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*) . *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* .20:76.
- **Aronson, J.K. (2016).** Meyler’s Side Effects of Drugs, the International Encyclopidia of Adverse Drug Reaction and Interaction. 16ème édition. Elsevier Science. p : 729 -734.
- **Baba Aissa, F. (2000).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d’Algérie et du Maghreb. Ed ; Librairie moderne Rouiba. 252-253.
- **Balasundram, N., Sundram, K. et Samman. S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99:191–203.
- **Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: Etat des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 :48-53.

- **Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P. (2015).** Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76:604–615.
- **Bssaibis, F., Gmira, N. et Meziane, M. (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* W. Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 3(1) :44-45.
- **Bureau, A., Lahet, J.J., Lenfant, F., Bouyer, F., Petitjean, M., Chaillot, B., Freysz, M. (2005).** Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomed.Pharmacother.* 59:341–344.
- **Cao, G. et Prior, R.L. (1998).** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44(6):1309-15.
- **Carr et Frei, (1999).** Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 13(9):1007-24
- **Chahmi, N., Anissi, J., Jennan, S., Abdellah, F., Sendide, K., El Hassouni, M.(2015).** Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco . *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3): 228-233.
- **Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., Bhattacharya, S. (2012).** Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S178-S180
- **Chavan, U. D., Shahidi, F. et Naczk, M. (2001).** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75: 509–512.
- **Cheynier, V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 223S-229S.
- **Chiang, H., Wen, P., Lu, F. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *alsophila spinulosa* (Hook) tryon. *Journals of Enzym Inhibition*, 8 (1):61-71.

- **Chung, Y., Chien, C., Teng, K. et Chou, S. (2006).** Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food Chemistry*, 97: 418-425.
- **Cia, H., Huang, X., Xu, S., Shen, H., Zhang, P., Huang, Y., Jiang, J., Sun, Y., Jiang, B. et al. (2016).** Discovery of novel hybrids of diaryl-1,2,4-triazoles and caffeic acid as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase for cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* .108:89-103.
- **Çimen, M.Y.B. (2008).** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390 (1-2) : 1-11.
- **Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Munoz, F., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V. (2007)** . Anti inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal Ethnopharmacology* , 112 (3):585-9.
- **Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. et Anelli, G. (2008).** Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110(3):659-669.
- **Costa, D., Capuano, M., Sommese, L. et Napoli, C. (2015).** Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 55 : 95–100.
- **Cowan, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) : 564–582.
- **Danino, O., Gottlieb, H.E., Grossman, S. and Bergman, M. (2009).** Antioxidant activity of 1,3- dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Res. Int.*, 42: 1273-1280.
- **Dave, S. et Bansal, N. (2013).** Analgesic and anti-inflammatory activities of schiff base metal complexes -a review. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*, 3 (1) 31-40.

- **Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. et Bekhradnia, A.R. (2008).** Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7 (18) : 3188-3192.
- **Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. et Guo, Z. (1985).** Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63 (6): 965-981.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64: 390-396.
- **Filaire, E., Toumi, H. (2012).** Rôle des dérivés réactifs de l’oxygène et de l’exercice physique sur le métabolisme osseux : amis ou ennemis ? *Revue du rhumatisme* 79 : 387–392.
- **Franco, T. et Low, P. S. (2010).** Erythrocyte adducin: A structural regulator of the red blood cell membrane. *Transfusion Clinique et Biologique*, 17 : 87–94.
- **Fu, L., Xu, B.T., Xu, X-R., Qin, X-S., Gan, R-Y. et Li, H-B. (2010).** Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of 56 Wild Fruits from South China. *Molecules*. 15 : 8602-8617.
- **Fuchs, J., et Packer, L. (2005).** Environmental Stressors in Health and disease : Tyler et francic e-libray.
- **Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh S.A., Rasooli, I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*, 102: 898-904.
- **Gammoudi , I., Dandana, A., Chahed , H., Ferchichi ,S., Ernez , S., Miled , A. (2013).** Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 28:39-42.
- **García-Becerra., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A et María, P.V. (2016).** Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, 194 : 1081-1088.

- **Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. et Fernández-Gutiérrez, A. (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15 : 8813-8826.
- **Gaussen, H., Deuroy, J.F. et Ozenda, P. (1982).** Précis de botanique II « les végétaux supérieurs ». Ed : Masson. 215-408.
- **Geetha, T., Rohit, B. et Pal, K.I. (2009).** Sesamol: An Efficient Antioxidant with Potential Therapeutic Benefits. *Medicinal Chemistry*, 5 : 367-371.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- **Gilcà, M., Stoian, I., Lixandru, D., Găman, L., Vîrgolici, B., Atanasiu, V.(2009).** Protection of erythrocyte membrane against oxidative damage by geriforte in healthy human subjects. *Romanian journal of internal medicine*, 47(3)289–295.
- **Gonzalez, M. et Gonzalez, V. (2010).** Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *The Royal Society of Chemistry*, 2, 1842–1866.
- **Grazul, M. et Budzisz, E. (2009).** Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones. *Coordination Chemistry Reviews*, 253 :2588–2598.
- **Guignard, J.L. (2001).** Botanique, Systématique moléculaire. Ed. MASSON, Paris. 100 -272.
- **Haenen, G.R.M.M., Arts, M.J.T.J. A.Bast, A. et Coleman, M.D. (2006).** Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoïds. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12(2) : 191-198
- **Halliwell, B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52 : 253-265.
- **Halliwell, B. (2009).** The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 46 : 531–542.

- **Hernández, V., Recio, C.M., Máñez, S., Giner, R.S et Ríos, 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.
- **Hinneburg, H.J. Dorman, D. et Hiltunen, R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97 : 122–129.
- **Jensen, F. B. (2008).** Nitric oxide formation from the reaction of nitrite with carp and rabbit hemoglobin at intermediate oxygen saturations. *FEBS J.* 275,3375 -3387.
- **Ji, H-F., Li, X.J. et Zhang, H-Y. (2009).** Natural products and drug discovery. *European Molecular Biology Organization reports*.10(3) : 194-199.
- **Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H .J., Rauha , J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. (1999).** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- **Kalaiselvi, V. et Vidhya, R. (2015).** *In-vitro* membrane stabilizing activity of different extracts of *bahinia tomentosa* (L.) Leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(4) : 1700-1715.
- **Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009)** .Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41–60.
- **Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J., Traore, A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 823-828.
- **Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Fale, P., Lino , A.R.L., Serralheiro , L.M.L., Araujo, M.E.M. (2010).**Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Science and Technology* ,43 :331–336.

- **Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. et Kang S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96(3) : 229 – 245.
- **Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y. et Soro, S. (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 5 (3) : 550-558
- **Lay, S.L., Simard, G., Martinez, M.C. et Andriantsitohaina, R. (2014).** Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 908539 : 1-18.
- **Lee, J.W. et Davis, J.M. (2012).** Future Applications of Antioxidants in Premature Infants. *Institutes National of Health*, 23(2) : 161-166.
- **Lemke, T.L., et williams, D.A. (2013).** *Foye's Principal of medicinal Chymistry* : Lippincott Williams et wilkins .
- **Li, H.T., Feng, L., Jiang, W. D., Liu,Y., Jiang, J., Li.S.H et Zhou, X.Q.(2013).** Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: Protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline. *Aquatic Toxicology*, 126 : 169–179.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay–Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes.
- **Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., Baiti, I. (2015).** Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. (In press).
- **Maksimović, Z., Maleni, D., Kovacević, N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8) : 873 - 877.

- **Mamoci, E., Cavoski, I., Andres, M.F. et Díaz, C.E. (2011).** Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and *Ferula communis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43 : 101–107.
- **Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pognas, J.L. et Perrin, C. (2016).** Hemolysis by surfactants- A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228 :1-16.
- **Martínez, V., Ugartondo, V., Vinardell, M. P., Torres, J. L., & Mitjans, M. (2012).** Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:4090-4095.
- **Mazurier, C et Douay, L. (2013).** Production de globules rouges dans un but transfusionnel ou l'itinéraire ex vivo d'une cellule souche. *Transfusion Clinique et Biologique*, 20 : 90-94.
- **Medzhitov, R. (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *NATURE*, 454 : 424-435.
- **Menon,D.B., Sasikumar, J. M., Latha, K.(2011).** Anti- inflammtory and cytotoxic activity of methanolic extract of *Plectranthus hadiensis* stem. *Pharmacologyonline* , 3: 275-282.
- **Mizushima, Y. et Kobayashi, M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins,especially with some biologically active proteins, *Journal of Pharmcy and Pharmacology*. 20(1): 169-173.
- **Mohandas, N. et Gallagher, P. G. (2008).** Red cell membrane : past, present, and future. *blood*, 112 : 3939-3948.
- **Mossa, A-T. H., Heikal, T.M, et Mostafa Mohamed Mohafrash, S. (2014).** Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2): S603-S609.
- **Nakiboglu, M., Urek, O.R., Kayal, A.H. and Tarhan, L. (2007).** Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. *Food Chemistry* 104: 630-635.

- **Neupane, P.D., Majhi, S., Chandra, L., Rijal, S. et Baral, N. (2008).** Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(1) : 95-97.
- **Niki, E. (2014).** Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine* .66: 3–12.
- **Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., Mhamdi, A. (2015).** The metabolomics of oxidative stress . *Phytochemistry* .112 : 33–53.
- **Okoko, T. et Ere, D. (2012).** Antioxidant activities of *Solenostemon monostachyus* leaf extract using *in vitro* methods. *Scientific Research and Essays*, 7(6):621-626.
- **Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R.W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., Dijoux, M.G., Guissou, I.P. (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*. 10:286–292.
- **Parolin, P., Scotta, M.I. et Bresch, C. (2014).** Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant: a review. *Revista internacional de botânica experimental*, 83: 251-262.
- **Pisoschi, A.M et Pop, A. (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97 :55-74.
- **Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J. et Lekeux, P. (2007).** Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 151 : 101-106.
- **Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269 : 337–341.

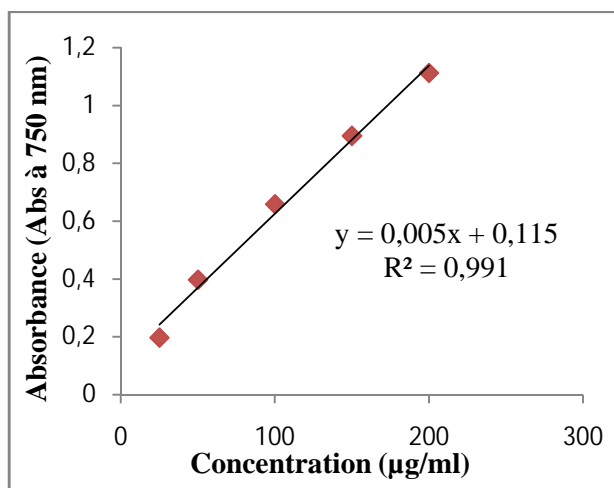
- **Prior, R . (2015).** Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants / bioactives and health benefits. *journal of functional foods* .18 : 797–810.
- **Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Khallouki, F., Amrani, S.(2015).** Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2):93-100.
- **Rani, A.A., S. Mary Josephine Punitha, S.M.J., Rema. M. (2014).** Anti-inflammatory activity of flower extract of *cassia auriculata* – an *in-vitro* study. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)*, 4(1):57-60.
- **Rates, S.M.K. (2001).** Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39 : 603–613
- **Riaz1, T., Abbasi, M.A., Rehman, A.U., Shahzadi, T., Ajaib, M. and Khan, K.M. (2012).** Phytochemical screening, free radical scavenging, antioxidant activity and phenolic content of *Dodonaea viscosa* Jacq. *Journal of the Serbrian Chemical Society*, 77 (4) 423–435.
- **Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In « Les composés phénoliques des végétaux ». Ed. Dunod. 1-27.
- **Richard, D., Girand, N., Pradere, F., Chevalet, P. et Soubaya, T. (2010).** Biologie Licence tout les cours en fiches. 1ère édition. DUNOD. Paris. Page : 200-202.
- **Roy, S., Bagchi, D., Raychaudhuri, S.P. (2013) .** Chronic inflammation : Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions : CRC PRESS.
- **Rozenbelt, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y. (2008).** Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem Pharmacology* ,7 :369–382.
- **Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y. et Dovrat, S. (2008).** Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical pharmacology*, 75:369 – 382.

- **Russo-Marie F, Peltier A, Polla B. (1998).** L'Inflammation. John Libbey Eurotext, Paris. p.565.
- **Seca, A.M.L., Grigore, A., Pinto, D.C.G.A. Silva, A.M.S. (2014).** The genus *Inula* and their metabolites : From ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of Ethnopharmacology*. 154 : 286 - 310.
- **Sharma, P., Bhushan, A., Dubey, J. R. S. and Pessarakli, M . (2012).** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, pp: 1-26.
- **Sharma, V. et Singh, M. (2013).** *In vitro* antiarthritic and hemolysis preventive: membrane stabilizing efficacy of ethanolic root extract of *operculina turpethum*. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 2(1) : 302-312.
- **Silva, D.G., Junior, E.B., Alves de Almeida, E., Bonini-Domingos, C.R. (2013).** Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radical Biology and Medicine* .65:1101–1109.
- **Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M. et al.(2005).** A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chem. Toxicol*, 43: 345–363.
- **Soobrattee, M.A., Bahorun, T., Neergheen,V.S., Googoolye, K. et Aruoma, O.I. (2008).** Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicol in vitro*, 22: 45-56.
- **Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. et Bahorun, T., (2005).** Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200–213.

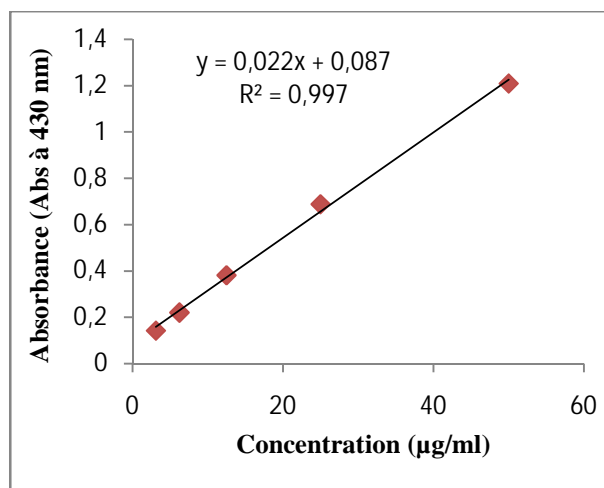
- **Sowemimo - coker, S.O. (2002).** Red Blood Cell Hemolysis During Processing. *Transfusion Medecine Reviews*, 16(1) : 46-60.
- **Sultana, B., Anwar, F. et Przybylski, R. (2007).** Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. *Food Chemistry*, 104(3) : 1106–1114.
- **Sun, B., Richardo-da-Silvia, J.M., Spranger, I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Agric. Food Chem.* 46 :4267–4274.
- **Thinagaran, R et Dharman, M. (2014).** Phytochemical Screening and *in-vitro* Anti-inflammatory Activity of *Trigonella foenum-graecum* Leaves Extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 26 (2) 157- 161.
- **Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y. and Luo, Y. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*. 113 : 173–179.
- **Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sariürkcü, C., Oztürk, M. et Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816–822.
- **Toro, J. et Rodrigo, R. (2009).** Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease. *Oxidative Stress: Basic Overview*. Nova Science Publishers, Inc.
- **Virginie, G., Espérance, M.S., Guévara, N., Reine, B-A.G. S., Pascal, A.D. C. et Dominique, S.C.K. (2015).** Etude chimique et évaluation de l’Influence de la granulométrie sur la cinétique d’extraction des polyphénols naturels de *Pterocarpus erinaceus* acclimaté au Bénin. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 12 (2) : 325-333.
- **Wang, W., Ben-Daniel, B.H. et Cohen, Y. (2004).** Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*. *The American Physiological Society*, 94 (10): 1042-1047.
- **Williams, L.A.D, Connar, A.O., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., Kraus, W. (2008).** The in vitro anti-denaturation effects

induced by natural products and non steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J*, 57: 327–331.

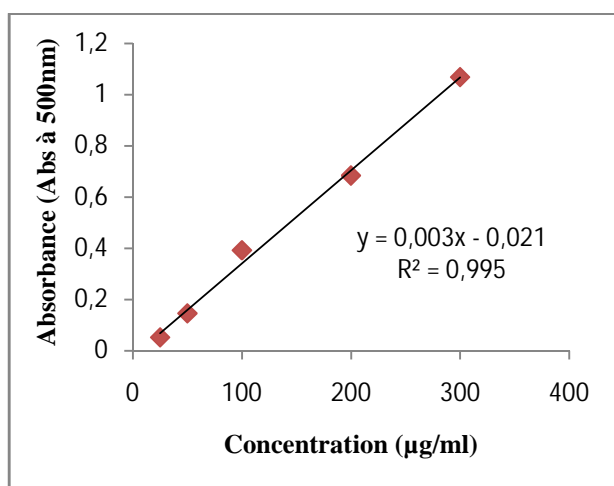
- **Yuan, X., Wang, J. et Yao, H. (2005).** Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, 90(4) : 759–764.
- **Zhang, J., Li, Y, Chen, S-S., Zhang, L., Wang, J., Yang, Y., Zhang, S., Pan, Y., Wang, Y et Yang, L. (2015).** Systems Pharmacology Dissection of the Anti-Inflammatory Mechanism for the Medicinal Herb *Folium Eriobotryae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 : 2913-2941.
- **Zhang, Y., Giboulot, A., Zivy, M., Valot, B., Jamet, E., Albenne, C. (2011).** Combining various strategies to increase the coverage of the plant cell wall glycoproteome. *Phytochemistry Elsevier*, 72 (10):1109-23.
- **Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Gross, H.B., Holt, R.R., Kim, S.H., Yamaguchi, T., Kwik-Uribe, C. L. et Keen, C.L. (2005).** Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clinical & Developmental Immunology*. 12(1): 27–34.
- **Ziltener, J.-L., Leal, S., Fournier, P.-E. (2010).** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: An update. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*. 53: 278–288.



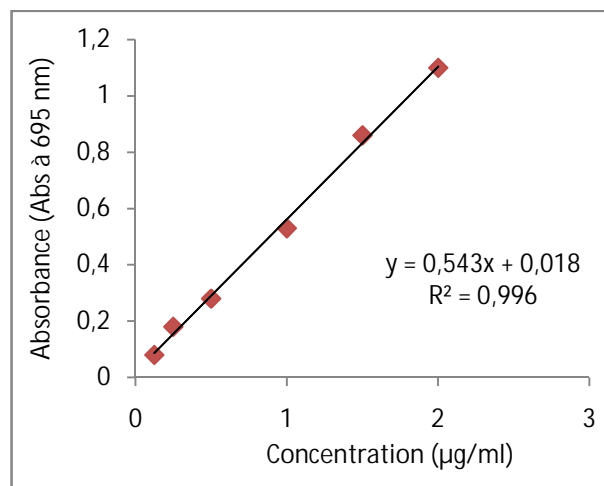
Annexe n°1 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



Annexe n°2 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.



Annexe n°3 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des tannins condensés.



Annexe n° 4 : Courbe d'étalonnage avec l'acide ascorbique pour l'activité antioxydante totale.

Résumé

Les extraits naturels des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. Ce travail a pour but de déterminer le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro* des extraits organiques et aqueux préparés à partir des feuilles d'*Inula viscosa*. Le criblage préliminaire basé sur des tests spécifiques a révélé la présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins). L'effet antioxydant des sept extraits sont testés en utilisant les tests du TAC, activité Scavenger (OH) et le test de décoloration au β -carotène montre que ces extraits possèdent un pouvoir réducteur (Fe^{2+} , Mo (V)), une forte activité scavenger contre le OH \cdot et une forte capacité d'inhiber la peroxydation lipidique. Par ailleurs, le test de cytotoxicité sur les globules rouges humaine montre que ces extraits n'exercent aucun effet toxique à des concentrations comprises entre 50 μ g/ml et 1000 μ g/ml. Dans le test anti-hémolytique induit par l'AAPH a fournie une grande protection de la membrane érythrocytaire. Tandis que test d'inhibition de la dénaturation d'albumine humaine a révélé que les extraits d'*I.viscosa* sont capable de contrôler la production d'auto-antigènes et par conséquent ils inhibent la dénaturation des protéines. En conclusion, cette étude témoigne et justifie utilisation de l'inule visqueuse en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies.

Mots clés : *Inula viscosa*, polyphénols, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

Natural extracts of plants contain a variety of phenolic compounds which are assigned various of biological activities. This work aims to determine the potential antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* organic and aqueous extracts prepared from the leaves of *Inula viscosa*. The preliminary screening based on specific tests revealed the presence of substances having large therapeutic values (total polyphenols, flavonoids and tannins). The antioxidant effect of the seven extracts were tested using the assays of the TAC, scavenger activity (OH) and the bleaching test β -carotene show that these extracts have a reducing power (Fe^{2+} , Mo (V)), a high activity scavenger against OH \cdot and a strong ability to inhibit lipid peroxidation. Furthermore, the cytotoxicity test on human red cells shows that these extracts do not exert any toxic effect at concentrations of 50 mcg / ml and 1000 mcg / ml. In the anti-hemolytic test induced AAPH has provided great protection of the erythrocyte membrane. While inhibiting denaturation of human albumin test revealed that the *Inula viscosa* extracts are capable of controlling the production of auto-antigens and therefore they inhibit protein denaturation. In conclusion, this study demonstrates and justifies the use of *Inula viscosa* in traditional medicine in the treatment of various diseases.

Key words: *Inula viscosa*, polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

المستخلصات الطبيعية من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تم تعيينها لمختلف الأنشطة البيولوجية. يهدف هذا العمل إلى تحديد مضادات الأكسدة و مضادات الالتهاب في المختبر للمستخلصات العضوية و المائية المحضرة من أوراق *Inula viscosa*. خلص الفحص الأولي على اختبارات محددة على وجود مواد ذات قيم علاجية كبيرة (phenols totaux, flavonoides, tannins). تم اختبار تأثير مضادات الأكسدة من المستخلصات السبع باستخدام فحوصات TAC، القدرة المضادة للجذور (OH.) و اختبار فقدان اللون بالبيتا كاروتان تبين أن هذه المستخلصات لديها قدرة الإرجاع (Fe^{2+} , Mo (V))، نشاطية عالية ضد القدرة مضادة للجذور OH. كما تملك قدرة عالية على تثبيط أكسدة الليبيدات في اختبار البيتا كاروتان/ حمض اللينولييك. علاوة على ذلك اختبار السمية الخلوية على خلايا الدم الحمراء البشرية يظهر أن هذه المستخلصات أي تأثير سام على تركيزات من 50 ميكروغرام / مل إلى 1000 ميكروغرام / مل. في اختبار ضد الانحلال الدم الناتج عن AAPH قدمت أكبر حماية كبيرة للغشاء كرات الدم الحمراء البشرية. في حين أن اختبار منع تمسخ الألبومين البشري أعطت المستخلصات *Inula viscosa* قدرة على السيطرة لإنتاج مستضدات الذات و بالتالي فإنها تمنع تمسخ البروتين. في الختام، توضح هذه الدراسة وتبرر استخدام المقرمان في الطب التقليدي لعلاج الأمراض المختلفة.

الكلمات الرئيسية *Inula viscosa*، البوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للالتهابات.