

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDE RRAHMANE MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Pharmacotoxicologie



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Étude *in vitro* de l'activité scavenger de radicaux libres d'extraits organiques d'une plante médicinale

Présenté par :

***M^{elle}* MEGHEZZEL Ilhem & *M^{elle}* MANSOUR Dounia**

Devant le jury :

M. BOUDJOUAN F.	MCB	Président.
M ^{me} ABDELOUHAB K.	MCB	Encadreur.
M ^{me} SADAOUI-BOUGOFFA K.	MCA	Examineur.

Année universitaire : 2021/2022

DÉDICACES

*C'est avec l'aide et la grâce de Dieu qu'on a achevé ce travail,
Que je dédie :*

A mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée et pour leur soutien, leur confiance ainsi que leurs prières tout au long de mes études. Sans eux je ne serais jamais arrivée à ce stade de ma vie, que Dieu vous accorde santé, longue vie et vous garde à mes côtés.

A mes aimables frères «Abde nour & Nadir»

Ma très chère sœur «Hamida»

A ma précieuse amie «Dounia» que je remercie pour sa ponctualité, son Perfectionnisme ainsi que sa volonté tout au long de la réalisation de ce travail

*A mes adorables amis : « Sabrina, Wissam, Samia & Farid»
Avec qui j'ai partagé des moments de joie et de bonheur.*

ILHEM

DÉDICACES

C'est avec l'aide et la grâce de Dieu qu'on a achevé ce travail

Que je dédie :

A mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée et pour leur soutien, leur confiance ainsi que leurs prières tout au long de mes études. Sans eux je ne serais jamais arrivée à ce stade de ma vie. que Dieu vous accorde santé, longue vie et vous garde à mes côtés.

A mes aimables frères «yazid & Rayan»

A mes très chères sœurs «Aya & Sara »

A ma grand-mère «Djidjiga »

A ma précieuse amie «Ilhem » que je remercie pour sa ponctualité, son perfectionnisme ainsi que sa volonté tout au long de la réalisation de ce travail.

A mes adorables amis :

« Wassila, Iman, Ahlem, Sara & Ramzy »

Avec qui j'ai partagé des moments de joie et de bonheur.

DOUNIA

REMERCIEMENTS

*Avant tout, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au «**Bon Dieu** » pour nous avoir donné la santé et la patience pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier très sincèrement **M^{me} Abdelouhab K** notre promotrice pour avoir accepté de nous encadrer, nous la remercions également pour sa disponibilité et pour son degré d'implication dans ce travail.*

*Nous remercions **M. Boudjouan F.** pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*

*Nous tenons également à remercier **M^{me} Sadaoui-Bougouffa K**, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements s'adressent spécialement à **M^{me} Meriem**, ingénieur de laboratoire, pour son aide au sein du laboratoire de **BPC**.*

*Un grand merci à toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à Tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de **Ce travail**.*

SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Etude bibliographique	
Chapitre I : Stress oxydant et radicaux libres	2
I.1 Médiateurs du stress oxydant.....	2
I.1.1 Espèces réactives de l'oxygène	2
I.1.2 Espèces réactives de l'azote	3
I.2 Sources des radicaux libres.....	4
I.2.1 Sources endogènes.....	4
I.2.2 Sources exogènes.....	5
I.3 Mécanismes d'action des radicaux libres	6
I.3.1 Oxydation de l'ADN.....	6
I.3.2 Oxydation des lipides.....	6
I.3.3 Oxydation des protéines	6
I.4 Systèmes antioxydants.....	8
I.4.1 Système enzymatique.....	8
I.4.2 Système non enzymatique	9
II. Polyphénols	10
II.1 Acides phénoliques	10
II.2 Flavonoïdes.....	11
II.2.1 Flavonols.....	12
II.2.2 Flavanols.....	12
II.2.3 Anthocyanes	13
II.3 Stilbènes et lignanes.....	13
II.4 Mécanismes d'action des polyphénols.....	13
I.4.2 Neutralisation des radicaux libres.....	14
I.4.3 Inhibition d'enzymes	14
III. <i>Hertia cheirifolia</i>	15
III.1 Généralités sur les asteracées	15

III.2 <i>Hertia cheirifolia</i>	15
III.2.1 Description botanique et classification.....	15
III.2.2 Usage traditionnel et propriétés biologiques.....	17

Etude Expérimentale

I. Matériel.....	18
I.1.1 Réactifs et appareillages	18
I.1.2 Matériel végétal	18
II.1 Dosage des polyphénols totaux.....	20
II.2 Dosage des flavonoïdes	20
II.3 Analyse de l'activité anti-radicalaire.....	21
III. Analyse statistique	22
I. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes	22
I.1. Teneurs en polyphénols totaux	22
I.2. Teneurs en flavonoïdes	24
I.3. Activité scavenger de radicaux libres.....	27
I.3.1 Piégeage du radical libre hydroxyle (HO•)	27
I.3.2 Piégeage du radical monoxyde d'azote (NO).....	30

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes d'action des ERO sur leurs différentes cibles.	7
Figure 2 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes antioxydants	8
Figure 3 : Mécanisme réactionnel impliqué dans la détoxification enzymatique des espèces réactives	9
Figure 4 : Principales classes des polyphénols	11
Figure 5 : Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes	12
Figure 6 : Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes	14
Figure 7 : Photographie de la plante <i>Hertiacheirifolia</i>	16
Figure 8 : Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	22
Figure 9 : Teneurs en polyphénols dans les extraits des feuilles (100% Fe) et des fleurs (100% Fl) de <i>Hertiacheirifolia</i> et dans leurs différents mélanges.....	23
Figure 10 : Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	25
Figure 11 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles (100% Fe) et des fleurs (100%Fl) de <i>Hertiacheirifolia</i> et dans leurs différents mélanges	26
Figure 12 : Effet scavenger du radical hydroxyle (OH) par les extraits de feuilles (100% Fe) et de fleurs (100% Fl) de <i>Hertiacheirifolia</i> ainsi que par leurs différents mélanges	28
Figure 13 : Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les extraits de feuilles (100% Fe) et de fleurs (100% Fl) de <i>Hertiacheirifolia</i> ainsi que par leurs différents mélanges	31

Liste des abréviations

CAT : Catalase.

COX : cyclooxygenase.

ERA : espèces réactives azotées.

ERO : espèces réactives oxygénées.

GR : glutathionréductase.

GPx : glutathions peroxydases.

GSH : glutathion.

MDA : malonaldialdéhyde

MPO : myéloperoxydase.

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NEDD : N-1-Naphtylethylènediamine dihydrochloride.

NOS : monoxyde d'azote synthase.

NPS : nitroprussiate de sodium.

PBS : tampon phosphate salin.

SOD : superoxyde dismutase

UV : ultra violet.

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont la source d'une immense variété de molécules bioactives. Ces substances naturelles ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie pharmaceutique en particulier, qui utilise encore une grande proportion de médicaments d'origine végétale (Aquaron, 2005). Les polyphénols sont parmi ces molécules bioactives, largement retrouvées chez les végétaux. Ils sont de plus en plus reconnus pour leurs diverses activités biologiques, dont la plus importante étant l'activité antioxydante (Nawaz *et al.*, 2006).

Par ailleurs, le stress oxydant est un phénomène biologique qui se manifeste par une synthèse accrue d'espèces hautement réactives face à un système antioxydant défaillant. Ces espèces réactives sont sous forme de radicaux libres pour la plupart d'entre elles (Birben, 2012). Le radical hydroxyle (HO·) et le monoxyde d'azote (NO·) sont parmi les plus incriminés dans le développement de différentes maladies chroniques. Ils sont responsables de différents dommages cellulaires, notamment sur les protéines, les lipides et l'ADN. Ceci est à l'origine de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et le cancer (Akyol *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2005).

Afin de faire face aux effets délétères de ces produits oxydants, les organismes vivants possèdent un système antioxydant endogène, formé d'un ensemble de médiateurs enzymatiques et non enzymatiques. Des antioxydants exogènes jouent également un rôle important pour renforcer le système antioxydant endogène. Ils sont principalement apportés par l'alimentation (Heim *et al.*, 2002).

L'objectif de cette étude est d'évaluer la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Hertiacheirifolia*, une plante médicinale endémique du bassin méditerranéen. Ensuite, l'activité antioxydante scavenger des radicaux libres hydroxyles (OH·) et du monoxyde d'azote (NO·) a été analysée. Ces mêmes analyses ont été également effectuées sur des mélanges des deux extraits à différents pourcentage afin de comparer leurs contenus en polyphénols et leur capacité anti-radicalaire.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Stress oxydant et radicaux libres

Le stress oxydant est le résultat d'une incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression d'espèces réactives oxygénées (ERO), suite à un déséquilibre lié à une production accrue de ces espèces et une diminution de la capacité de défense antioxydante (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Ce déséquilibre profond entre oxydants et antioxydants peut-être le résultat d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques antioxydant (xanthine oxydase, NADPH oxydase, monoamine oxydase...etc), d'une libération de fer à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules biologiques (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...etc). Par ailleurs, une alimentation pauvre en antioxydants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments ainsi que l'exposition aux radiations ionisantes et à la pollution, contribuent également à l'apparition du stress oxydant (Lee *et al.*, 2004; Delattre *et al.*, 2005).

I.1 Médiateurs du stress oxydant

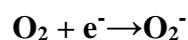
Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron non apparié, caractérisée par une demi-vie très courte de l'ordre de la milli seconde et d'une grande réactivité. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer leur électron. Soit par capture d'un électron (oxydant), soit en cédant un électron (réducteur) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Deux types d'espèces réactives sont à l'origine du développement du stress oxydant. Il s'agit d'espèces réactives oxygénées (ERO) et azotées (ERA) (Yoshikawa *et al.*, 2000).

I.1.1 Espèces réactives de l'oxygène

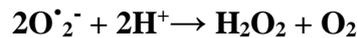
I.1.1.1 Anion superoxyde (O_2^-)

L'anion superoxyde est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire par capture d'un électron. La dismutation de cet anion entraîne la formation de l'oxygène fondamental et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Koechlin-Ramonatxo, 2006).



I.1.1.2 Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène, appelé également eau oxygénée, résulte soit de la dismutation du radical superoxyde par la superoxyde dismutase (SOD) ou par la réduction bi-électronique de l'oxygène, catalysée par des enzymes comme la glucose oxydase (Cheeseman et Slater, 1993 ; Halliwell et *al.*, 2000).



I.1.1.3 Radical hydroxyle HO[•]

Le radical hydroxyle est le radical le plus dangereux dans l'organisme, avec une constante de vitesse élevée. Il peut oxyder un substrat selon trois modes d'action ; capture d'un électron, capture d'un atome d'hydrogène d'un substrat organique ou addition à une double liaison. Il est formé à partir du H₂O₂ par la réaction de Fenton, en présence de métaux de transition (Fe²⁺) qui réagissent avec le peroxyde d'hydrogène (Cheeseman et Slater, 1993).



Le radical hydroxyle apparaît donc comme l'espèce réactive à effet cytotoxique majeur dans les systèmes biologiques et serait à l'origine de la production des radicaux libres secondaires suite à sa réaction avec différents composés cellulaires (Gutteridge, 1993).

I.1.1.4 Oxygène singulet (¹O₂)

L'oxygène singulet n'est pas un radical libre, mais une forme excitée de l'oxygène. Il est formé par action de la lumière sur l'oxygène (Houée-Levin *et al.*, 2005). L'oxygène singulet est un puissant pro-oxydant grâce à sa capacité de se lier à différentes biomolécules. Sa formation nécessite la présence de l'acide hypochloreux (HOCl) et du peroxyde d'hydrogène (Cheeseman et Slater, 1993).



I.1.2 Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote chez les mammifères proviennent du monoxyde d'azote (NO) et des nitrites. Les nitrites étant le produit stable de l'oxydation du NO (Fang et *al.*, 2002).

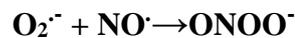
I.1.2.1 Monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est un radical libre avec un électron non apparié. Il est formé par l'action de la NO synthétase (NOS) sur la L-arginine. Le NO joue le rôle de messager physiologique aux propriétés de signalisation bien caractérisées. Il réagit rapidement avec l'anion superoxyde pour former le peroxyde nitrite (ONOO^\cdot), un composé extrêmement réactif et toxique (Beckman *et al.*, 1990 ; Fang *et al.*, 2002).



I.1.2.2 Peroxyde nitrite (ONOO^\cdot)

Le peroxyde nitrite est un agent non radicalaire à la fois oxydant et nitrosant responsable de différentes lésions tissulaires. Il est formé par la combinaison du monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde. Le peroxyde nitrite affecte les fonctions mitochondriales et déclenche la mort cellulaire. Il est aussi impliqué dans l'hypertension artérielle, le diabète et l'athérosclérose. Aucun système enzymatique spécifique n'est capable de le dégrader (Squadrito et Pryor, 1998; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002).



I.2 Sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes soit par voie endogène ou par voie exogène (Fang *et al.*, 2002).

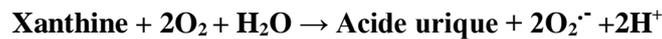
I.2.1 Sources endogènes

I.2.1.1 Les mitochondries

La mitochondrie est la source principale de production du superoxyde (O_2^\cdot) dans la cellule saine. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et à l'intensité d'oxygénation (Favier, 2003). Les mitochondries produisent environ 90% des ERO. Ce sont le lieu principal de la consommation de l'oxygène, qui est réduit en eau, et dont une proportion est transformée en ERO telle que l'anion superoxyde. Ces réactions se produisent en présence de plusieurs enzymes telle que la NADH déshydrogénase (Valko *et al.*, 2006).

I.2.1.2 La xanthine oxydase

La xanthine déshydrogénase est une enzyme ubiquitaire qui peut être modifiée en xanthine- oxydase. Cette enzyme génère du superoxyde en présence d'oxygène et dexanthine ou d'hypoxanthine. La xanthine oxydase produit l' $O_2^{\cdot-}$ par la réduction de la xanthine en acide urique, où l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l' $O_2^{\cdot-}$ (Berger, 2006).



I.2.1.3 La NADPH oxydase

En parallèle de la production d'ERO par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) via une activité NADPH oxydase membranaire (NOX). La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l' O_2 en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (Cai *et al.*, 2005).



I.2.1.4 L'enzyme monoxyde d'azote synthase (NOS)

La NOS est une flavo-enzyme calcium dépendante, qui catalyse la production du NO grâce à l'oxydation de la L-arginine. Elle possède trois isoformes ; la NOS neuronale (présente dans les terminaisons ortho- et parasymphatiques), la NOS endothéliale (présente dans les cellules endothéliales de la macro- et la microcirculation) et la NOS inducible (seule forme calcium-indépendante présente dans la plupart destypes cellulaires mais uniquement après induction) (Bredt*et al.*, 1991; Cai etHarrison, 2000).

I.2.2 Sources exogènes

Les radicaux libres peuvent également provenir de sources exogènes à l'organisme. Ils sont particulièrement issus de l'environnement, tels que la fumée de cigarette ou la pollution atmosphérique, qui sont capables d'oxyder des molécules de l'organisme (Church, 1985 ; Hiltermann *et al.*, 1999). De plus, l'hyperoxie correspondant à des niveaux d'oxygènes supérieurs à la pression artérielle dans les tissus, peut entraîner une production accrue d'espèces réactives oxygénées et azotées (Matthay *et al.*, 1999). Les rayonnements ionisants sont par ailleurs capables, en présence de l' O_2 de transformer le radical hydroxyle, le superoxyde et les radicaux organiques en peroxyde d'hydrogène et en hydroperoxydes

organiques. Ces hydroperoxydes réagissent avec des ions métalliques redox actifs (Fe et Cu), *via* les réactions de Fenton et induisent ainsi le stress oxydant (Biaglow *et al.*, 1992) . L'absorption de médicaments, notamment en chimiothérapie, peut provoquer sous l'action de stimuli extérieurs une surproduction de ces radicaux libres (Conklin *et al.*, 2004).

I.3 Mécanismes d'action des radicaux libres

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions considérables des molécules biologiques, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Esterbauer *et al.*, 1992 ; Cadet *et al.*, 2002).

I.3.1 Oxydation de l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques, susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Le radical libre réagit avec les bases de l'ADN en s'additionnant sur les doubles liaisons (**Figure 1a**), aboutissant à des perturbations de la multiplication, de la transmission des gènes ou de la réplication de l'ADN. L'accumulation de ce type de dommages moléculaires et cellulaires serait responsable de l'accélération du vieillissement et du développement de tumeurs à long terme (Cadet *et al.*, 2002).

I.3.2 Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés des lipides sont des cibles privilégiées pour l'attaque des radicaux hydroxyles. Cela piège l'hydrogène du carbone situé entre les deux doubles liaisons, ce qui induit l'oxydant en un radical peroxy et la formation d'un radical diène conjugué. (Esterbauer *et al.*, 1992). les radicaux libres formés par les radicaux peroxy deviennent des peroxydes lorsqu'ils entrent en contact avec un autre acide gras, formant ainsi de nouveaux radicaux libres diènes conjugués par la réaction de peroxydation lipidique (**Figure 1b**) (Esterbauer *et al.*, 1989; Favier, 2003).

Cette réaction, appelée, forme une réaction en chaîne car

I.3.3 Oxydation des protéines

Dans les protéines, tous les acides aminés sont des cibles potentielles de l'attaque par les espèces réactives de l'oxygène, notamment par le radical hydroxyle. De plus, l'oxydation de la chaîne polypeptidique peut conduire à des cassures ou encore à des réticulations inter- ou intramoléculaire causant la perte de la structure tridimensionnelle. Le dommage oxydatif

des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport (Favier, 2003 ; Halenget al, 2007).

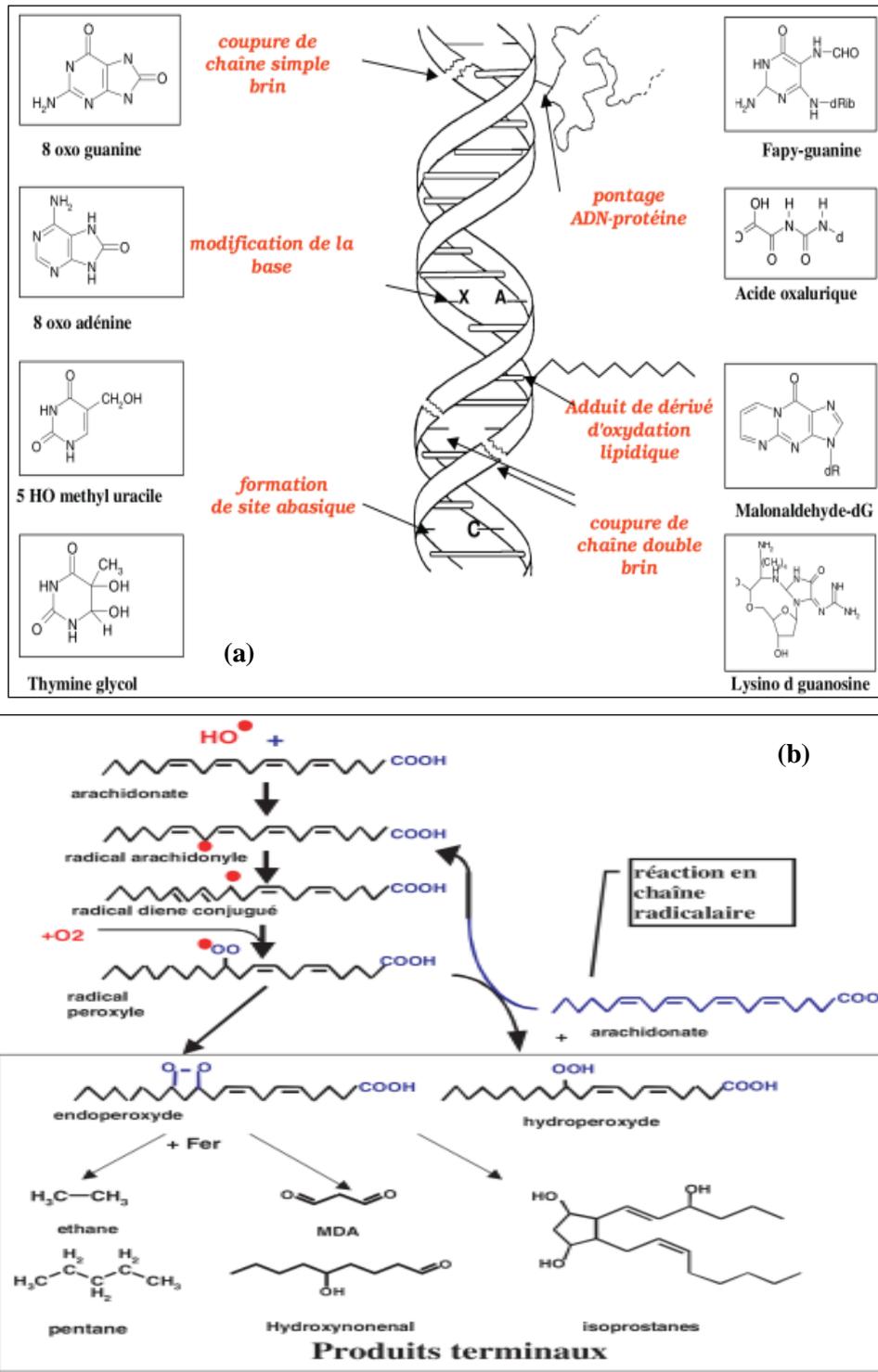


Figure 1 : Mécanismes d'action des ERO sur leurs différentes cibles.(a) Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.(b) Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et produits terminaux formés.(Favier, 2003).

I.4 Systèmes antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré grâce à différents systèmes antioxydants. Un antioxydant est toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher leur oxydation (Pincemail *et al.*, 2002). Différents mécanismes antioxydants sont utilisés par les organismes vivants pour contrôler leurs niveaux en ERO. Il s'agit principalement de systèmes enzymatique et non enzymatique (**Figure 2**).

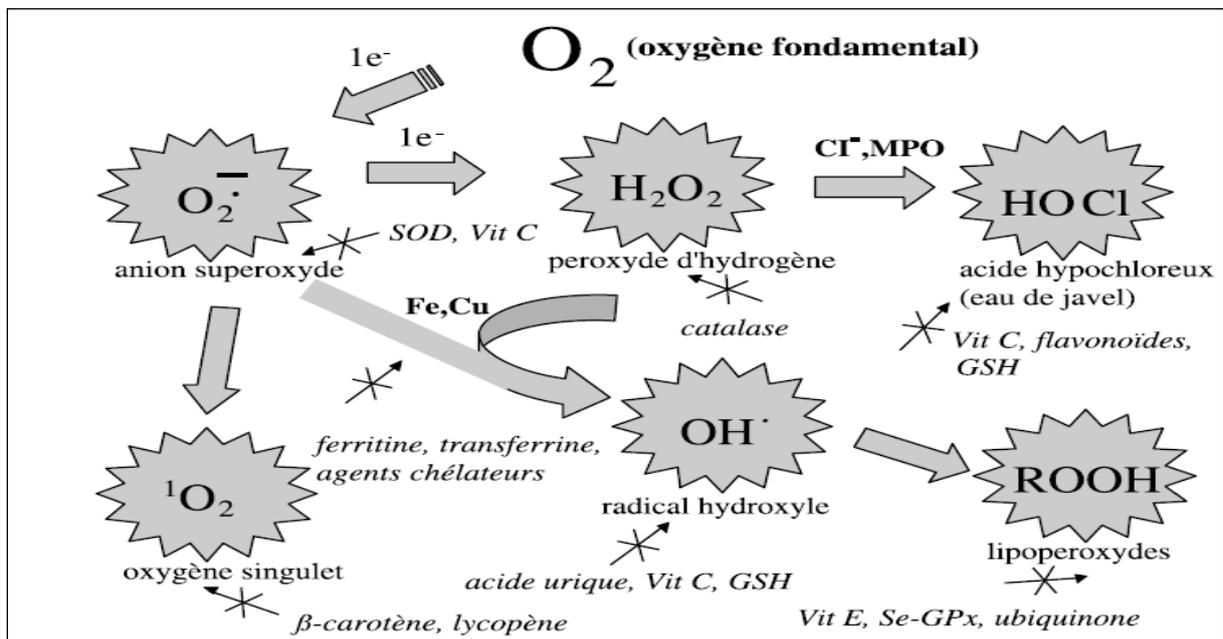


Figure 2: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002).

I.4.1 Système enzymatique

Ils'agit principalement de trois enzymes ; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les glutathions peroxydases et réductases (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

I.4.1.1 superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD

à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD). Ces enzymes diffèrent selon la localisation chromosomique de leur gène codant, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

I.4.1.2 La catalase

Cette enzyme est particulièrement présente dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

I.4.1.3 Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont retrouvées dans le cytoplasme et les mitochondries. La glutathion peroxydase est une séléno-enzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du H_2O_2 , en couplant la réduction des dérivés réactifs à l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG en présence de NADPH (**Figure 3**) (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

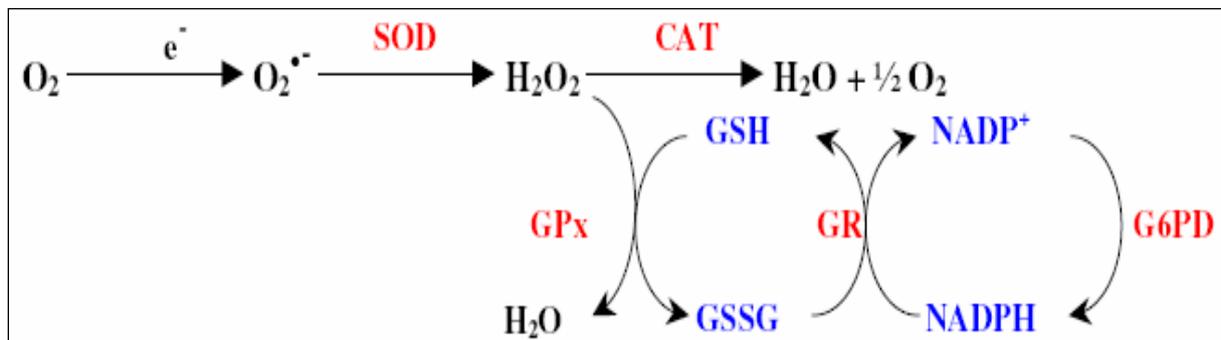


Figure 3: Mécanisme réactionnel impliqué dans la détoxification enzymatique des espèces réactives (Martínez-Cayuela, 1995).

I.4.2 Système non enzymatique

I.4.2.1 Les vitamines

L'acide ascorbique ou vitamine C est considéré comme l'antioxydant le plus puissant des cellules végétales en raison de sa capacité à donner des électrons par un certain nombre de processus enzymatiques et non enzymatiques (Zechmann *et al.*, 2011). L'ascorbate est présent dans tous les tissus végétaux. Sa concentration est généralement plus élevée dans les cellules photosynthétiques, les méristèmes et dans certains fruits (Pignocchi *et al.*, 2006).

Par ailleurs, la vitamine E est une vitamine liposoluble intervenant directement au niveau des membranes biologiques où elle inhibe la propagation de la peroxydation lipidique en se transformant elle-même en sa forme radicalaire, laquelle est relativement stable. Cette vitamine exerce un pouvoir antiagrégant plaquettaire et inhibe la prolifération des muscles lisses, un des phénomènes associés à l'athérosclérose (Pincemallet *al.*, 2002 ; Vamecq *et al.*, 2004).

I.4.2.2 Polyphénols

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives principalement retrouvées chez les végétaux. Leur rôle est largement montré dans la prévention de certaines maladies grâce à leurs propriétés antioxydantes (Halliwell, 2008). Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Par conséquent, ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome (Macheix *et al.*, 2005).

II. Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, et sont distribués dans tous les organes d'une plante (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois) (ApaK *et al.*, 2007). Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une fonction éther, ester ou hétéroside (Handique et Baruah, 2002). Leur classification est basée d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (Macheix *et al.*, 2006). Les principales classes sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignans (**Figure 4**) (Pandey et Rizvi, 2009).

II.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant des propriétés antioxydantes. Ils ont la capacité de neutraliser les radicaux libres, empêchant ainsi le développement de maladies liées au vieillissement. Les acides phénoliques sont soit des dérivés de l'acide benzoïque, soit des dérivés de l'acide cinnamique (Guignard, 1996; Fleuri

et *et al.*,2005). L'acide hydroxybenzoïque est généralement très peu retrouvé chez les végétaux comestibles. Ses dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux provenant de l'acide hydroxycinnamique sont très répandus (Fleuriet *et al.*, 2005).

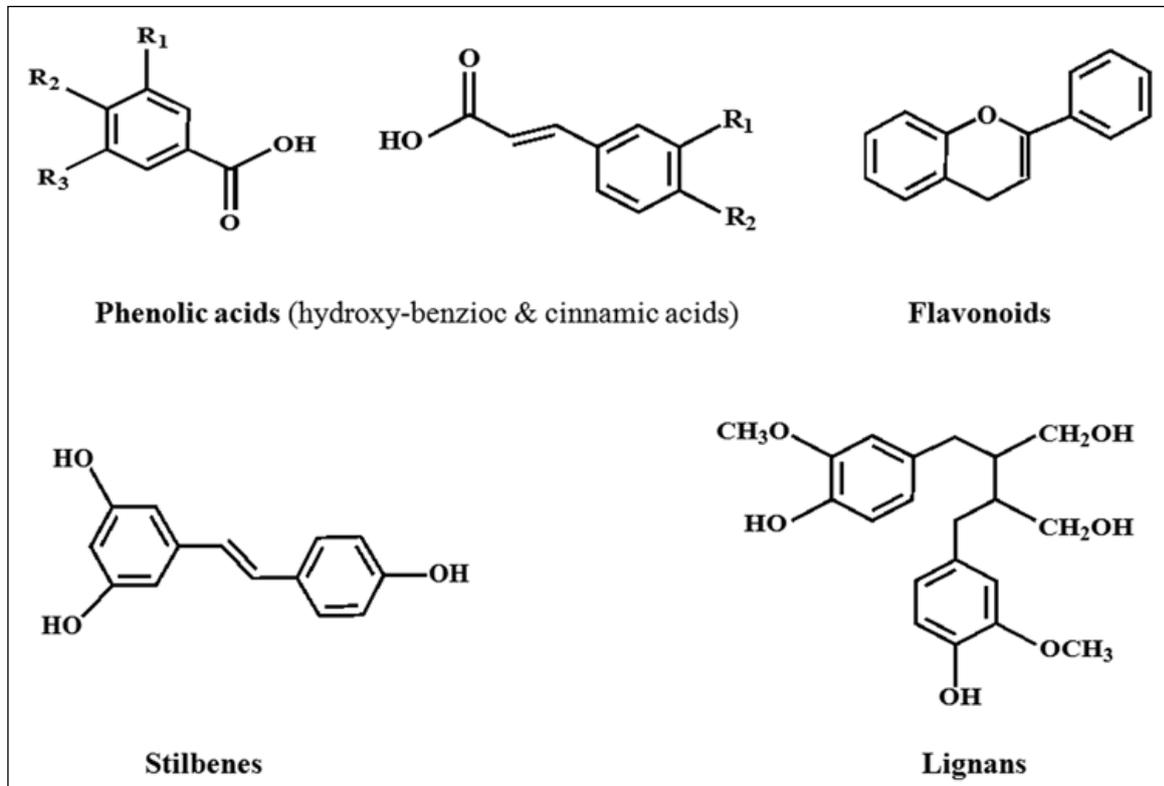


Figure 4: Principales classes des polyphénols (Pandey et Rizvi, 2009).

II.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols et dont la structure comprend deux noyaux aromatiques et un hétérocycle oxygéné de structure C6-C3-C6 (**Figure 5**) (Rice-Evans, 1995 ; Fragaet Oteiza, 2011). Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position C3 et C7 (cycle A et C) ou en C3', C4 et C5' (cycle B). La formation d'esters méthyle ou acétyle au niveau de groupements OH a été observée dans la nature. Ils peuvent se lier à un sucre au niveau du carbone C3 ou C7 pour former des dérivés hétérosides. Ces polyphénols sont classés en plusieurs classes dont les flavonols, les flavanols et les anthocyanidines (Fragaet Oteiza, 2011).

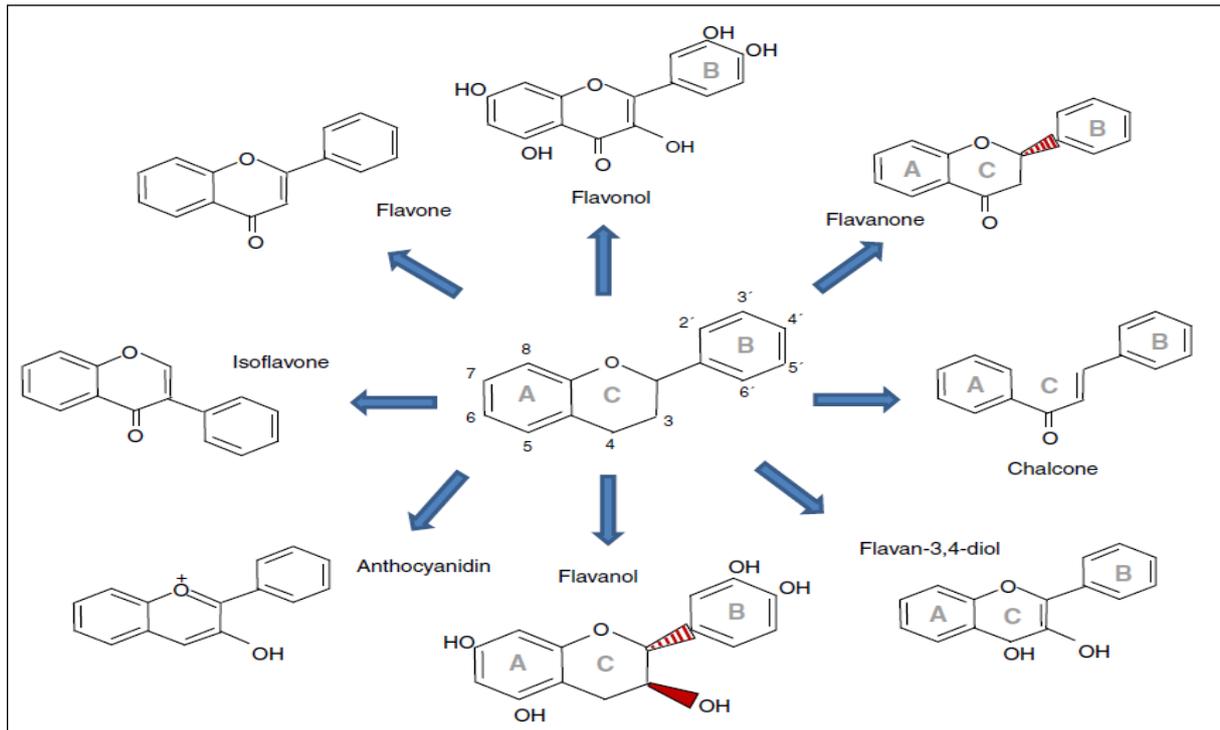


Figure 5: Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga et Oteiza, 2011).

II.2.1 Flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double liaison en C2-C3 (**Figure 5**). Ils se trouvent sous forme d'aglycones ou d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses, tels que D-glucose et L-rhamnose. Les plus connus des flavonols sont la quercétine, le kaempferol et la rutine. Ils proviennent principalement des oignons, du poireau, du chou et des baies telles que le cassis (Fraga et Oteiza, 2011 ; Kostyuk *et al.*, 2004).

II.2.2 Flavanols

Les flavan-3-ols sont une forme de monomères et de structures polymérisées, appelées pro-anthocyanidines (**Figure 5**). Ils sont souvent retrouvés dans les légumes, les fruits, les céréales, mais également dans les pépins de raisin et l'écorce de pin. La structure de base des pro-anthocyanidines est le flavan-3-ol. Les flavanols sont caractérisés par un squelette de base de type 2-phényl-benzopyrone à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), qui peut être estérifié par du gallate en position 3 (Prieur *et al.*, 1994).

II.2.3 Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments rouges situés dans le suc vacuolaire des cellules et plus exactement dans les trois ou quatre premières assises cellulaires de l'hypoderme. Ils sont aussi présents dans la pulpe des cépages teinturiers (Amraniet Glories, 1995). Les anthocyanes ont une structure de base commune, qui se différencie par le nombre et la position des groupes hydroxyle et méthyles sur le noyau B. Cette structure est complétée par une ou plusieurs molécules de sucre à différentes positions hydroxylées de la structure de base (Corrales *et al.*, 2009).

II.3 Stilbènes et lignanes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6 (deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène). Ce sont des phytoalexines (antibiotiques) produites par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales (Macheix *et al.*, 2006). Les stilbènes sont retrouvés en petites quantités dans l'alimentation humaine. Le resvératrol est l'un de ces composés, retrouvé dans certaines plantes médicinales avec une activité anticancéreuse (Fleuriet *et al.*, 2005).

Les lignanes sont constitués de deux unités de phénylpropane (C6-C3), liées par leur carbone C8. Ils sont présents dans les végétaux sous forme de glucosides (El gharras, 2009). Les plantes les élaborent par dimerisation oxydante de deux unités d'alcool confrérylique (coniférol, dérivé de l'acide férulique). Il existe d'autres types de lignanes tels que les esquinéolignanes (trois unités de C6-C3) et les dinéolignanes (quatre unités de C6-C3) (Hemingway *et al.*, 1992).

II.4 Mécanismes d'action des polyphénols

Les polyphénols ont plus de huit milles structures phénoliques connues. Cette diversité de structures est le résultat de la variation d'hydroxylation, de la stéréochimie aux trois centres chiraux, ainsi que l'emplacement et le type de liaison inter-flavane (Dai et Mumper, 2010).

Les composés phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons, comme chélateurs de métaux de transition et comme inhibiteurs d'enzymes génératrices de radicaux libres et inducteurs de la synthèse d'enzyme antioxydantes (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Márquez-García *et al.*, 2009). L'activité antioxydante des composés phénoliques augmente avec leur degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyles (Macheix *et al.*, 2005).

I.4.1 Chélation des métaux

La chélation est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un ligand, dit chélateur (ou chélatant), et un cation (ou atome) métallique. Les composés phénoliques inhibent la formation de radicaux libres par la chélation des métaux tels que : le cuivre, le fer et l'aluminium. Ces ions métalliques accentuent les effets nocifs du stress oxydant, en stimulant la production des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$). Les composés chélateurs des ions métalliques, forment des complexes de conjugaison avec ces métaux qu'ils peuvent convertir en complexes insolubles, empêchant ainsi leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques (Pietta, 2000; Lee *et al.*, 2004).

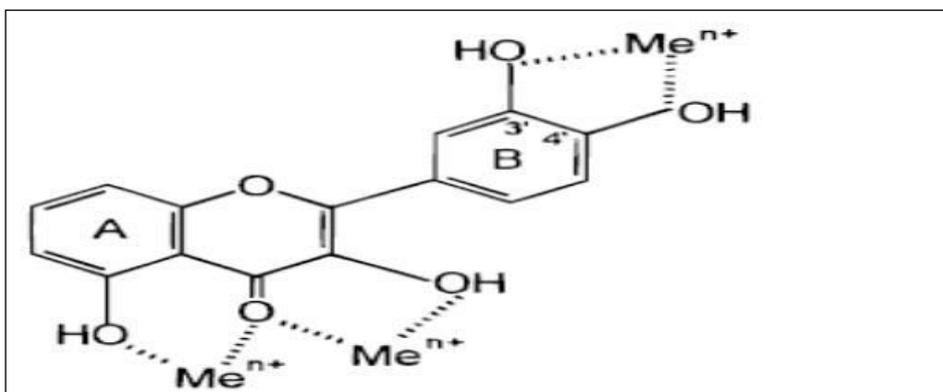


Figure 6: Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

I.4.2 Neutralisation des radicaux libres

Les composés phénoliques sont des piègeurs efficaces de radicaux libres, et ceci grâce à leurs groupements hydroxyle fortement réactifs contre l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. Cette réaction donne une molécule stable (RH) et un radical ($\text{O}\cdot$). Celui-ci va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impairs sur le noyau aromatique. En outre, les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (Amic *et al.*, 2003).

I.4.3 Inhibition d'enzymes

Les composés phénoliques affectent l'activité de nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans le stress oxydant (Nijveldt *et al.*, 2001). Certains flavonoïdes comme l'épigénine, la quercétine et la myricétine inhibent la xanthine oxydase, qu'est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde suite à l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (Da Silva *et al.*, 2004).

III. *Hertia cheirifolia*

III.1 Généralités sur les asteracées

La famille des Asteraceae (compositae) est la famille la plus vaste des plantes vasculaires dans le monde, 1600-1700 genres et 24000-30000 espèces (Moreira-Muñoz et Muñoz-Schick, 2007). Les plantes de cette famille se distinguent par leurs fleurs regroupées en capitules. Le nom *Aster* provient du mot latin « aster » qui signifie étoile, faisant allusion à la forme des capitules (Oren-Shamir *et al.*, 2000).

Cette famille présente des caractéristiques morphologiques variées. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, sous forme d'arbustes, d'arbres ou de plantes grimpantes. En revanche, cette famille est très homogène de par son inflorescence caractéristique, le capitule. Le fruit est un akène, généralement couvert de pappus sur le calice (Heywood, 1985). Une des propriétés typique de la famille des Asteraceae est sa richesse en composés naturels divers. On y trouve des terpenoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. C'est une famille très riche en lactones sesquiterpéniques qui représentent des principes amers typiques de cette famille (Harborne et Swain, 1969). La famille des astéracées fournit des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique. De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont associées à un panel d'activités thérapeutiques aussi large que la diversité de cette famille (Zheng *et al.*, 2013).

III.2 *Hertia cheirifolia*

Hertia cheirifolia connue également sous le nom d'*Othonopsis cheirifolia*, est une petite plante à fleurs jaunes, qui pousse dans la bordure des champs dans l'est de l'Algérie et le nord et le centre de la Tunisie (Massiot *et al.*, 1990; Ammar *et al.*, 2009).

Le genre *Hertia* appartenant à la famille des Asteraceae est un genre de plantes médicinales endémiques du bassin méditerranéen. C'est un genre qui comprend environ 12 espèces distribuées dans le nord et le sud de l'Afrique et le sud-ouest de l'Asie. La flore algérienne consiste en l'unique espèce *cheirifolia*, répandue dans le nord-est de l'Algérie (Massiot *et al.*, 1990 ; Ammar *et al.*, 2009).

III.2.1 Description botanique et classification

La plante *Hertia cheirifolia* pousse sous forme d'arbrisseau persistant touffu bas et rampant (30-40 cm de hauteur). Elle porte des feuilles spatulées charnues vert cendré, alternes, et possède des tiges lignifiées semi-rampantes (Quezel et Santa, 1963 ; Burnie *et al.*, 2006).

Hertia cheirifolia est caractérisée par des fleurs jaunes réunies en capitules jaunes-citron. La période de la floraison se situe au début du printemps (**Figure 7**) (Quezelet Santa, 1963).

Classification de *Hertia cheirifolia* :

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires).

Embranchement : Phanerogamae (Phanérogames).

Sous-embranchement : Magnoliophytina (Angiospermes).

Classe : Magnoliopsida (Dicotyledones).

Sous-classe : Asteridae.

Ordre : Asterales.

Famille : Astéraceae.

Genre : *Hertia*.

Espèce : *Hertia cheirifolia* L. (Quezelet Santa, 1963).

Noms vernaculaires : Arabe : Kherchoun ; Anglais: Barbary ragwort; Français : Othonnopsis



Figure 7: Photographie de la plante *Hertia cheirifolia*.

(<https://www.senteursduquercy.com/6813-thickbox/hertia-cheirifolia-othonne-a-feuille-de-girollee.jpg>)

III.2.2 Usage traditionnel et propriétés biologiques

Hertia cheirifolia est utilisée en médecine traditionnelle algérienne et tunisienne comme anti-inflammatoire et antispasmodique (Iserin, 2001 ; Ammar *et al.*, 2009). Les infusats des feuilles de cette plante sont utilisés pour traiter les douleurs à l'estomac et certains troubles gastro-intestinaux tels que la dyspepsie, la diarrhée et pour traiter certaines infections (Iserin, 2001).

La composition phytochimique de *H. cheirifolia* confère à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Il a été montré que l'extrait chloroformique de cette plante exerce une activité antispasmodique et anti-inflammatoire (Ammar *et al.*, 2009). La composition chimique d'extraits de *H. cheirifolia* a été déterminée pour la première fois en 1990. Des composés sesquiterpéniques ont été isolés et identifiés et leurs composés identifiés sont 10- β -hydroxyeremophilénolide, 8- β -10- β - dihydroxyeremophilénolide, 8- β -methoxy-10- β -hydroxyeremophilénolide, 6- β , 10- β dihydroxy- 8- β -methoxyeremophilénolide, 10- β -angeloyloxy-6- β , 10- β -dihydroxy-8- β - methoxyeremophilénolide et 3- β -angeloyloxy-10- β -hydroxy-8- β -methoxyeremophilénolide. Il s'agit d'eremophilénolides et de lactones obtenus à partir de la fraction chloroformique de l'extrait méthanolique des feuilles (Massiot *et al.*, 1990 ; Aclinou *et al.*, 1991 ; Aclinou *et al.*, 1993).

Des études récentes ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *H. cheirifolia* ainsi que différentes fractions organiques, ont un potentiel antibactérien, antioxydant et anti-inflammatoire (Bousselsela *et al.*, 2012 ; Bouriche *et al.*, 2016 ; Majouli *et al.*, 2017).

ETUDE

EXPÉRIMENTALE

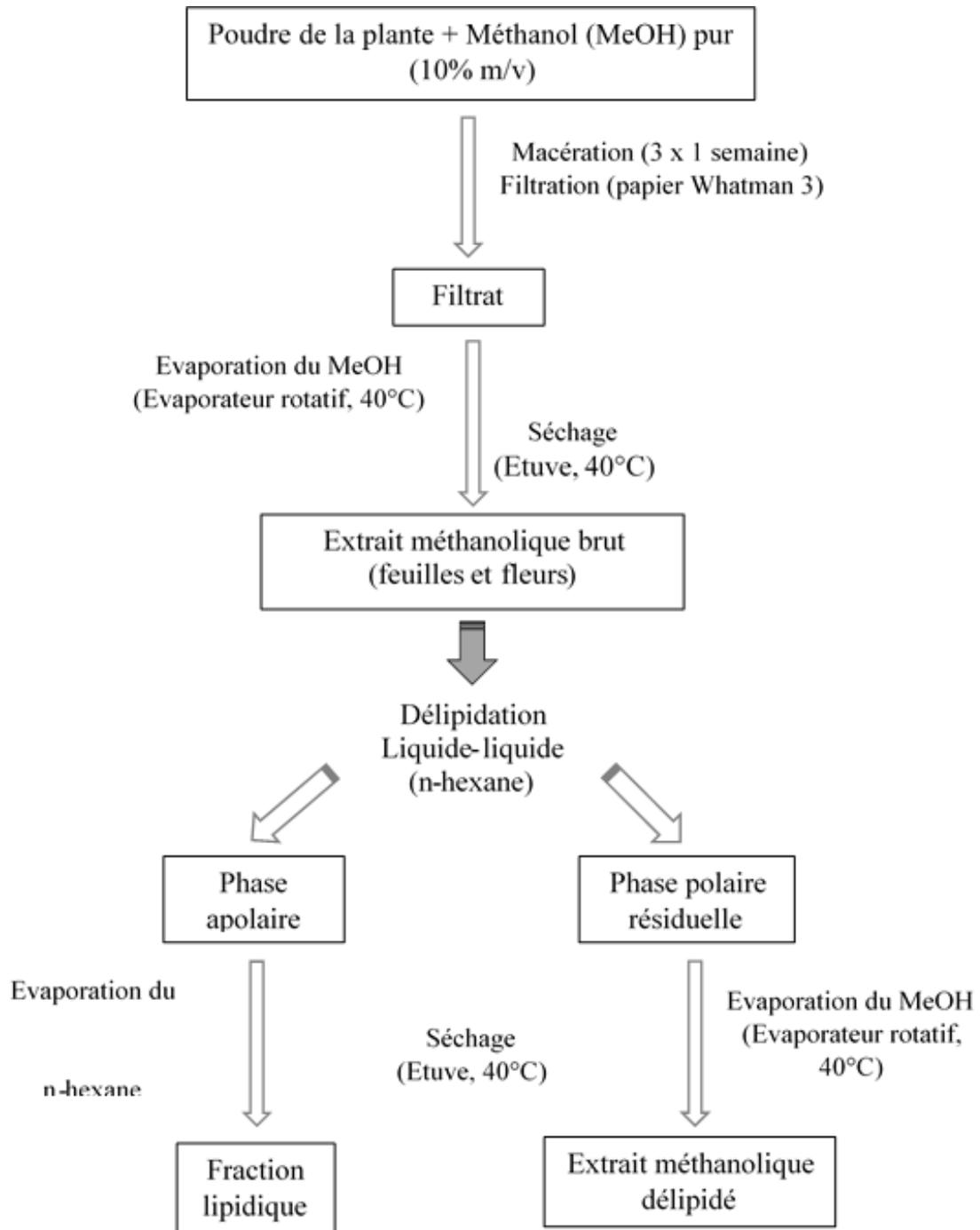
I. Matériel

I.1.1 Réactifs et appareillages

I.1.2 Matériel végétal

Notre étude est réalisée sur des extraits méthanoliques de feuilles et de fleurs (100%Fe et 100%Fl respectivement). En même temps, différents mélanges entre les deux extraits à différents pourcentages ont été également préparés (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl) de la plante *Hertia cheirifolia* ont été analysés.

Ces extraits ont été préalablement préparés par macération, dans du méthanol pur, d'une poudre obtenue à partir des feuilles et des fleurs séchées de la plante. Elle a été récoltée au stade de floraison au mois d'avril 2014 dans la région d'Ouled M'halla (Kasr El Abtal, Sétif). Elle a été identifiée par Pr. Laouer Hocine, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Sétif 1. Suivant la méthode d'extraction suivante ;



Procédure d'extraction et de délipidation à partir des feuilles et des fleurs de *Hertia cheirifolia*. (Abdelouhab, 2021).

II. Méthodes

II.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles et de fleurs ainsi que dans les différents mélanges préparés, est effectué par la méthode au Folin-Ciocalteu, un acide de couleur jaune (Li *et al.*, 2007). Ce test est basé sur l'oxydation des composés phénoliques et la formation d'un complexe d'oxydes métalliques de couleur bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols contenus dans les extraits végétaux (Ribéreau et Gayon, 1968).

Un volume de 0.5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1:10 (1ml de folin ciocalteu dilué dans 9 ml d'eau distillée) est ajouté à 0.1 mL de chaque extrait (1 mg/mL). Après 4 min d'incubation, 0.4 mL de la solution de carbonate de sodium (7.5 %) ont été ajoutés dans chaque tube. Après agitation au vortex, les tubes sont incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 1.5 à 2 heures. A la fin de cette incubation, l'absorbance de chaque échantillon est lue au spectrophotomètre ($\lambda=760$ nm). En parallèle, une série de concentrations croissantes de l'acide gallique (0-200 $\mu\text{g/mL}$) ont été préparées pour tracer une droite d'étalonnage qui a servi pour quantifier les teneurs en polyphénols totaux. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

II.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes contenus dans les extraits a été évaluée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce test est basé sur la formation des complexes entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium qui donne à la solution une coloration jaunâtre (Bahorunet *al.*, 2015).

Dans chaque tube, 0.5 mL d' AlCl_3 (2 % dans de l'eau distillée) sont ajoutés à un volume égal de chaque extrait. Après, les tubes sont agités puis incubés à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance est ensuite mesurée pour chaque échantillon à $\lambda = 430$ nm. Parallèlement, une série de concentrations croissantes en quercétine (0-50 $\mu\text{g/mL}$) est préparée pour tracer la droite d'étalonnage permettant d'estimer la quantité des flavonoïdes dans chacun des extraits analysés. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

II.3 Analyse de l'activité anti-radicalaire

Dans le but d'analyser l'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Hertia cheirifolia*, deux tests ont été réalisés. Il s'agit du test du pouvoir scavenger du radical hydroxyle (OH) et celui du radical du monoxyde d'azote (NO).

II.3.1 Pouvoir scavenger du radical hydroxyle (OH)

L'activité scavenger des radicaux OH par les extraits de la plante est évaluée par la méthode de Rajamanikandan *et al.* (2011). Un volume de 0.5 mL de FeSO₄ (1.5 mM) et 0.35 mL de H₂O₂ (6 mM) plus 0.15 mL de salicylate de sodium (20 mM) ont été ajoutés à 0.5 mL de chaque extrait (1 mg/mL) aux différents pourcentages (100%Fe, 100%Fl, 75%Fe, 75% Fl, 50% Fe/Fl).Après vortex, les échantillons sont incubés 1 heure à 37C° dans un bain-marie, puis centrifugés pendant 3 min à 3 000 tours/min. L'absorbance a été ensuite mesurée à $\lambda = 562$ nm. Le pourcentage de l'inhibition de l'oxydation du radical OH, correspondant à l'effet scavenger des extraits a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100.$$

Où : A₀ est l'absorbance du contrôle sans l'extrait

A_t est l'absorbance du test avec l'extrait.

II.3.2 Pouvoir scavenger du radical monoxyde d'azote (NO)

La capacité de piégeage du radical NO exercée par les extraits étudiés a été mesurée par la méthode de Griess (Sreejayan et Rao, 1997). Un volume de 0.5 mL de la solution de nitroprussiate de sodium (NPS, 5mM) préparée dans du tampon phosphate salin (PBS, pH =7.4) est ajouté à 0.5 mL de chacun des différents extraits à 1 mg/mL. Après incubation sous la lumière pendant 1h30 min à température ambiante, 0.5 mL de sulfanilamide (1% dans 5% H₃PO₄) est ajouté dans chaque échantillon. Après 10 min, 0.5 mL du N-1-Naphtylethylènediamine dihydrochloride (NEDD) (0.1% dans de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'ensemble des échantillons sont incubés encore 20 min avant la lecture de l'absorbance à $\lambda = 543$ nm. L'activité de piégeage du radical NO a été calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100.$$

Où : A₀ est l'absorbance du contrôle sans extrait

A_t est l'absorbance du test avec l'extrait.

III. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de la moyenne \pm écart-type ($n = 3$). L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad Prism.5 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Tuckey. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes

I.1. Teneurs en polyphénols totaux

Dans cette étude, le dosage des polyphénols totaux est effectué par la méthode au réactif Folin-Ciocalteu. Le principe de la réaction est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif du Folin-Ciocalteu. Celui-ci, de couleur orange, est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques contenus dans un échantillon et possède une absorption maximale à 760 nm (Waterhouse, 2001).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g). En utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée pour l'acide gallique (**Figure 08**).

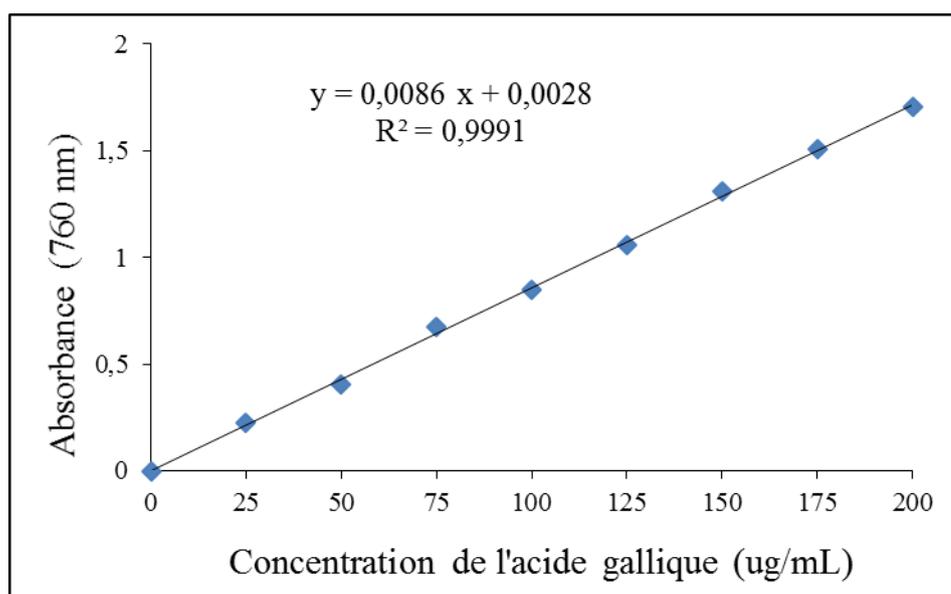


Figure 8: Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

L'apparition d'une coloration bleue a été observée dans tous les échantillons analysés à des intensités variables. La quantification de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique des feuilles (100%Fe) et des fleurs (100%Fl) de *Hertia cheirifolia* ainsi que dans les différents mélanges (75%Fe,75%Fl et 50%Fe/Fl) a permis d'obtenir les résultats présentés dans la **figure 9**.

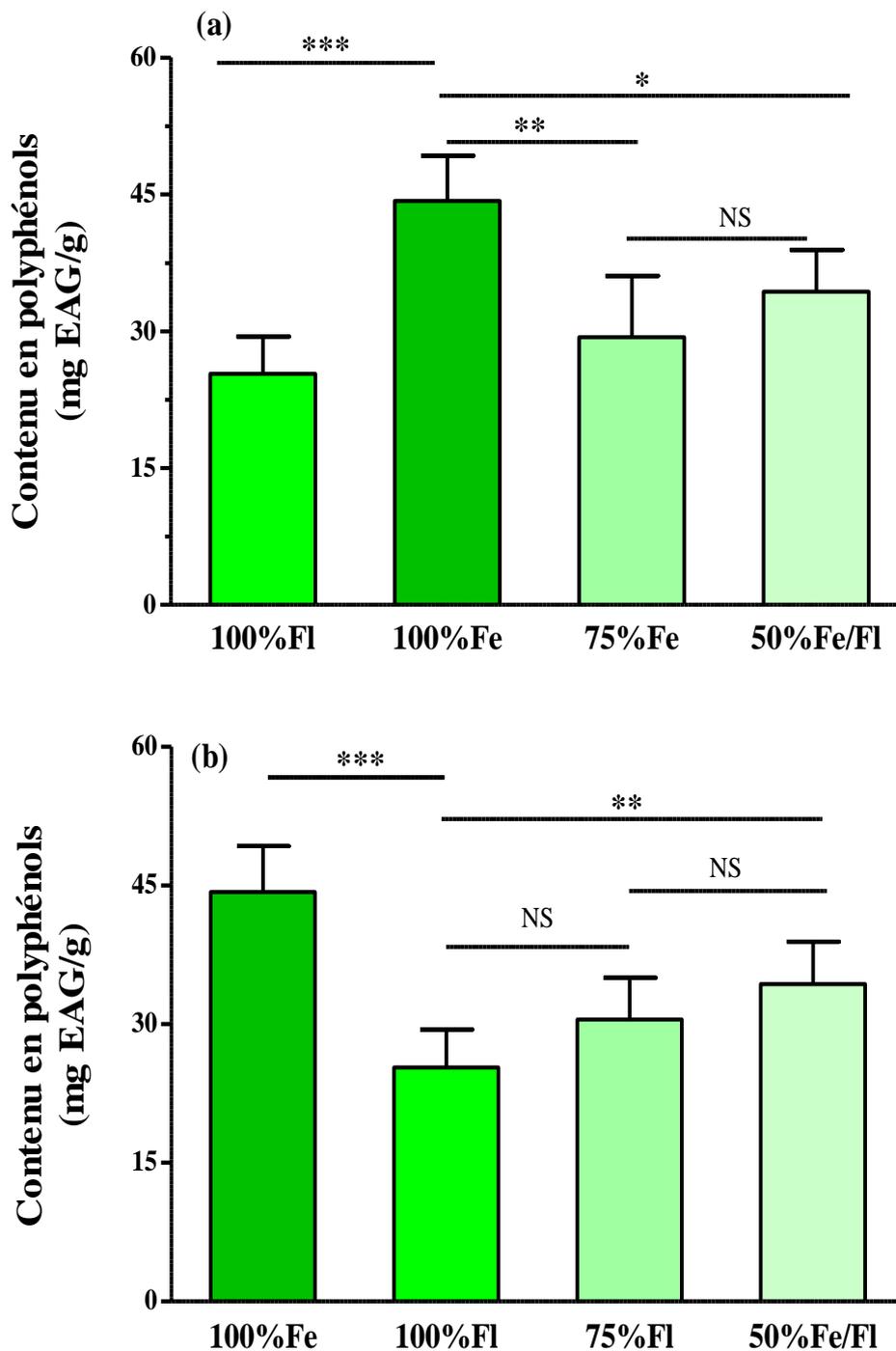


Figure 9: Teneurs en polyphénols dans les extraits des feuilles (100%Fe) et des fleurs (100%Fl) de *Hertiacheirifoliaet* dans leurs différents mélanges (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl).(a)Comparaison à l'extrait de feuilles (100%Fe).(b)Comparaison à l'extrait de fleurs (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

La teneur la plus élevée en polyphénols totaux a été obtenue dans l'extrait 100%Fe (44.29 ± 4.96 mg EAG/g), qui est significativement supérieure ($p < 0.001$) à celle obtenue dans l'extrait 100%Fl (25.33 ± 4.07 mg EAG/g). Une différence significative a été également observée par rapport aux mélanges d'extraits 75%Fe (29.35 ± 6.709 mg EAG/g ; $p < 0.001$) et 50% Fe/Fl (34.35 ± 4.56 mg EAG/g ; $p < 0.05$) (**Figure 09a**).

Pour l'extrait 100%Fl, aucune différence du contenu en polyphénols n'a été observée par rapport au mélange d'extraits 75%Fl (25.33 ± 4.07 mg EAG/g vs 30.51 ± 4.49 mg EAG/g). Par contre, une différence significative ($p < 0.05$) a été enregistrée entre l'extrait 100%Fl et 50% Fl/Fe (25.33 ± 4.07 mg EAG/g vs $34,35 \pm 4,56$ mg EAG/g, respectivement). Par ailleurs, les mélanges d'extraits 75%Fl et 50%Fl/Fe semblent avoir des contenus équivalents en polyphénols (30.51 ± 4.499 mg EAG/g vs 34.35 ± 4.56 mg EAG/g, respectivement) (**Figure 09 b**).

La différence du contenu en polyphénols entre les extraits 100% Fe et 100% Fl pourrait être expliquée par la nature des composés phénoliques contenus dans chaque extrait. Ce qui est influencé par la période de la récolte de la plante, mais aussi par la polarité du solvant d'extraction utilisé (Naczka et Shahidi, 2004).

Les résultats de la teneur en polyphénols dans les mélanges d'extraits 75%Fe et 50% Fe/Fl montrent une diminution significative du contenu par rapport à l'extrait 100%Fe. Par contre, le contenu en polyphénols du mélange 50% Fe/Fl montre une augmentation significative par rapport à l'extrait 100%Fl. Ces résultats pourraient être expliqués par la différence du contenu et de la composition en polyphénols entre les deux extraits 100%Fe et 100%Fl.

I.2. Teneurs en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué par la méthode à l' AlCl_3 , qui est une méthode simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Cette méthode permet de déterminer la teneur en flavonoïdes, qui forment un complexe avec l' AlCl_3 grâce à leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leurs groupements hydroxyles (Matyushchenko et Stepanova, 2003).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme de la matière végétale sèche (mg EQ/g), en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la quercétine (**Figure 10**).

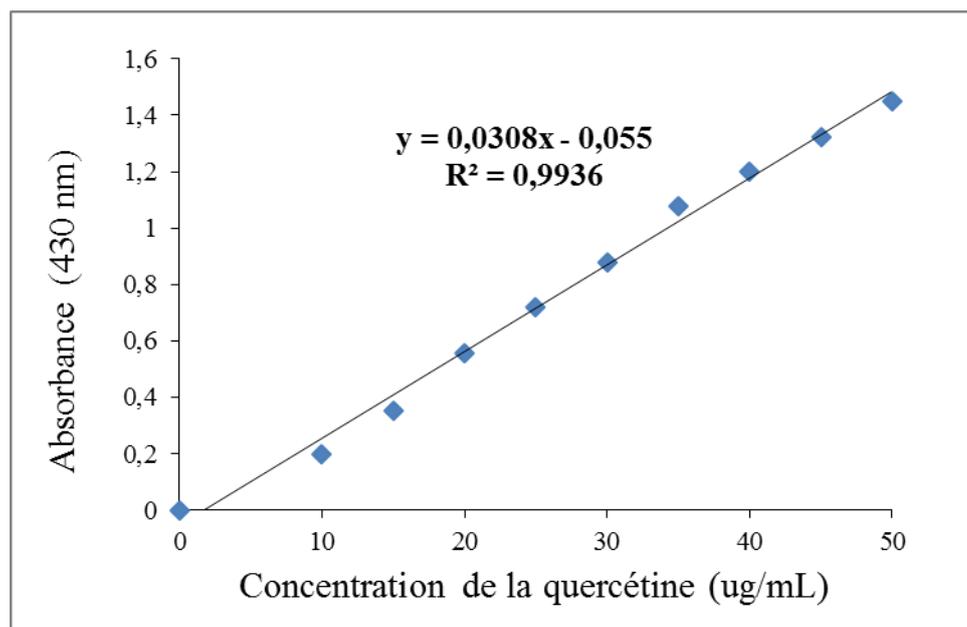


Figure 10: Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Le dosage des flavonoïdes par l'addition de l' $AlCl_3$ aux différents extraits et après incubation, a montré une coloration jaunâtre dont l'intensité était variable entre les différents échantillons. Ceci, confirme la présence des flavonoïdes dans ces extraits.

Les résultats de la quantification du contenu en flavonoïdes dans les deux extraits 100%Fe et 100%Fl ainsi que dans les différents mélanges de ces deux extraits de la plante *Hertia cheirifolia* sont présentés dans la **figure11**. Aucune différence significative de la teneur en flavonoïdes n'a été observée entre l'extrait 100%Fe (13.56 ± 2 mg EQ /g) et 100%Fl (14.99 ± 1.59 mg EQ/g). De même, aucune différence significative, n'a été obtenue entre les différents mélanges d'extraits 75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl (12.89 ± 1.71 mg EQ/g ; 15.74 ± 1.13 mg EQ/g et 13.61 ± 1.13 mg EG/g, respectivement) (**Figure 11**).

La différence entre la quantité des polyphénols mais pas entre la quantité en flavonoïdes pourrait être expliquée par la solubilité différentielle des polyphénols et des flavonoïdes dans le méthanol (Biesaga, 2011). Les flavonoïdes (di-, tri, et tétra-glycosylés) et les acides hautement polaires dissouts dans l'eau sont des substances polaires (Jones et Kinghorn, 2006). Au contraire, les substances moins polaires (dérivés d'acides phénoliques) peuvent être séparées par des solvants organiques moins polaires (Stanković, 2011).

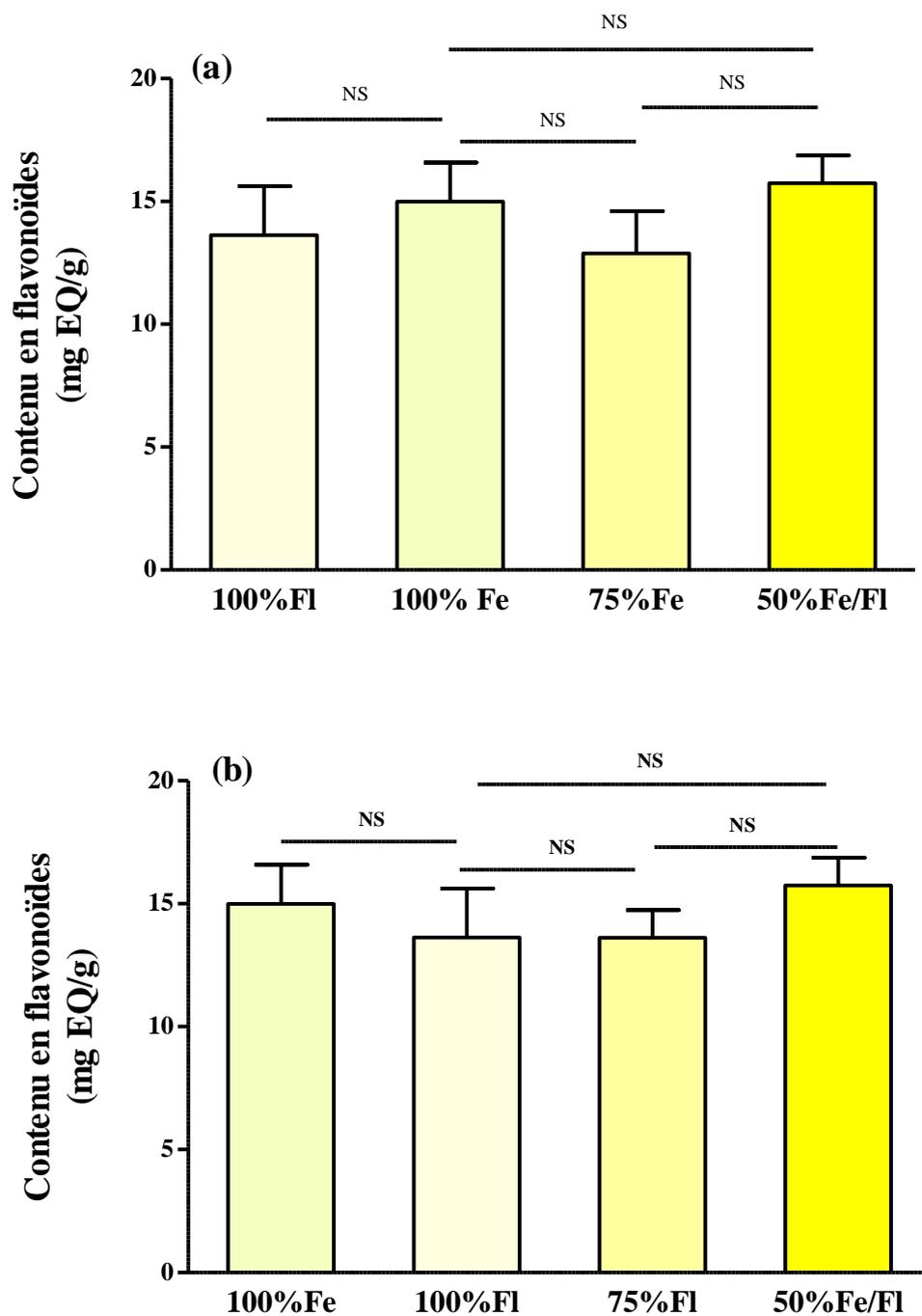


Figure 11: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles (100%Fe) et des fleurs (100%Fl) de *Hertia cheirifolia* et dans leurs différents mélanges (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl). (a) Comparaison à l'extrait de feuilles (100%Fe). (b) Comparaison à l'extrait de fleurs (100%Fl). (NS : non significatif).

I.3. Activité scavenger de radicaux libres

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'évaluer le potentiel antioxydant d'extraits naturels. Ces méthodes se différencient par leurs principes et leurs conditions expérimentales de réalisation (Wojdyło *et al.*, 2007). Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouriet *et al.*, 2009).

Dans notre étude, l'évaluation de l'activité antioxydante des différents échantillons issus des deux extraits méthanoliques de la plante *Hertiacheirifolia*, a été réalisée par deux tests analysant le piégeage du radical libre hydroxyle (HO•) et du monoxyde d'azote (NO•).

I.3.1 Piégeage du radical libre hydroxyle (HO•)

Le radical libre OH est un composé très réactif capable de réagir avec de nombreuses molécules biologiques qui se trouvent dans son milieu environnant telles que les lipides, entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. Il apparaît comme l'espèce réactive la plus toxique des radicaux libres (Gutteridge, 1993 ; Gardès-Albert *et al.* 2003).

Le test de l'activité scavenger du radical OH est basé principalement sur la dégradation du H₂O₂ en présence de métaux de transition sous leur forme réduite par la réaction de Fenton, qui nécessite l'intervention d'ions Fe²⁺ (Sequeira *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus montrent que les extraits ont un pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical hydroxyle (OH) important. L'extrait 100%Fe a montré un potentiel scavenger du OH (29.44 ± 7.99 %) plus élevé par rapport à l'extrait 100%Fl (13.66 ± 0.28%). Par contre, les extraits 75%Fe, 75%Fl et 50%Fe/Fl ont montré des activités similaires (27.49 ± 14.82 ; 23.43 ± 1.26 et 23.70 ± 3.69 respectivement). Néanmoins, l'ensemble des résultats montre qu'aucune différence significative n'a été observée entre les différents extraits. (**Figure 12**).

Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont connus par un ou plusieurs groupements hydroxyle attachés à un cycle aromatique qui va donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres pour les neutraliser et les rendre plus stables (Macheix *et al.*, 2005).

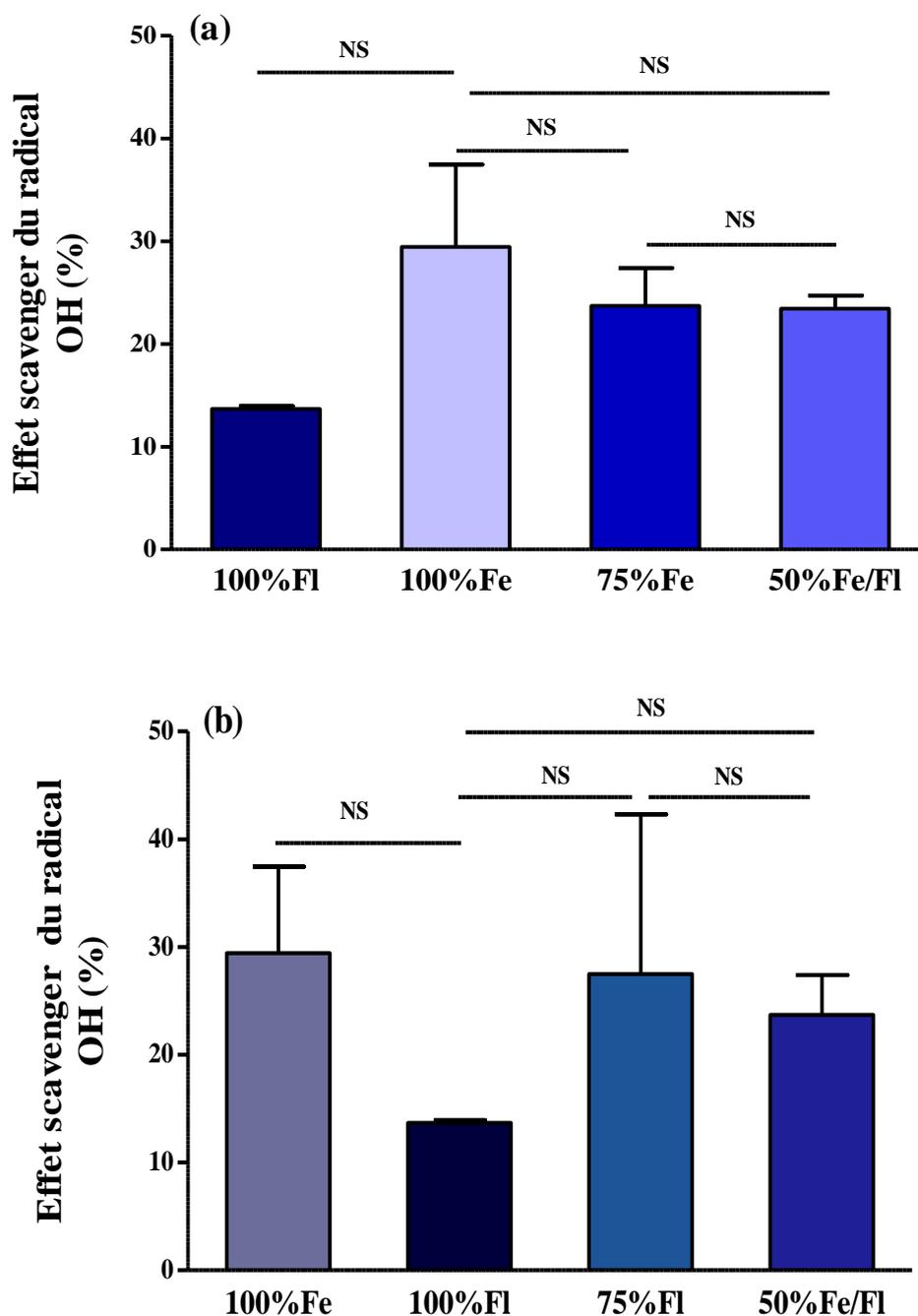


Figure 12: Effet scavenger du radical hydroxyle (OH) par les extraits de feuilles (100%Fe) et de fleurs (100%Fl) de *Hertia cheirifolia* ainsi que par leurs différents mélanges (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl). (a) Comparaison à l'extrait de feuilles (100%Fe). (b) Comparaison à l'extrait de fleurs (100%Fl). (NS : non significatif).

Selon des études antérieures, deux mécanismes neutralisant le radical hydroxyle sont impliqués ; l'un consiste à supprimer sa production et l'autre à piéger directement ce radical. Le premier est lié aux ions de transition métalliques car le peroxyde d'hydrogène est relativement stable en l'absence de ces ions. Le second serait dû à la capacité de donner un atome d'hydrogène à des groupements fonctionnels attachés à la structure moléculaire (Zhanget al., 2011). D'autres travaux ont montré également que le mécanisme par lequel les flavonoïdes diminuent la production des radicaux hydroxyles semble être par la chélation de fer libre et le piégeage direct des radicaux hydroxyles en même temps (Soucek et al., 2011).

Des nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relation structure-activités (RSA) dans le cas des flavonoïdes, Ainsi il a été montré que les activités des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupement fonctionnels (Bors et al., 1990; Rice-Evans, 1996). En effet, l'emplacement des groupes OH dans la molécule biologique (protéines, lipides, ADN) détermine l'activité antioxydante des composés phénoliques. Les groupements OH attachés aux positions C3, C4 et C5 du cycle B et les OH en C3 du cycle C, jouent le rôle principal dans l'activité antioxydante (Rice-Evans, 1996). La perte de groupes OH autres que dans cette position n'affecte pas de manière significative l'activité antioxydante des composés phénoliques. De plus, le nombre des groupes OH influence également l'activité antioxydante ; moins il y a de groupes OH, plus l'activité antioxydante est faible (Gardeli et al., 2008).

L'analyse de corrélation entre les teneurs en polyphénols dans les différents extraits étudiés et leur activité inhibitrice de l'oxydation du radical hydroxyle (OH) a montré une corrélation positive ($r = 0.73$) mais non significative ($p > 0.05$). Ceci montre que l'activité antioxydante serait étroitement liée à la teneur en composés phénoliques, Certaines études n'ont pas trouvé cette relation (Abdel-Hameed et al., 2009 ; Bakchiche et al., 2018).

I.3.2 Piégeage du radical monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur biologique impliqué dans différents processus physiologiques tels que l'homéostasie vasculaire (Parent *et al.*, 2013). C'est un radical libre diffusible dans les conditions pathologiques, réagit avec l'anion superoxyde et forme une molécule potentiellement cytotoxique, le peroxyde d'azote (ONOO⁻). Sa forme protonée, l'acide peroxyde d'azote (ONOOH), est un oxydant très fort, il cause des dommages sévères à la plupart des biomolécules par des processus d'oxydation directe ou par la génération secondaire de radicaux libres très réactifs (Lancaster, 1994).

Le nitroprussiate de sodium (NPS) en solution aqueuse à pH physiologique génère spontanément le monoxyde d'azote (NO), qui interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrites. Ces ions sont détectés par le réactif de Griess (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010). Les composés neutralisant le monoxyde d'azote se trouvent en compétition avec l'oxygène, ce qui conduit à une diminution de la production des ions nitrites.

Les résultats obtenus montrent que les extraits analysés ont un pourcentage important de l'inhibition de l'oxydation du radical monoxyde d'azote. Le potentiel scavenger le plus faible a été obtenu par les extraits 100%Fe et 100%Fl (56.41±3.06% et 53.64 ± 4.66% respectivement) (**Figure 13**). Cependant, le mélange d'extraits 50%Fe/Fl a montré le potentiel scavenger du NO le plus élevé (75.94 ±4.75%) avec une différence hautement significative ($p < 0.001$) par rapport aux extraits 100%Fe et 100%Fl. De plus, le mélange 75%Fe a montré une activité neutralisant le radical OH, supérieure à celle exercé par l'extrait 100%Fe (67.52±4.36% vs 56.41±3.06%, $p < 0.01$). De même, le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical OH par le mélange 75%Fl est significativement supérieur à celui exercé par l'extrait 100%Fl (64.22± 5.38% vs 53.64 ± 4.66% ; $p < 0.05$) (**Figure 13**).

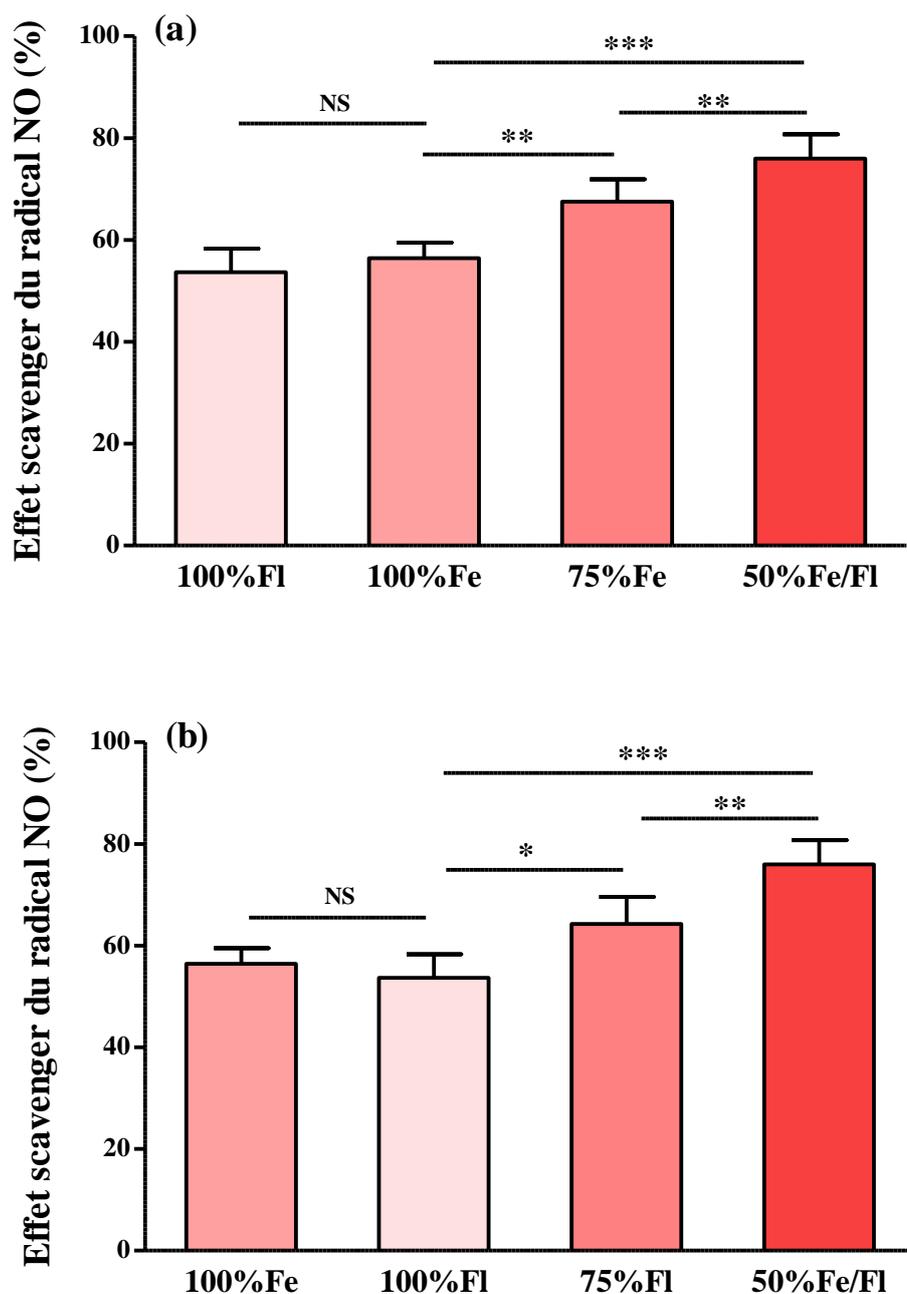


Figure 13: Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les extraits de feuilles (100%Fe) et de fleurs (100%Fl) de *Hertiacheirifolia* ainsi que par leurs différents mélanges (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl). (a) Comparaison à l'extrait de feuilles (100%Fe). (b) Comparaison à l'extrait de fleurs (100%Fl). (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

De nombreuses études ont montré l'existence d'une corrélation positive entre l'activité antioxydante et antiradicalaire d'extraits de plantes et leur contenu en composés phénoliques (Kumaran et Karunakaran, 2007). Nakagawa et Yokozawa (2002) ont montré que le thé vert peut directement piéger NO et O₂^{•-} et que son action est attribuée à ses composants phénoliques.

Par ailleurs, d'autres études ont été réalisées sur la relation activité-structure des différentes classes de composés phénoliques (Pietta, 2000 ; Cai *et al.*, 2005). Ils s'agit particulièrement des composés avec la structure orthodihydroxy phénolique tels que, la quercétine, la catéchine, l'acide gallique et l'acide caféique (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Aliaga et Lissi, 2004). Dans notre étude, les mélanges d'extraits de feuilles et de fleurs ont montré une meilleure activité de piégeage du radical NO, bien que ce ne soit pas les extraits les plus riches en polyphénols. En effet, l'analyse de corrélation a révélé qu'il n'y a aucune corrélation ($r = -0.015$) entre les teneurs en polyphénols et l'activité scavenger du NO.

L'activité antioxydante d'extraits végétaux est principalement due à leur richesse en composés phénoliques. Les flavonoïdes sont considérés comme les composés potentiels neutralisant les radicaux libres (Saeed *et al.*, 2012). L'activité antioxydante des composés phénoliques dépend de la position et du nombre de groupes hydroxyle qui peuvent agir comme réducteurs, donneurs d'hydrogène et absorbeurs d'oxygène singulet (Kristinova, 2009). Ainsi, l'activité antioxydante dépend de la quantité de polyphénols mais aussi de la composition en polyphénols et de leurs différentes structures chimiques (Abdel-Hameed *et al.*, 2009 ; Bakchic *et al.*, 2018).

CONCLUSION

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre une production accrue de radicaux libres et la capacité de défense antioxydante d'un organisme. Ces substances réactives sont produites au cours du métabolisme cellulaire et sous l'effet de facteurs environnementaux. Le stress oxydant est reconnu comme l'une des causes principales inductrices de nombreuses pathologies chroniques. Par ailleurs, les polyphénols sont des molécules bioactives principalement retrouvées chez les végétaux connues pour leurs rôles dans la prévention de certaines maladies grâce à leurs propriétés antioxydantes.

Le dosage des polyphénols totaux contenus dans les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs, ainsi que dans les différents mélanges de *Hertiacheirifolia*, a révélé que l'extrait 100%Fe est plus riche en polyphénols (44.29 ± 4.96 mg EA) par rapport à l'extrait 100%Fl (25.33 ± 4.07 mg EAG/g) avec une différence significative ($p < 0.001$). Cependant, les teneurs en flavonoïdes n'ont montré aucune différence significative entre les différents extraits analysés. Par ailleurs, les résultats des mélanges des deux extraits ont montré que le mélange 50% Fe/Fl contient des teneurs en polyphénols significativement supérieures ($p < 0.05$) à celles contenues dans l'extrait pur 100% Fl (34.35 ± 4.56 mg EAG/g vs 25.33 ± 4.07 mg EAG/g, respectivement).

L'évaluation du potentiel antioxydant scavenger de radicaux libres par les extraits méthanoliques de *Hertiacheirifolia* 100%Fe et 100%Fl, ainsi que par leurs différents mélanges a montré que l'activité scavenger du radical monoxyde d'azote (NO) exercé par le mélange d'extrait 50%Fe/Fl ($75.94 \pm 4.75\%$) est significativement supérieure ($p < 0.001$) à celui obtenu avec les deux extraits purs 100%Fe et 100%Fl. Par contre, un effet similaire a été obtenu contre le radical hydroxyle (OH).

L'ensemble de ces résultats révèle que les deux extraits de *Hertia cheirifolia* sont dotés d'un potentiel antioxydant probablement lié à leur contenu en composés phénoliques. Néanmoins, ce potentiel serait plus dépendant de la diversité de structures chimiques de ces composés et probablement des interactions entre ces composés pouvant améliorer leur potentiel antioxydant. Ainsi, la plante médicinale *Hertia cheirifolia*, en plus de son usage en médecine traditionnelle, constitue source à exploiter dans le développement de bio-molécules d'intérêt thérapeutique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographique

Abdel-hameed ESS. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food chemistry* 2009 ; 144(4) : 1271-1277.

Abdelouhab K. Activités anti inflammatoires et anti-arthritiques d'extraits de *Hertiacheirifolia* chez la souris et le rat avec arthrite rhumatoïde expérimentale. Thèse de doctorat en sciences. Université Ferhat Abbas Sétif 1 2021 ; p 57.

Aclinou P, Massiot, G. Absolute configuration of eremophilanolide from *Hertiacheirifolia*. *Phytochemistry* 1993 ; 34 : 859-860.

Aclinou P, Benkouider A, Massiot G. Le men-olivier, L. Eremophilanolides from *Hertiacheirifolia*. *Phytochemistry* 1991 ; 30 : 2083-2084.

Akyol O, Zoroglu S, Armutcu F, Sahin S, Gurel A. Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo* 2004 ; 18(3) : 377-390.

Aliaga C, Lissi AE. Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry* 2004 ; 82 : 1668-1673.

Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N. Structure-radical Scavenger activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta* 2003 ; 76(1) : 55-61.

Ammar S, Edziri H, Mahjoub MA, Chatter R, Bouraoui A, Mighri Z. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertiacheirifolia*. *Phytomedicine* 2009 ; 16 : 1156-61.

Amrani J K, Glories Y. Tanins et Anthocyanes : Localisation dans la Baies de raisin et mode de leur extraction. *Rev Fr Oenol* 1995 ; 153 : 28-31.

Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Cellk S, Bektas O, Berker K, Ozyurtd EK. Comparative evolution of various total antioxidant capacity assays and their contribution in the prevention and treatment of the metabolic syndrome 2007; 06-07.

Aquaron M. Relation entre l'homme et les plantes médicinales . <<[http://www. hominidé.com](http://www.hominidé.com) 2005.

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Bammou M, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *ArzneimForsch /DrugResearch* 2015 ; 46(11):1086-1089.

Bakchiche B, Habati M, Benmebarek A, Gherib A. Caractéristiques physico-chimique, concentrations des composés phénoliques et pouvoir antioxydant de quatre variétés de miel local (Algérie). *Revue Marocaine des sciences Agronomique et Vétérinaire* 2018 ; 6(1) : 188-123.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Pnas* 1990 ; 87:1620-24.

Berger MM. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2006 ; 20: 48-53.

Biaglow JE, Mitchell JB, Held K. The importance of peroxide and superoxide in the X-ray response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992 ; 22:665-669.

Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2011 ; 1218 : 2505-2512.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy organization* 2012 ; 5(1): 9 -19.

Boizot N, Charpentier J P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés Phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'inra* 2006 ; 79-82.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Method Enzymol* 1990 ; 186: 343-355.

Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeau JL, Therond P, Legrand A, Delatter J. Le stress oxydant, fonction vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2002 ; 16 : 260-267.

Bouriche H, Kada S, Assaf AM, Senator A, Gül F, Dimertas I. Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharmaceutical Biology*. 2016 ; 54 : 2584-2590.

Bousselsela H, Benhouda A, Yahia M, Benbia S, Ghecham A, Zidani A. In vitro evaluation of antioxidant and antibacterial activities of extracts of *Hertia cheirifolia*. 39;s leaves. *Nat Sci*, 2012 ; 4 : 825-831.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein. Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991 ; 351:714-8.

Burnie G, Forresster S, Greig D, Guest S, Harmony M, Hopley S, Jackson G, Lavarack P, et al. *Botanica, Encyclopédie de botanique et d'horticulture. Editions places des victoires, Paris* 2006 ; 120-626.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem* 2002; 383(6): 93.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000 ; 87(10) :840-4.

Cai Y Z M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure radical scavenging activity relations hips of phenolic compound from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*2005 ; 1-17.

Cheeseman K, Slater H. An introduction to free radicals biochemystry.*British Médical Bulletin*,1993; 49: 481-493.

Chen Ch, Qu L, Li B. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem* 2005 ; 51 :759-767.

Chiu SM, Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL. Copper ion-mediated sensitization of nuclear matrix attachment sites to ionizing radiation. *Biochemistry*. 1993; 32: 6214-6219.

Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications.*Environ Health Perspect*1985; 64:111-126.

Conklin KA et al., chemotherapy – associated oxidative stress : impact on chemotherapeutique effectiveness. *Integrative cancer therapies*. 2004 ; 7(2) :66 – 76.

Corrales M, Fernandez GA, Butz P, Bernhard TP. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure ; *Journal of FoodEngineering*2009 ; 90: 415-421.

Dai JA, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties.*Molecules*2010 ; 15: 7313-7352.

Da Silva SL, Da Silva A, Honório KM, Marangoni S, Toyama MH, Da Silva A.B.F. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase.*Journal of Molecular Structure* 2004 ; 684:1-7.

Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D. Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris: Lavoisier 2005: 281-309.

Ebrahimzadeh MA, Nabav SM, Nabavi SF, Bahramian F, Bekhradnia AR. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V.odorata* P, *hyrcana* and *C. speciosum*. *Pakistan journal of pharmaceutical science* 2010; 23: 29-34.

Edeas M. Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie* 2005 ; 3 : 271-273.

El Gharras H. Polyphenols : Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*2009 ; 44(12) : 2512-2518.

Esterbauer H, Zollner H.Méthds for determinationof aldehydic lipid peroxydation products *Free Rad.Biol. Med*1989; 7 (2): p 197-203.

Fang Y Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition.*Nutrition*, 2002 ; 18:872-879.

Favier A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 2003; 108-115.

Fleuriet A, Jay-Allemand C, Macheix JJ. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*. 2005 ; 121-216.

Fraga CG, Oteiza PI. Dietary flavonoids : role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 2011 ; 51(4) : 813- 823.

Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* 2008 ; 107 :1120-1130.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique* 2003 ; 91-96.

Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes : A compilation of cause and consequence. *Free radical research communications* 1993 ; 19: 141-1583.

Guignard J L. Abrégé de biochimie végétale. *Ed. Masson, Paris* 1996 ; 160 p. 67.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O, Calier C, Chapelle J P. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege* 2007 ; 62(10): 628- 638.

Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants ? What do we learn from cell culture and in vivo studies *Arch Biochem Biophys* 2008 ; 476: 107-112.

Halliwell B, Clement MV, Long IH. Hydrogen peroxide in the human body. *Federation of European Biochemical Societies* 2000; 486: 10-13.

Handique J, Baruah B. Polyphénolic compound : an overview. *React Funct Polym* 2002 ; 52 :193-188.

Harborne JB, Swain T. Perspectives In Phytochemistry. Academic Press, London, New York. 1969.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002 ; 13 : 572-584.

Hemingway RW, Ohara S, Steynberg JP, Brandt EV, Ferreira D, Chhetcor NMR studies of proanthocyanidins and their derivatives. In plant polyphenols. *Springer us* 1992 ; 321-337.

Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. Heywood V-H. *Las plantas con flores*. Ed. Reverté España 2004 ; p329.

Heywood VH. *Las plantas con flores*. 1985, Ed. Reverté. España. p : 329.

- Hiltermann JT, Lapperre TS, van Bree L, Steerenberg PA, Brahim JJ. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new non-invasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:1448-1454.
- Houée Levin C, Sicard Roselli C, Bergès J. Encyclopedie des plantes medicinales. Chimie et Biochimie Radicales. Edition Belin. Iserin P. Paris-France : Larousse Bordas 2005; 14.
- Iserin P. Encyclopedie des plantes medicinales. Paris-France : Larousse Bordas, 2001 ; 14
- Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of plant secondary metabolites. In: Methods in biotechnology, natural products isolation. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Eds. 2nd ed. Humana press, Inc., Totowa, New Jersey 2006 ; 20.
- Koehlin-Ramonatxo C. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique* 2006 ; 20:165-177.
- Kostyuk VA, Potapovich AI, Strigunova EN, KostyukTV, Afanas'ev IB. Experimental evidencethat flavonoid metal complexes may act as mimics ofsuperoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 2004 ; 428: 204-208.
- Krishna D, Chaluvadi M, Raj N, Sripal R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian, Journal of Pharmacology* 2001 ; 33: 2-16.
- Kristinova V, Mozuraityte R, Storro I, Rustad T, antioxydant activity of phenolic acids in lipid oxydation catalysed by different prooxydants. *Journal of agricultural and food chimistry* 2009 ; 75 (21) : 10377-10385.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelci N, Mhamdi B, Chaieb K, Bacrouf A. Antioxydant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte tamarix gallica L and related polyphenolic constituents. *F ood and Chiminal Toxicology* 2009 ; 47 : 2083-2091.
- Kumaran A, Karunakaran R J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *LWT - Food Science and Technology* 2007 ; 40: 344-352.
- Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 8137-8141.
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, ageing and Antioxydative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2004 ; 21-32.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale* 2001 ; 30: 1076-1081.
- Li HB, Cheng KW, Wong C, Fan KW, ChenF, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 2007; 102 : 771-776.

Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques. *Edition techniques et documentation Lavoisier* 2005.

Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P. Les polyphenols en agroalimentaire. *Ed. Technique et documentation, Paris. France* 2006 ; p 398.

Majouli K, Mahjoub MA, Rahim F, Hamdi A, Wadood A, Hlila MB, Kenani A. Biological properties of *Hertia cheirifolia* L. flower extracts and effect of the nopol on α -glucosidase. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017 ; 95, 757-761.

Márquez-García B, Fernández MÁ, Córdoba F. Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *BioresourceTechnology* 2009 ; 100: 446-451.

Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995 ; 77: 147-161.

Massiot G., Nuzilliard JM., Le Men-Olivier Louisette, Aclinou P., Benkouider A., Khelifa A. Eremophilanolides from *Hertiacheirifolia*. *Phyrochemistry* 1990 ; 29.

Matthay MA, Geiser T, Matalon S, Ischiropoulos H. Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27:2028-2030.

Matyushchenko N, Stepanova T. Quantitative determination of the total content of flavonoids in the new phytopreparation Elima. *Pharm Chem J* 2003;37:261-263.

Moreira-Muñoz A, Muñoz-Schick M. Classification, diversity, and distribution of Chilean Asteraceae : implications for biogeography and conservation. *Diversity and Distributions* 2007 ; 13 : 818-828.

Naczka M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A* 2004 ; 1054 : 95-111.

Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*. 2002 ; 40: 1745-1750.

Nawaz H, Shi J, Mittal G S, Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration, Separation and Purification. *Technology* 2006 ; 48: 176- 181

Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn D, Boelens PG, Norren K, Leeuwen P. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001 ; 74: 418-425.

Oren-Shamir M, Shaked-Sachray L, Nissim-Levi A, Weiss D. Effect of growth temperature on *Aster* flower development. *Hortscience* 2000 ; 35(1) : 28-29.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009 ; 2(5) : 270-278.

Parent M, Dupuis F, Maincent P, Vigneron C, Leroy P, Boudier A. Quel Avenir en Thérapeutique Cardiovasculaire pour le Monoxyde d'Azote et ses Dérivés ? *Ann Pharm Fr.* 2013, 71 (2), 84-94.

Pietta P.G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000 ; 63:1035-1042.

Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster S J, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer C.H. Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defence processes in tobacco. *Plant Physiol* 2006 ; 141, 423-435.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. Action of antioxidant defenses. *Nutrition Clinique et Métabolisme. Physiological* 2002 ; 16: 233-239.

Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry* 1994 ; 36 : 781-784.

Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Tome I* 1963 ; 925 : 956- 957.

Rajamanikandan S, Sindhu, T, Durgapriya D, Sophia D, Ragavendran P, Gopalakrishnan VK. Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by invitro assays. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2011 ; 45(4), 310-316.

Rice-Evans C, Miller NJ, Bolwell GP, Bramley PMP, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995 ; 22:375-383.

Rice-Evans CA, Miller N J, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 20: 933-95.

Ribereau-Gayon. Les composés phénoliques des végétaux, *Dunod Éd. Paris* 1968.

Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Antioxydants activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla*. *Complementary and alternative medicine* 2012 ; 12 :221-233.

Sequeira SAV, Rao RA. Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. *Adv Biosci Biotechnol* 2012 ; 3 : 951-956.

Sorg O. Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* 2004 ; 327: 649-662.

Soucek P, Kondrová E, Hermanek J, Stopka P, Boumendjel A, Ueng YF, Gut I. New model system for testing effects of flavonoids on doxorubicin-related formation of hydroxyl radicals. *Anti-cancer drugs* 2011 ; 22 (2): 176-184.

Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide. The roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Rad Biol Med* 1998 ; 25 : 392-403.

- Sreejayan N, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J.Pharm. Pharmacol.*1997 ; 49 :105-107.
- Stanković MS. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci*2011 ; 33 :63-72.
- Tachakittirungrod S, Ikegami F, Okonogi S. Antioxidant Active Principles Isolated from *Psidium guajava* Grown in Thailand. *Sci Pharm*2007; 75:179-193.
- Valko M, Rhodes CJB, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.*2006 ; 160: 1-40.
- Vamecq J, Vallee L, Storme L, Gele P, Bordet R. Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*2004 ; 18(1) : 16-23.
- Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 2001 ; II.1.1-II.1.8.
- Wojdyło A, Oszmian J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compound content of 32 selected herbs. *Food Chemistry*2007 ; 105(3): 940-949.
- Yoshikawa T, Yamamoto Y, Naito Y. Free radicals in chemistry, biology and medicine ed. *oicia international, londres* 2000.
- Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 2011 ; 233 : 1-12.
- Zhang Y, Lu X, Fu Z, Wang Z, Zhang J. Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. *Food chemistry*2011 ; 127 (3) : 1084-1090.
- Zheng X, Wang W, Piao H, Xu W, Shi H, Zhao C. The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae) : Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Journal molecules* 2013 ; 18 :8298.
- Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-sod (sod1), Mn-sod (sod2), and Fe-sod (sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology and medicine* 2002; 33: 337-349.

ANNEXE

Annexe 1

1.2 Réactifs et appareillages

1.1.1 Réactifs

- Folin-Ciocalteu (acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et acide Phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_{40}$).
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).
- Acide gallique ($C_7H_6O_5$).
- Quercétine ($C_{15}H_{10}O_7$).
- Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).
- Sulfate ferreux ($FeSO_4$).
- Acide salicylique ($C_7H_6O_3$).
- Salicylate de sodium ($C_7H_5NaO_3$).
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- Sulfanilamide ($C_6H_8N_2O_2S$).
- N-1-Naphtylethylènediamine dihydrochloride (NEDD).
- Acide phosphorique (H_3PO_4).
- Nitroprussiate de sodium (NPS)
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Chlorure de potassium (KCl)
- Hydrogénophosphate (Na_2HPO_4)
- Phosphate de monopotassium (KH_2PO_4)

1.2.2 Appareillages

- Balance de précision (Radwag xa 310).
- Vortex (Velp scientifica).
- pH-mètre (Bante instruments &20).
- Bain-marie (Raypa thermostatic bath).
- Plaque agitatrice (Velp scientifica)
- Centrifugeuse (M01).
- Spectrophotomètre UV-visible (Biotechengineering Management co.ltd. (uk) uv-900).

Résumé

Hertia cheirifolia est une plante médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle, appartenant à la famille des *Asteraceae*. Cette étude a été réalisée dans l'objectif d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits méthanoliques des feuilles (100%Fe) et des fleurs (100%Fl) de *H. cheirifolia*. Différents mélanges de ces deux extraits (75%Fe, 75%Fl et 50% Fe/Fl) ont été également analysés. Des dosages colorimétriques ont été d'abord effectués pour évaluer la quantité des composés phénoliques contenus dans ces extraits. La capacité antioxydante a été ensuite analysée par deux tests de piégeage du radical libre hydroxyle (HO•) et du monoxyde d'azote (NO). Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait 100%Fe est significativement ($p < 0.001$) plus riche en polyphénols (44.29 ± 04.96 mg EAG/g d'extrait) que 100%Fl (25.33 ± 4.078 mg EAG/g d'extrait). De plus, l'évaluation du pouvoir scavenger des radicaux libres a montré que le mélange d'extraits 50% Fe/Fl possède un potentiel neutralisant le NO ($75.94 \pm 4.75\%$) significativement élevé ($p < 0.001$) par rapport aux extraits purs analysés (100% Fe et 100%Fl). Ces résultats confortent l'utilisation de cette plante pour traiter certains troubles liés au stress oxydant.

Mots clés : *Hertia cheirifolia*, polyphénols, effet scavenger, radical hydroxyle (OH), monoxyde d'azote (NO).

Abstract

Hertia cheirifolia is a medicinal plant widely used in traditional medicine. It is belonging to the *Asteraceae* family. This study was carried out aim to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of *H. cheirifolia* methanolic extracts of the leaves (100%Fe) and flowers (100%Fl). Different mixtures of these two extracts (75%Fe, 75%Fl and 50% Fe/Fl) were also analysed. Colorimetric assays were first performed to evaluate the amount of phenolic compound contained in these extracts. The antioxidant capacity was then analysed by two scavenging tests for free hydroxyl radical (HO-) and nitric oxide (NO). the Results revealed that the 100%Fe extract is significantly ($p < 0.001$) richer in polyphenols (44.29 ± 04.96 mg EAG/g extract) than 100%Fl (25.33 ± 4.078 mg EAG/g extract). Moreover, the evaluation of the free radical scavenging potential showed that the 50% Fe/Fl extract mixture has a significantly ($p < 0.001$) high NO neutralising power ($75.94 \pm 4.75\%$) compared to the analysed pure extracts (100% Fe and 100%Fl). These results support the use of this plant to treat some disorders that are related to oxidative stress.

Key-words: *Hertia cheirifolia*, polyphenols, scavenger effect, hydroxyl radical (OH), nitric oxide (NO).