

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée



Réf :

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

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante d'extraits
organiques de *Hertia cheirifolia in vitro***

Présenté par :

M^{elle} AYADI Lysa & M^{elle} AZEROU Kenza

Soutenu : 11 septembre 2022

Devant le jury :

M ^{me} KADJI-DJOUDAD H.	Professeur	Présidente.
M ^{me} ABDELOUHAB K.	MCB	Encadreur.
M ^{me} KHIREDDINE-REMILA S.	MCB	Examinatrice.

Année universitaire : 2021/2022

Dédicace

Avant tout, je remercie Dieu, le Miséricordieux de m'avoir donné le courage, la force et la patience pour réaliser ce mémoire.

A mon très cher père, mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant, pour son soutien, ses encouragements, ses conseils, et son sacrifice afin que rien n'empêche le déroulement de mes études. Ce travail est le fruit des sacrifices qui sont consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère, Qui représente pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Dieu te garde maman.

A mes deux frères : « Walid » et le petit « Aris ».

A mes sœurs : « Sonia », « Sihem » et « Melissa ». Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite. J'exprime aussi mes sentiments de fraternité et d'amour.

A tout la famille « AYADI »

A ma promotion de biochimie appliquée année 2022.

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

LYSA

Dédicace

*Au nom de Dieu le tout puissant, celui qui m'a donné la vie et qui m'a permis
d'apprendre Et d'acquérir ce savoir, je dédie ce modeste travail :*

*♡ À ma très chère honorable mère **FATIMA** ♡*

*La lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et
mon bonheur ; maman je t'adore.*

*♡ À mon très cher père **AZIZ** ♡*

*L'homme de ma vie tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête,
de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Ton soutien fut une
lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait
exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi*

*Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos
encouragements. J'implore Dieu le tout puissant, de vous accorder une longue vie.*

*♡ À mes deux chers frères **WAHIB** & **BORZAK** ♡*

*♡ À ma très chère sœur, mon ange **FETIA** ♡*

*♡ À ma belle-sœur **SOUHILA** ♡*

*♡ À ma meilleure amie, ma jumelle **WISSAM** ♡*

*♡ À TOUTE MA FAMILLE **AZEROU** ♡*

*♡ À la mémoire de mon cher oncle **SAID**, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis ♡*

*♡ **KENZA** ♡*

Remerciements

Arrivant à la fin de ce travail, nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Dieu le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la volonté tout au long de nos études pour arriver là et atteindre nos objectifs.

Nos profondes reconnaissances et gratitude vont à : Mme.

ABDELOUHAB KATIA

Pour avoir guidé et dirigé ce travail dans le bon sens et pour sa disponibilité, ces conseils judicieux et valeureux, ses orientations et sa patience.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury, Mme KADJI-DJOUHAD et Mme KHIREDDINE-REMILA qui ont bien voulu prendre de leur temps pour juger ce travail.

Sans oublier de remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire de la faculté, et plus particulièrement l'ingénieur pour leur aide et leur soutien.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

I. Revue bibliographique

1. Stress oxydant 2

1.1 Radicaux libres et espèces réactives 2

1.1.1 Espèces réactives oxygénées et azotées 2

1.2 Sources des espèces réactives oxygénées 4

1.2.1 Sources endogènes 4

1.2.2 Sources exogènes 5

1.3 Conséquences du stress oxydant 6

1.3.1 Peroxydation des lipides 7

1.3.2 Oxydation des protéines 7

1.3.3 Oxydation l'ADN 7

2. Système antioxydant 9

2.1 Antioxydants endogènes 9

2.1.1 Systèmes enzymatiques 9

2.1.2 Systèmes non enzymatiques 10

2.2 Antioxydants exogène 10

2.2.1 Les vitamines 11

2.2.2 Les caroténoïdes 11

2.2.3 Les polyphénols 11

2.3 Les polyphénols 12

2.3.1 Les acides phénoliques	12
2.3.2 Les flavonoïdes	12
2.3.3 Mécanisme d'action des polyphénols	15
3. <i>Hertia cheirifolia</i>.....	18
3.1 Description botanique	18
3.2 Classification et systématique	19
3.3 Utilisations traditionnelles	20

II. Matériel et méthodes

1. Matériel	21
1.1 Matériel végétal	21
1.2 Matériel non biologique	21
2. Méthodes	22
2.1 Dosage des polyphénols et flavonoïdes	22
2.2 Analyse de l'activité scavenger de radicaux libres	23
3. Analyse statistique	24

III. Résultats et discussions

1. Contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux	25
1.1 Contenu en polyphénols	25
1.2 Contenu en flavonoïdes.....	28
2. Activité antioxydante	30
2.1 Piégeage des radicaux d'hydroxyles	31
2.2 Piégeage du monoxyde d'azote (NO).....	34
Conclusion	37
Références bibliographiques.....	38

Annexe

Liste des abréviations

AG : Acide gallique

EQ : Equivalent en quercétine

ERA : Espèces réactives de l'azote.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GSSH : Glutathion oxydé.

LDL : Low density lipoprotein.

MDA : Malondialdéhyde

MPO : Myéloperoxydase.

NADH: Nicotinamide adénine dinucleotide d'hydrogène.

NADPH: Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate.

NOS : NO-Synthase

RNOS : Les espèces réactives du monoxyde d'azote.

ROO· : Radical peroxy.

ROOH : Hydroperoxydes lipidiques.

SH : Groupements sulfhydrile.

SOD : Superoxyde dismutase.

XD : Xanthine déshydrogénase

XO : Xanthine oxydase.

XOR : Xanthine oxydoréductase

Liste des figures

Figure 1 : Production des ERO au niveau de la chaîne respiratoire	4
Figure 2: L'effet des ERO/ERA sur les biomolécules (ADN, lipides et protéines) utilisées comme biomarqueurs du stress oxydant dans l'environnement cellulaire	8
Figure 3: Structure chimiques des acides hydroxycinnamiques et des acides hydroxybenzoïques	13
Figure 4: Structure de base d'un flavonoïde.....	13
Figure 5: Caractéristiques structurales des flavonoïdes une activité de piégeage des radicaux.....	16
Figure 6: Réduction des ERO (R•) par les flavonoïdes.....	16
Figure 7: Photographie de la plante de <i>Hertia cheirifolia</i>	19
Figure 8: Droite standard à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.....	25
Figure 9: Teneurs en polyphénols dans les extraits des racines de <i>Hertia cheirifolia</i> et dans leurs différents mélanges	27
Figure 10: Droite standard à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	28
Figure 11: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des racines et des tiges de <i>Hertia cheirifolia</i> et dans leurs différents mélanges	29
Figure 12: Effet scavenger du radical hydroxyle (OH) par les extraits de racines et de tiges de <i>Hertia cheirifolia</i> ainsi que par leurs différents mélanges	32
Figure 13: Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les extraits de racines et de tiges de <i>Hertia cheirifolia</i> ainsi que par leurs différents mélanges	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les espèces réactives radicalaires et non radicalaires	3
Tableau 2 : Les principales classes des flavonoïdes	14

INTRODUCTION

L'oxydation est un phénomène indispensable à la vie ; elle permet de produire l'énergie nécessaire aux cellules pour survivre et se défendre contre les agressions extérieures. Ce processus génère entre autres des espèces réactives de l'oxygène hautement toxiques, capables de réagir avec les constituants cellulaires et provoquent ainsi des effets néfastes dans l'organisme (Cardenas *et al.*, 2013). Dans la situation où les systèmes antioxydants de l'organisme sont insuffisants face à une production accrue en radicaux libres, apparaît le phénomène de stress oxydant. Ce dernier est à l'origine de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Liguori *et al.*, 2018). Ces dernières années, beaucoup d'attention est accordée à l'utilisation d'antioxydants d'origine végétale pour remplacer les molécules de synthèse (Taviano *et al.*, 2013). Les plantes médicinales constituent une source importante et inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées. De plus, il est largement démontré que ces propriétés thérapeutiques sont fortement corrélées à la présence de composés bioactifs dont les polyphénols qui sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Ngom *et al.*, 2014 ; Simioni *et al.*, 2018).

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressées à la valorisation d'une plante médicinale appartenant à la famille des *Asteraceae*. Cette plante est appelée *Hertia cheirifolia*. L'objectif de notre étude est de quantifier les composés phénoliques puis d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante des extraits de tige et de racine ainsi que les mélanges de ces deux extraits. Notre travail est réalisé en deux parties principales :

- 1-Analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de tige et racine et des mélanges.**
- 2-Etude de l'activité antioxydante *in vitro* par estimation du pouvoir scavenger de deux radicaux libres : OH et NO par les extraits de tige, de racine et de leurs mélanges.**

Ce manuscrit est subdivisé en trois parties ; la première partie est consacrée pour la revue bibliographique dont on a présenté des généralités sur le stress oxydant, le système anti oxydants, ainsi la plante médicinale *Heitia cherifolia*, par contre la deuxième partie est consacrée pour matériel et méthodes dont on a exposé les différentes métaux expérimentaux, la troisième partie synthétise les résultats et discussions de notre travail.

I. Revue
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes antioxydants. Dans les conditions normales et à faible dose, les espèces réactives de l'oxygène ont un rôle important dans divers mécanismes physiologiques, notamment l'apoptose, la défense immunitaire et la régulation de la dilatation capillaire (Favier, 2003). Le stress oxydant correspond à un excès d'espèces réactives toxiques non contrôlé par les systèmes de protection de l'organisme (Zbadi *et al.*, 2018). Cet excès est un facteur clé aboutissant à des dommages structurels et fonctionnels souvent irréversibles. Ces dommages sont impliqués dans le développement de nombreuses pathologies chroniques telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardio-vasculaires, le diabète et l'accélération du vieillissement (Bensakhria, 2018 ; Zbadi *et al.*, 2018).

1.1 Radicaux libres et espèces réactives

Un radical libre est une espèce chimique ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbitale externe (Halliwell, 2006). Cette propriété lui confère une grande instabilité, d'où son extrême réactivité et sa très courte demi-vie (nano- à milliseconde). En effet, ce composé a toujours tendance à capturer un électron pour devenir plus stable et va donc réagir avec d'autres molécules cellulaires (Peña-Bautista *et al.*, 2019). Il se comporte comme oxydant ou comme réducteur afin d'apparier son électron célibataire, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Favier, 2003 ; Merouane *et al.*, 2014).

Les radicaux libres sont dérivés de l'oxygène (ERO), ou de l'azote (ERA). Ils peuvent être radicalaires ou non radicalaires (Halliwell et Whiteman, 2004).

1.1.1 Espèces réactives oxygénées et azotées :

Les espèces réactives de l'oxygène sont des espèces chimiques provenant de l'oxygène. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants en raison de l'importance du métabolisme aérobie (Valko *et al.*, 2007). Les ERO incluent le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxy (ROO^{\cdot}), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) (Singh *et al.*, 2019).

Par ailleurs, les espèces réactives de l'azote (ERA) sont générées de la réaction de l'oxygène avec l'azote, ayant à la fois un pouvoir d'oxydation et de nitrification (Ye *et al.*, 2015). Les ERA incluent le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), l'anion peroxydite (ONOO^-) et d'autres oxydes d'azote produits par la réaction du NO avec l'O_2 (Singh *et al.*, 2019). Les principales espèces réactives radicalaires et non radicalaires sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Les espèces réactives radicalaires et non radicalaires (Pisoschi et Pop, 2015 ; Phaniendra *et al.*, 2015) .

Espèces réactives radicalaires	
ERO /ERA	Propriétés
Anion superoxide $\text{O}_2^{\bullet-}$	C'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Il résulte d'une réduction de l'O_2 par diverses oxydases telles que la NADPH oxydase.
Radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$	Produit à partir de H_2O_2 par la réaction de fenton en présence de métaux de transition sous leur forme réduite telle que Fe^{2+} . C'est un radical libre très réactif à une demi-vie extrêmement courte. Il est capable de réagir fortement avec des molécules organiques et inorganiques
Monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$	Produit par la réaction catalysée par la NO synthétase à partir de l'arginine. Il se combine à l'O_2 ou à d'autres radicaux libres contenant de l'oxygène pour produire des espèces réactives de l'oxyde d'azote (RNOS).
Espèces réactives non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	Produit de la dismutation de $\text{l'O}_2^{\bullet-}$ par la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène peut interagir avec les métaux de transition, comme le fer et le cuivre, <i>via</i> la réaction de Fenton pour former un radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ hautement réactif.
Acide hypochloreux HOCl	L'acide hypochloreux est généré à partir du peroxyde d'hydrogène par une réaction catalysée par la myéloperoxydase (MPO) en présence de l'anion chlorure. L' HOCl induit une chlorination oxydative de biomolécules.

1.2 Sources des espèces réactives oxygénées :

Les espèces réactives oxygénées sont générées par le fonctionnement normal de notre organisme mais aussi en état anormal en cas de déséquilibre (sources endogènes). Leur production peut également être stimulée et intensifiée par de nombreux éléments extérieurs (sources exogènes) (Liguori *et al.*, 2018).

1.2.1 Sources endogènes

1.2.1.1 Membranes mitochondriales

Les espèces réactives de l'oxygène sont principalement produites en majorité au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules (Figure 1). Environ 90% de l'oxygène consommé durant la respiration cellulaire est réduit en eau, tandis que 5% se transforme en espèces réactives d'oxygène (Brand, 2010). Cette transformation est liée à la présence de plusieurs enzymes au niveau des membranes mitochondriales telles que la NADH déshydrogénase qui réduit l' O_2 en O_2^- . Les anions superoxydes sont ensuite dismutés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Becker, 2004). La perte d'électrons d'origine mitochondriale semble être la source principale d'ERO dans la cellule (Beaudeau *et al.*, 2005).

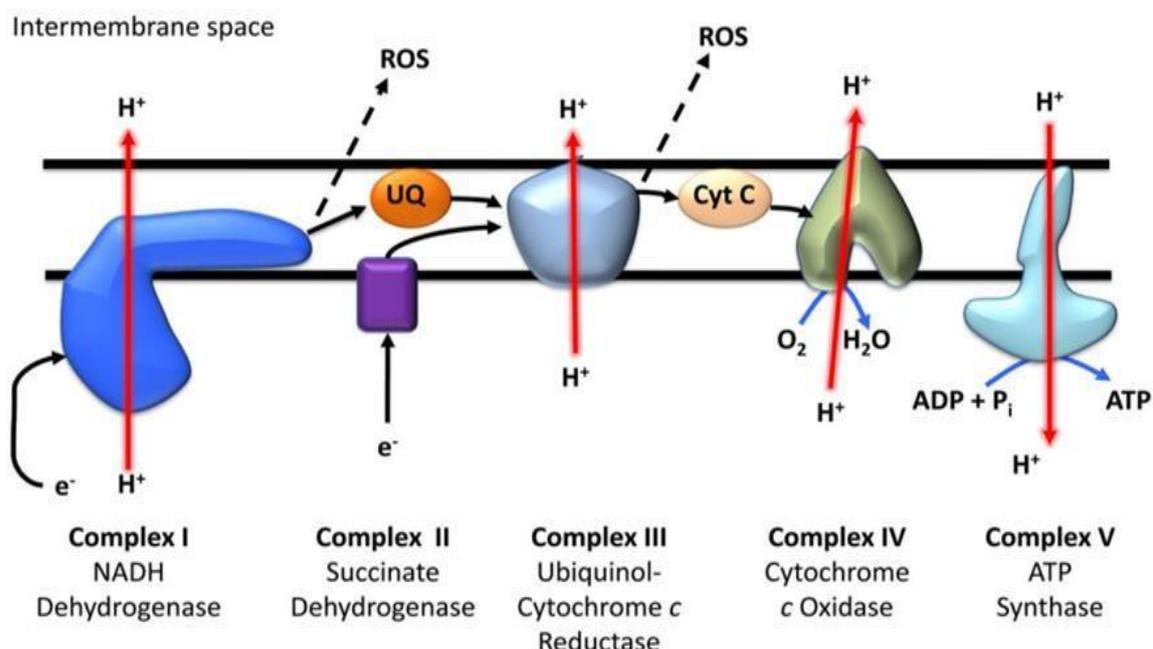


Figure 1 : Production des ERO au niveau de la chaîne respiratoire (Al Ghoulé *et al.*, 2011).

1.2.1.2 Xanthine oxydase (XO)

La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique issue de l'oxydation et/ou de la conversion protéolytique de la xanthine déhydrogénase. Elle est exprimée dans les cellules vasculaires et peut circuler dans le plasma et se lier à la matrice extracellulaire des cellules endothéliales (Wassmann *et al.*, 2004). Il y a deux types de xanthine oxydoréductase (XOR) ; soit de type xanthine oxydase (XO), dépendante de l'O₂, soit de type xanthine déshydrogénase (XD), dépendante du NAD⁺ (Favier, 2003). La xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hyoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (O'Mahony *et al.*, 2013).

1.2.1.3 Les peroxysomes :

Les peroxysomes sont des organites cellulaires délimités par une seule membrane, présents dans toutes les cellules et sont les seuls organites cellulaires avec les mitochondries et les réticulumms endoplasmiques à consommer de l'oxygène lors du métabolisme (Delatter *et al.*, 2005). Dans les conditions physiologiques, les peroxysomes sont connus par le fait qu'en présence d'une large variété d'enzymes peroxysomales regroupées sous le nom d'oxydases, ils synthétisent du H₂O₂ lors de la réduction de l'oxygène moléculaire en eau (Del Río et López-Huertas, 2016). Les peroxysomes génèrent du H₂O₂ principalement par la β -oxydation des acides gras et l'activité enzymatique des oxydases (Delatter *et al.*, 2005).

1.2.1.4 NO-Synthase (NOS) :

Les NOS sont des protéines homodimères, dans lesquelles chaque monomère comprend un domaine réductase en C-terminal (source d'électrons pour la réaction de NOS) et un domaine oxygénase en N-terminal qui est le site actif de l'enzyme (Arzumanian *et al.*, 2003). Les NOS catalysent la transformation de la L-arginine en citrulline et produisent du monoxyde d'azote. Le NO permet la production d'autres ERA telles que le peroxydite (OONO-) (Tsumbu *et al.*, 2012 ; De Marco, 2013).

1.2.2 Sources exogènes :

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, les

rayonnements (X ou γ) qui sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau soit en activant des molécules d'eau soit en activant des molécules photosensibles (UV). Ils produisent ainsi des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Tsai *et al.*, 2017).

Les métaux lourds peuvent également induire la génération de radicaux réactifs et causer des dommages cellulaires en diminuant les activités enzymatiques par peroxydation des lipides et réaction avec les protéines nucléaires et l'ADN (Birben *et al.*, 2012). Par ailleurs, les polluants de l'air, comme le goudron et la fumée des cigarettes constituent une importante source d'ERO. Ces oxydants participent à la genèse d'autres radicaux libres car ils sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, notamment dans les alvéoles pulmonaires (Al-Gubory, 2014).

Certains médicaments, notamment l'adriamycine, la bléomycine et des substances toxiques comme le paraquat, constituent une source renouvelable de radicaux libres, grâce à des phénomènes de recyclage, c'est-à-dire de régénération des formes oxydées/réduites (Allain, 2008 ; Demerdash *et al.*, 2018). De plus, une alimentation riche en graisses saturées et en sucre favorise la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

1.3 Conséquences du stress oxydant

Lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée, les espèces réactives d'oxygène peuvent conduire à des dommages cellulaires et à une altération de leurs fonctions. Les principales cibles biologiques des radicaux libres sont les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Carocho *et al.*, 2018).

1.3.1 Peroxydation des lipides :

Les lipides membranaires, en particulier les acides gras polyinsaturés des phospholipides sont plus sensibles à l'oxydation par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué oxydé en radical peroxyde (Delattre *et al.*, 2005). Ce radical peroxyde subit un réarrangement *via* une réaction de cyclisation pour former des endoperoxydes, qui forment du malondialdéhyde (MDA) et du 4-hydroxynonanal (4-HNA), produits toxiques finaux de la peroxydation lipidique qui endommagent l'ADN et les protéines (Phaniendra *et al.*, 2015).

1.3.2 Oxydation des protéines :

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH) et/ou un site actif contenant le groupement Fe-S. Le radical hydroxyle est capable d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes et à une dégradation irréversible des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine (Hematyar *et al.*, 2019). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Rosenfeld *et al.*, 2018). Enfin, les ERO induisent des modifications indirectes des protéines *via* la formation d'adduits par des aldéhydes dérivant de la peroxydation des lipides (Lynch *et al.*, 2001).

1.3.3 Oxydation de l'ADN :

Les espèces réactives d'oxygène et de l'azote peuvent endommager les acides nucléiques. Les ERO particulièrement le radical OH^\cdot réagit directement avec toutes les composantes de l'ADN. Ceci provoque un certain nombre d'altération, l'oxydation des bases azotées, engendrant un grand nombre de bases modifiées, site abasique des cassures simple et double brin, des pontages ADN-protéines et la formation d'adduits intra-caténaires (addition d'un produit à la molécule d'ADN) (Phaniendra *et al.*, 2015). Les bases de guanine, sont sensibles à l'oxydation par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG). Ce dernier est considéré comme un biomarqueur des dommages oxydatifs de l'ADN et est impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement. D'autre part, les ERA, notamment le peroxydant (OONO⁻) interagit avec la guanine pour produire des lésions nitrées et oxydatives de l'ADN telles que la 8-nitroguanine et la 8-oxodéoxyguanosine respectivement (Phaniendra *et al.*, 2015). Les dommages d'ADN ont comme conséquence une transcription réduite des ARNm et donc une perte de fonction des biomolécules protéiques (Van Houten *et al.*, 2019).

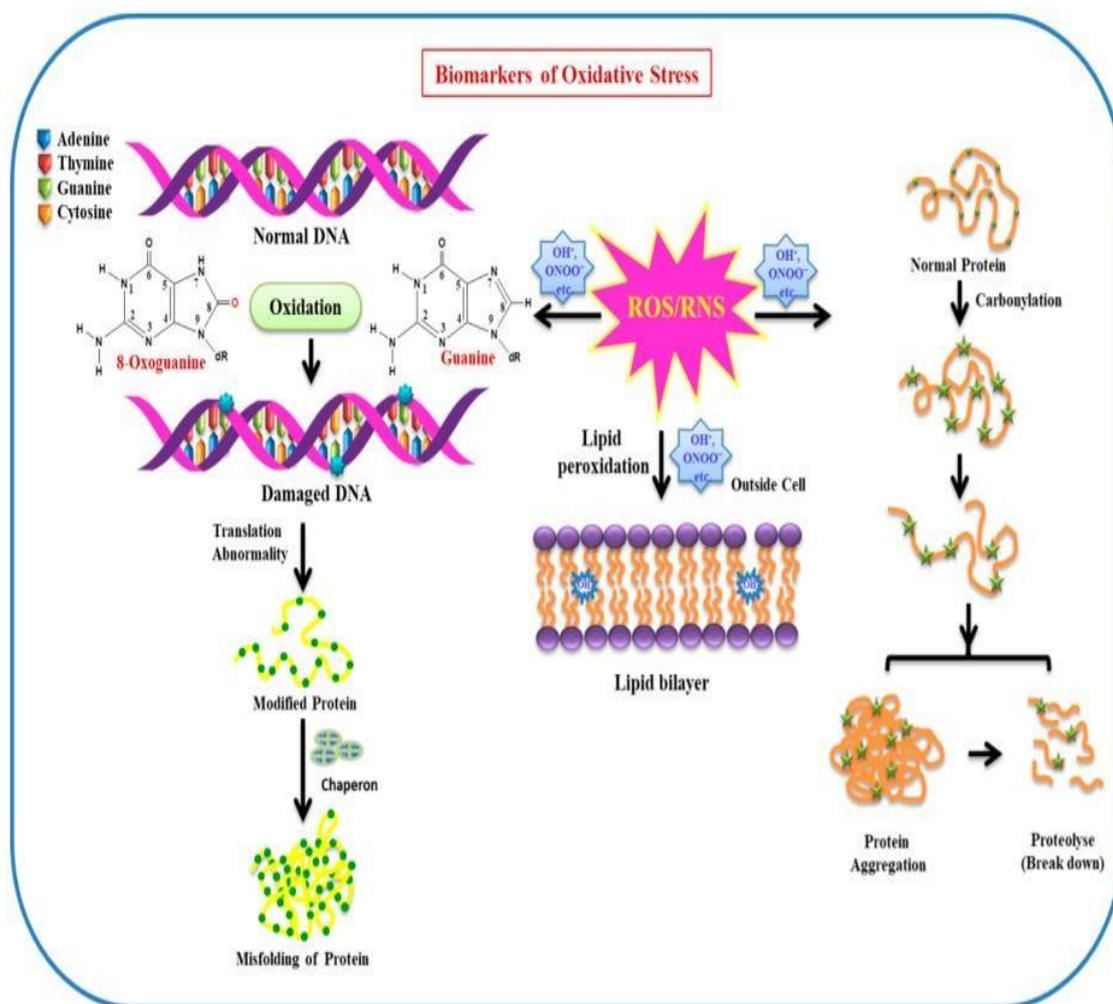


Figure 2: Effet des ERO/ERA sur les biomolécules (ADN, lipides et protéines) utilisées comme biomarqueurs du stress oxydant dans l'environnement cellulaire (Singh *et al.*, 2019).

2. Système antioxydant

L'organisme vivant est doté d'un ensemble de systèmes de défense antioxydant très efficaces permettant de maintenir un niveau non cytotoxique des ERO (Balaban *et al.*, 2005). Un antioxydant est toute substance capable, à concentration relativement faible, de retarder, prévenir ou encore réparer les dommages causés à une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Il existe deux sources majeures d'antioxydants, l'une exogène d'origine végétale, fournie principalement par l'alimentation (Tang et Halliwell, 2010) et l'autre endogène, composée d'un grand nombre de substances, dont des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, ainsi que de petites molécules non enzymatiques (Leverve, 2009). Ces substances sont classées en fonction de leur mode d'action et de leur localisation cellulaire ainsi que de leur origine (Delattre *et al.*, 2005).

2.1 Antioxydants endogènes

2.1.1 Systèmes enzymatiques :

2.1.1.1 Super Oxyde Dismutase (SOD) :

C'est une métalloprotéine, qui représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Elle assure l'élimination de l' $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation en le transformant en H_2O_2 et en O_2 (Bensakhria, 2018).



Trois formes différentes sont retrouvées chez l'homme ; une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse ou au fer (Mn- SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire également associé aux cuivre et au zinc (EC-SOD3) (Birben *et al.*, 2012).

2.1.1.2 Catalase :

C'est une enzyme que l'on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales (Sharma *et al.*, 2012). Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 par sa transformation en H_2O et O_2 (Tokarz et Kaarniranta, 2013).



2.1.1.3 Glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme dépendante du sélénium. Elle est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle est responsable de la transformation du H₂O₂ en H₂O et des hydroperoxydes lipidiques (ROOH) en ROH (Tsumbu, 2012). Le glutathion réduit (GSH) est utilisé comme donneur d'hydrogène. Il est ensuite régénéré grâce à l'enzyme glutathion réductase (Jacques et André., 2004).



2.1.2 Systèmes non enzymatiques :

Le système non enzymatique renferme de nombreuses substances endogènes de faible poids moléculaire, notamment le glutathion, l'acide urique et la bilirubine (Pincemail *et al.*, 2002).

2.1.2.1 Bilirubine :

La bilirubine est le produit terminal de la dégradation de l'hème. C'est une molécule liposoluble capable de piéger les radicaux ROO et l'¹O₂, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Acide urique :

L'acide urique est le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme. Contribuant à 35-60% de la capacité antioxydante totale. Il a été proposé comme l'un des meilleurs antioxydants plasmatiques (Haleng *et al.*, 2007). L'acide urique est un piègeur puissant de l'oxygène singulet, des radicaux peroxyde et hydroxyle et protège la membrane érythrocytaire de la peroxydation lipidique (Pisoschi et Pop, 2015).

2.1.2.3 Glutathion :

Le glutathion est un composé de faible poids moléculaire impliqué dans la régulation du stress oxydant. Il est ubiquitaire chez les animaux et les végétaux et se trouve sous forme d'un tri-peptide (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) avec un groupement thiol (Descamps *et al.*, 2006).

2.2 Antioxydants exogènes :

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont

également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (Pham-Huy et al., 2008). Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes sont les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols, ainsi que des oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse) (Favier, 2003).

2.2.1 Les vitamines :

La vitamine E est un antioxydant majeur des milieux lipidiques, elle est capable de piéger les radicaux peroxydes dans les lipides des membranes biologiques, et contribue ainsi à la rupture de la chaîne de peroxydation lipidique (Pisoschi et Pop, 2015). Sa forme naturelle inclut quatre tocophérols isomères (α , γ , δ) avec une activité antioxydante variable. L'alpha-tocophérol (α -TOCH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols (Oroian et Escriche, 2015). Par ailleurs, la vitamine C (acide ascorbique) est une autre vitamine hydrosoluble présente dans les fluides physiologiques (Vertuani *et al.*, 2004). Cette vitamine empêche l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) produites par divers systèmes. Lors de son oxydation en acide déhydro-ascorbique, la Vit C passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Chen *et al.*, 2004).

2.2.2 Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes dont la β -carotène sont répandus dans les fruits et les légumes (Haleng *et al.*, 2007). Ils exercent un rôle efficace comme piègeur des radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}) et peroxydes (ROO^{\bullet}) et de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). L'activité antioxydante des caroténoïdes est liée à leur longue chaîne carbonée riche en double liaisons (Valko *et al.*, 2007).

2.2.3 Les polyphénols :

Les polyphénols sont des molécules bioactives ayant la capacité de piéger les radicaux libres. Quand ils sont ingérés dans les aliments, ils renforcent les défenses naturelles qui protègent les cellules et les tissus contre le stress oxydant (Scalbert, 2004). Les polyphénols sont capables d'empêcher les dommages oxydants par différents mécanismes d'action (Hodek *et al.*, 2002). Les polyphénols sont une catégorie de molécules organiques largement répandus dans le règne végétal et dans nos aliments, réputés pour leurs propriétés antioxydants (Macheix *et al.*, 2006).

2.3 Les polyphénols :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les différentes parties des plantes. Leur répartition varie selon l'espèce, l'organe, le tissu ou encore le stade de développement du végétal (Macheix *et al.*, 2006). Ils regroupent plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques. La présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones dans leur structure présente un point commun entre les différentes classes. Ces structures aromatiques sont elles-mêmes porteuses d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Les principales classes des polyphénols sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins et les coumarines (King et Young. 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002).

2.3.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont de petites molécules constituées d'un noyau benzénique et d'au moins un groupe hydroxyle. Elles peuvent être estérifiées et/ou liées à des sucres sous forme d'hétérosides. Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires. Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque, très présent dans le règne végétal, et de l'acide cinnamique (**Figure 3**) (Bento-Silva *et al.*, 2020).

2.3.2 Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Seyoum *et al.*, 2006 ; Ghedira, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), laquelle est constituée deux noyaux aromatiques (anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (**Figure 4**) (Erdman *et al.*, 2007). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes selon leur degré d'oxydation et la nature des substitutions portées sur le cycle C (Pietta, 2000). Six groupes sont les plus répandus et les mieux caractérisés. Il s'agit des flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (**Tableau 2**) (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006).

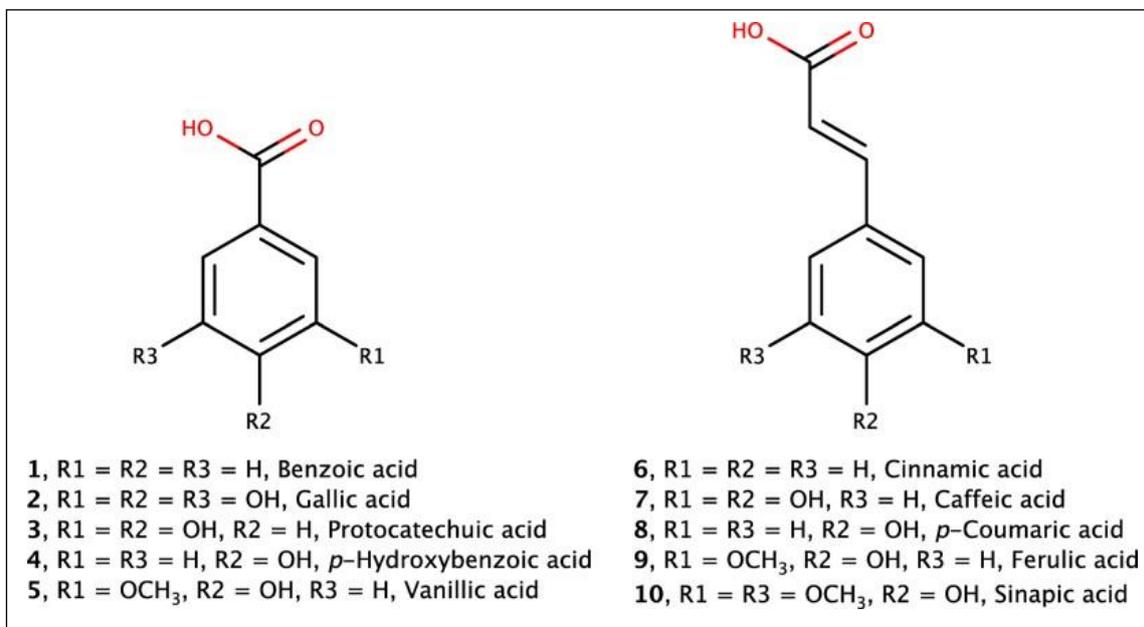


Figure 3: Structure chimiques de l'acide benzoïque, des acides hydroxybenzoïques communs(2-5) et des acides hydroxycinnamique communs (6-10) (Bento-Silva *et al.*, 2020)

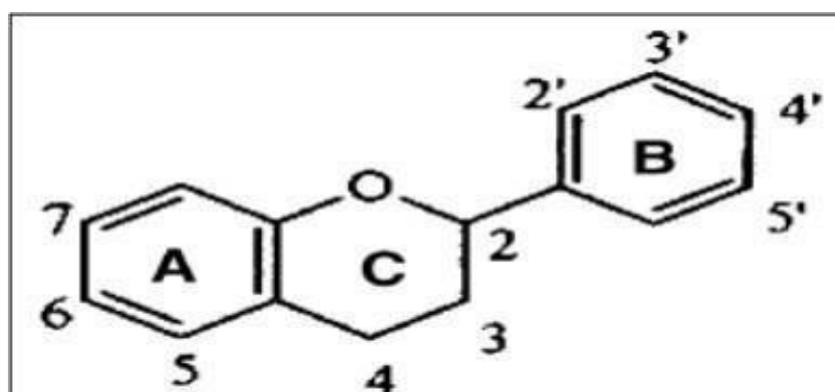
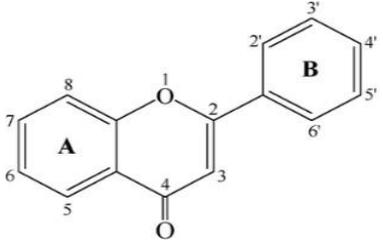
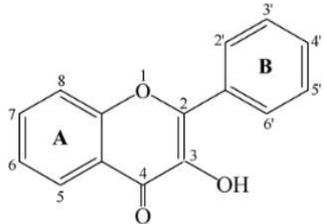
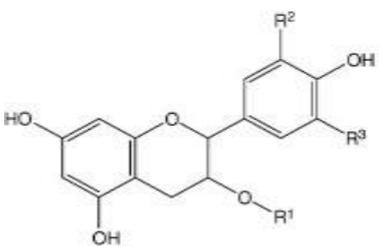
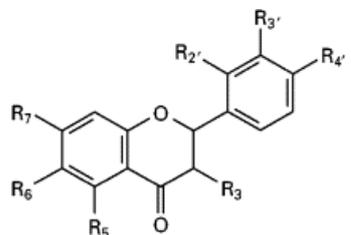
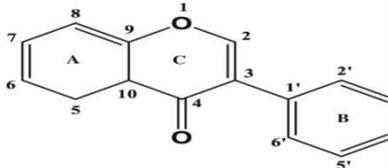
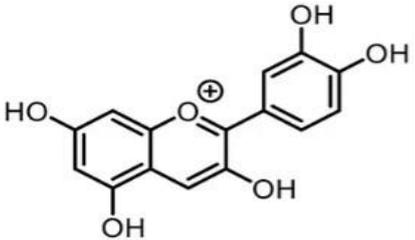


Figure 4: Structure de base d'un flavonoïde (Erdman *et al.*, 2007)

Tableau 2 : Principales classes des flavonoïdes.

Classes	Caractéristiques
<p>Flavones</p> 	<p>Caractérisées par la présence d'un groupe cétone en C4 et d'une double liaison C2, 3. Le cycle A de la majorité des flavones est dérivé du phloroglucinol et le cycle B peut être substitué aux positions C3', C4' ou C5 (Malbert, 2014).</p> <p>Exemples : Lutéoline, Apigénine.</p>
<p>Flavonols</p> 	<p>Possèdent une double liaison entre C2 et C3, et un groupe hydroxyle en position C3 (D'Archivio <i>et al.</i>, 2007).</p> <p>Exemple : Quercétine</p>
<p>Flavanols</p> 	<p>Contiennent une chaîne à trois atomes de carbone saturée et un groupe hydroxyle en position C3 (D'Archivio <i>et al.</i>, 2007).</p> <p>Exemple : Catéchine.</p>
<p>Flavanones</p> 	<p>Possèdent un groupe cétone en C4 sans la double liaison C2,3. Ils possèdent un centre chiral à C2 (Malbert, 2014).</p> <p>Exemple : Naringénine, Eriodictyol.</p>

<p>Isoflavones</p> 	<p>Caractérisées par le fait que l'anneau B est fixé en C3 au lieu de la position C2 (Abbas <i>et al.</i>, 2017)</p> <p>Exemples : Genisteine, Daidezine.</p>
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Possèdent un squelette basé sur le cation pyrylium. Ils sont caractérisés par la présence d'une charge cationique et ne se trouvent généralement pas sous forme d'aglycones libres (Malbert, 2014).</p>

2.3.3 Mécanismes d'action des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour leurs diverses activités anti- inflammatoire, anti-allergique, anti-carcinogénique, antivirale, antimicrobienne, vasodilatatrice et cardioprotectrice (Ksouri *et al.*, 2007). Ces bienfaits sont en grande partie liés à leurs propriétés antioxydantes permettant la neutralisation des radicaux libres (Nijveldt *et al.*, 2001).

2.3.3.1 Piégeage ou réduction des radicaux libres :

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont capable de piéger la plupart des radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et radicaux péroxyles ($\text{ROO}^{\cdot-}$) (Pietta, 2000). Cette aptitude est due à leur structure chimique (**Figure 5**), grâce à la présence des éléments suivants :

- La structure 3',4'-dihydroxy du cycle B, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe oxo ($\text{C4}=\text{O}$), qui est responsable de la délocalisation d'électrons du noyau B, ce qui améliore encore plus l'activité anti radicalaire.
- Les hydroxyles en positions C3 et C5 qui permettent une activité maximale (Pietta, 2000).

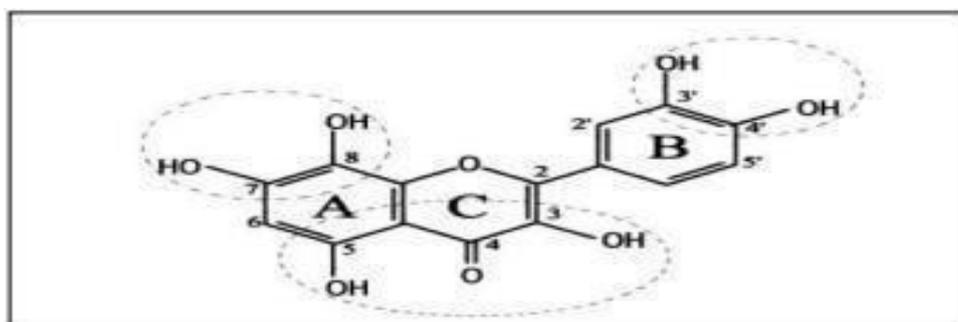


Figure 5: Caractéristiques structurales des flavonoïdes permettant le piégeage des radicaux libres (Amić *et al.*, 2003).

Les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres en raison de leur faible potentiel redox par transfert d'hydrogène. Le radical flavonox (Flav-O•), qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Jovanovic *et al.*, 2012).

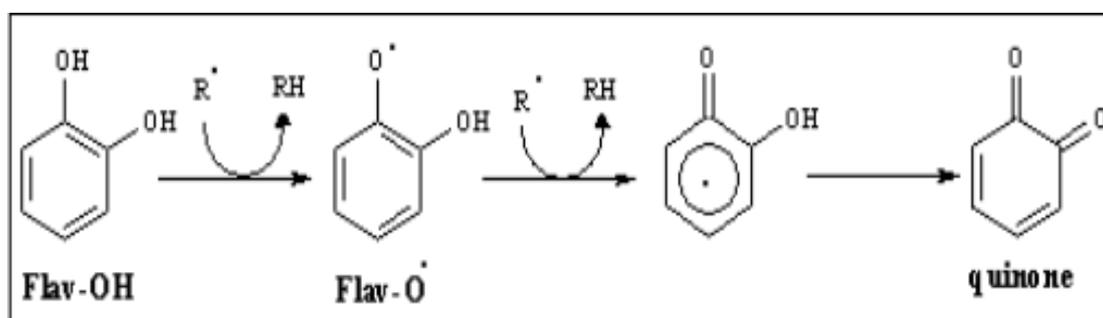


Figure 6: Réduction des ERO ($R\bullet$) par les flavonoïdes (Jovanovic *et al.*, 2012).

2.3.3.2 Chélation des métaux de transition

Les flavonoïdes et les tanins inhibent la formation de radicaux libres par la chélation des métaux tels que, le cuivre et le fer. En plus de leurs rôles essentiels dans de nombreuses fonctions physiologiques, ces derniers renforcent les effets nocifs du stress oxydant en stimulant la production des radicaux hydroxyles (Hider *et al.*, 2001). Ces composés en chélatant les ions métalliques, forment des complexes de coordination avec ceux-ci, en occupant tous les emplacements et peuvent ainsi convertir ces métaux en complexe insoluble empêchant leurs interactions avec les intermédiaires lipidique (Lee *et al.*, 2004).

2.3.3.3 Inhibition des enzymes :

Les interactions polyphénols-protéines ont été largement étudiées *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes. Ces composés sont capables d'inhiber une grande variété d'enzymes (Havsteen, 2002). Ces interactions, qui sont encore à valider *in vivo*, sont vrai semblablement à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes. Par exemple, les acides hydroxycinnamiques sont des inhibiteurs de protéines de coagulation (thrombine et facteur Xa) et jouent ainsi un rôle d'anticoagulant (Monien *et al.*, 2006).

Ce type d'interactions est impliqué dans l'inhibition de la production des ERO par formation d'un complexe inhibiteur-enzyme. Cette action est bien illustrée dans le cas de la xanthine oxydase, une enzyme considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde (Hansaki *et al.*, 1994). Dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent prévenir cette maladie en réduisant à la fois les concentrations de l'acideurique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains.

3. *Hertia cheirifolia*:

Hertia cheirifolia est une plante médicinale qui fait partie de la famille des Asteraceae. Celle-ci est une importante famille qui comprend près de 23000 espèces réparties en 1500 genres décrites dont 750 endémiques (Barreda *et al.*, 2015). Les asteraceae sont des plantes herbacées, arbustes, et parfois des arbres ou plantes grimpantes. Les feuilles sont alternes, opposées ou verticillées, simples parfois lobées ou découpées. Les fleurs sont hermaphrodites, ou unisexuées, parfois stériles, actinomorphes ou zygomorphes (Walters *et al.*, 2002). Le genre *Hertia*, qui appartient à la famille des Asteraceae, contient 12 espèces réparties dans toute l'Afrique du Sud et du Nord et en Asie du Sud-Ouest (Akhgar *et al.*, 2012).

3.1 Description botanique :

Hertia cheirifolia également connue sous le nom d'Othonnopsis cheirifolia Jaub (Massiot *et al.*, 1990) 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). C'est une plante herbacée, très répandue sur les hauts-plateaux. Cette plante (**Figure 7**) est un sous-arbrisseau vivace aromatique de 0.2-0.3 m de hauteur, se reproduisant par des graines. Le feuillage est charnu persistant, de couleur vert gris. Ses feuilles sont alternes, spatulées, réunies en capitules solitaires à bractées oblongues et pétiolées avec un bord entier, de couleur jaune citron (Quezel et Santa, 1963).

Cette plante est un sous-arbrisseau à souche semi-ligneuse poussant en grosses touffes les tiges sont très feuillées et de 20 à 40 cm de long, Les feuilles disposées sur la tige selon une phyllotaxie alterne, elles sont persistantes, spatulées charnues (Burnie *et al.*, 2006). Les fleurs sont réunies en capitules jaune citron, de 2 à 3 cm de diamètre et solitaires sur des pédoncules nus élargis au sommet. Les fruits sont des akènes (fruits secs indéhiscent) surmontés d'aigrettes de soies appelées pappus. La période de la floraison se situe au début du printemps (Quezel et Santa, 1963).



Figure 7: Photographie de la plante *Hertia cheirifolia*

<https://davesgarden.com/guides/pf/showimage/471507/>

3.2 Classification et systématique : (Quezel et Santa, 1963).

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)

Embranchement : Phanerogamae (Phanérogames)

Sous-embranchement : Magnoliophytina (Angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (Dicotyledones)

Sous-classe : Asterida

Ordre : Asterales

Famille : Astéraceae

Genre : *Hertia*

Espèce : *Hertia cheirifolia* L.

3.3 Utilisations traditionnelles :

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

Les métabolites secondaires contenus dans *H. cheirifolia* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. En effet, il a été montré que l'extrait chloroformique de cette plante exerce une activité anti-spasmodique et anti-inflammatoire (Ammar *et al.*, 2009). Les études portant sur des extraits alcooliques et aqueux de *H. cheirifolia* ont prouvé son pouvoir antioxydant probablement associé à la présence de polyphénols (Bousselsela *et al.*, 2012 ; Majouli *et al.*, 2017). Une activité acaricide des huiles essentielles de cette plante contre les acariens phytophages, particulièrement l'acarien *Tetranychus urticae* qui cause des dégâts en agriculture a été rapportée par Attia *et al.* (2012, 2015).

1. Matériel

1.1. Végétal :

L'étude est réalisée sur des extraits méthanoliques de tige et de racine provenant de la plante *Hertia cheirifolia* récoltée au stade de la floraison au mois d'avril 2014 dans la région de Sétif. La méthode d'extraction est décrite **en annexe**.

1.2 Matériel non biologique :

1.2.1 Réactifs

- Folin-Ciocalteu [mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$)].
- Acide gallique ($C_7H_6O_5$).
- Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$).
- Sulfate ferreux heptahydraté ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$).
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- Sulfanilamide ($H_4N_2O_2S$).
- acide phosphorique (H_3PO_4).
- N(1-Naphthyl) éthylènediamine dichlorure ($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$).
- Quercétine ($C_{15}H_{10}O_7$).
- Acide sulfurique (H_2SO_4).
- Chlorure de sodium ($NaCl$).
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).
- Phosphate dissodique (Na_2HPO_4).
- Phosphate dipotassique (K_2HPO_4).
- Chlorure de potassium (KCl).
- Salicylate sodium ($C_7H_5NaO_3$).
- Nitroprussiate de sodium $Na_2[Fe(CN)_5NO]$.

1.2.2 Appareils

- Spectrophotomètre Uv-Visible (BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO-LTD. (UK).

- Balance de précision (RADWAG XA 310).
- Bain-marie (Raypa THERMOSTATIC BATH).
- Vortex (VELP SCIENTIFICA Z×3).
- Centrifugeuse (M01)
- Plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA)
- pH-mètre (BANTE instruments 820).

2. Méthodes:

2.1 Dosage des polyphénols et flavonoïdes

2.1.1 Dosage des polyphénols

Le dosage des composés phénolique totaux contenus dans les extraits de racine et de tige ainsi que dans le mélange de ces deux extrais de la plante *H. cheirifolia* a été estimé par le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de (Li *et al.*, 2007). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides ; phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

500 μ l du Folin-Ciocalteu (1/10) est ajouté à 100 μ l des extraits de racine et de tige (1 mg/ml). Après 4 minutes d'incubation, 400 μ l d'une solution de carbonate de sodium (7.5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Les tubes sont agités au vortex et une couleur bleue est obtenue après incubation à l'obscurité pendant 1h30 à 2h à température ambiante. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à $\lambda=760$ nm. Tous les échantillons ont été analysés en triplicate. La teneur en polyphénols totaux a été estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard (0-200 μ g/ml). Elle est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

2.1.2 Dosage des flavonoïdes :

Le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes est effectué suivant la méthode de Bahorun *et al.* (1996) en utilisant comme réactif spécifique le trichlorure d'aluminium (AlCl₃). 500µl d'AlCl₃ (2%) ont été ajoutés à un volume égal de l'extrait de tige (T100%), de racine (R100%) et des mélanges préparés aux différents pourcentages (T75%, R75%, T/R50%). Les échantillons ont été vigoureusement agités au vortex. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les absorbances sont mesurées à λ=430 nm. Toutes les manipulations sont répétées en triplicate.

La teneur en flavonoïdes dans chacun des échantillons analysés a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établit en utilisant la quercétine comme standard (0-50 µg/ml). La teneur est exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par grammes d'extrait (mg EQ/g).

2.2 Analyse de l'activité scavenger de radicaux libres

2.2.1 Activité scavenger du radical hydroxyle (OH) :

L'activité scavenger du radical OH par les extraits de tige et de racine ainsi que par le mélange de ces deux extraits de la plante *Hertia cheirifolia* a été mesuré par la méthode de Rajamanikandan *et al.* (2011).

500µl de chaque extrait de tige et racine dissout dans du méthanol et des différents pourcentages du mélange de ces deux extraits (100%R, 100%T, 75%R, 75%T, 50% R/T) ont été additionnés à 500 µL de FeSO₄ (1.5 Mm) plus 350 µl de H₂O₂ (6 Mm) et 150 µL de salicylate de sodium (20 Mm). Après mélange au vortex, les échantillons ont été incubés pendant 1 h dans un bain-marie à 37°C. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 3000 tours pendant 5 min. L'absorbance correspondant à la formation du complexe salicylate hydroxylé a été mesurée à λ = 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical OH par les différents extraits analysés a été calculé selon l'équation suivante :

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

A₀ : absorbance du contrôle (sans l'extrait)

A_t : absorbance du test (avec l'extrait).

2.2.2 Activité scavenger du radical monoxyde d'azote (NO) :

L'activité antioxydante des extraits de racine et de tige ainsi que celle des différents mélanges de ces deux extraits de la plante *Hertia cheirifolia* par la neutralisation du radical NO a été évaluée par la méthode de Griess (Awah et Verla, 2010).

500 µl de l'extrait est ajouté à 500 µl de nitroprussiate de sodium NPS (5Mm) préparé dans du tampon phosphate salin (PBS, pH = 7.4). Les tubes sont passés au vortex puis incubés 1h30 sous la lumière. Ensuite, 500 µl du réactif de sulfamide (1% dans 5% de H₃PO₄) sont rajoutés, puis incubés pendant 10 min à l'obscurité. Après, 500 µl de dichlorhydrate de naphthyléthylène diamine (NEDD, 0.1%) sont ajoutés dans chaque tube puis incubé pendant 20 min à l'obscurité à température ambiante. À la fin, une couleur rose est obtenue et les absorbances sont mesurées au spectrophotomètre à λ=543 nm.

Le pourcentage du potentiel scavenger du radical NO par les deux extraits de tige et de racine ainsi que par leurs différents mélanges a été calculé selon l'équation suivante :

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

A₀ : absorbance du contrôle (sans l'extrait). A_t : absorbance du test (avec l'extrait).

3. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de la moyenne ± écart-type (n = 3). L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad Prism.5 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA). La significativité de la variance a été évaluée au niveau des probabilités d'erreurs p < 0,05 ; p < 0,01.

Résultats et discussions

La présente étude a été réalisée sur les extraits méthanoliques de tiges et de racines ainsi que sur les différents mélanges préparés à partir de ces deux extraits de la plante *Hertia cheirifolia*. L'objectif de ce travail est de déterminer le contenu en polyphénols et en flavonoïdes de ces extraits, ainsi que l'évaluation de leur potentiel neutralisant les radicaux libres.

1. Contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux

1.1 Contenu en polyphénols :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires constituant une famille de molécules bioactives largement répandues dans le règne végétal. Ils sont retrouvés dans les différentes parties des plantes (Fleuriet et Deloire, 1982 ; Yusuf, 2006).

Le dosage des polyphénols a été réalisé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu permettant la quantification des groupements hydroxyyles présents dans les extraits des racines et tiges et les mélanges de ces deux extraits. Le réactif du Folin-Ciocalteu, en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéro-polyacides, d'où le changement de sa couleur jaune verdâtre au bleu (Boizot et Charpentier, 2006).

La teneur en polyphénols a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage (**Figure 8**), où l'acide gallique a été utilisé comme standard et les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de l'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

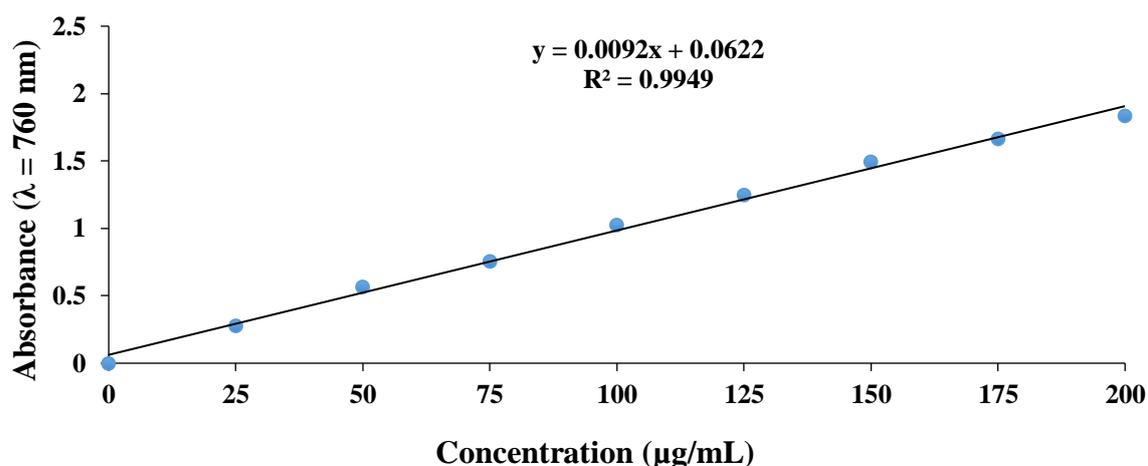


Figure 8 : Droite standard à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

Résultats et discussions

Les résultats enregistrés lors du dosage des polyphénols des extraits de tige et de racine ainsi que leurs mélanges sont présentés dans la **figure 9**. La teneur la plus élevée en polyphénols a été obtenue dans l'extrait 100%R (48.90 ± 3.49 mg EAG/g), cette valeur est significativement supérieure ($p < 0.05$) à la teneur des polyphénols dans l'extrait 100%T (30.51 ± 11.05 mg EAG/g). Parallèlement, aucune différence significative n'a été enregistrée entre des mélanges des deux extraits 75%R, 50% R/T et 75%T (35.35 ± 13.62 mg EAG/g ; 30.99 ± 12.83 mg EAG/g et 27.10 ± 11.15 mg EAG/g, respectivement).

Des teneurs élevées en polyphénols dans l'extrait méthanolique sont généralement liées à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires (Bakchiche *et al.*, 2013). Il a été constaté que la méthode d'extraction et le type de solvant utilisé jouent un rôle très important dans les rendements des extraits. Un solvant polaire permet d'extraire un grand nombre de composés biologiquement actifs, à partir de différentes matières végétales (Su *et al.*, 2014 ; Starliper *et al.*, 2015).

Les teneurs en polyphénols totaux varient qualitativement et quantitativement dans la même plante ainsi que d'une plante à une autre. Ceci est probablement lié à la méthode d'extraction et à la polarité des solvants utilisés (Park et Cha, 2003). Par ailleurs, la diversité structurale des composés phénoliques de la matière végétale est responsable de la grande variabilité de leurs propriétés physico-chimiques influençant leur extraction. Elle peut également varier en fonction des conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante et la durée de conservation de l'extrait (Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Bentahar *et al.*, 2020).

Les résultats obtenus montrent une répartition différente des polyphénols entre les deux extraits 100%R et 100%T. Ceci pourrait être expliqué par la différence de solubilité des polyphénols contenus dans les extraits dans les solvants polaires (méthanol). Ce qui dépendrait du nombre et de la position des groupements hydroxyles libres et de leur poids moléculaire (Mohammedi et Atik, 2011 ; Iloki-Assanga *et al.*, 2015).

Résultats et discussions

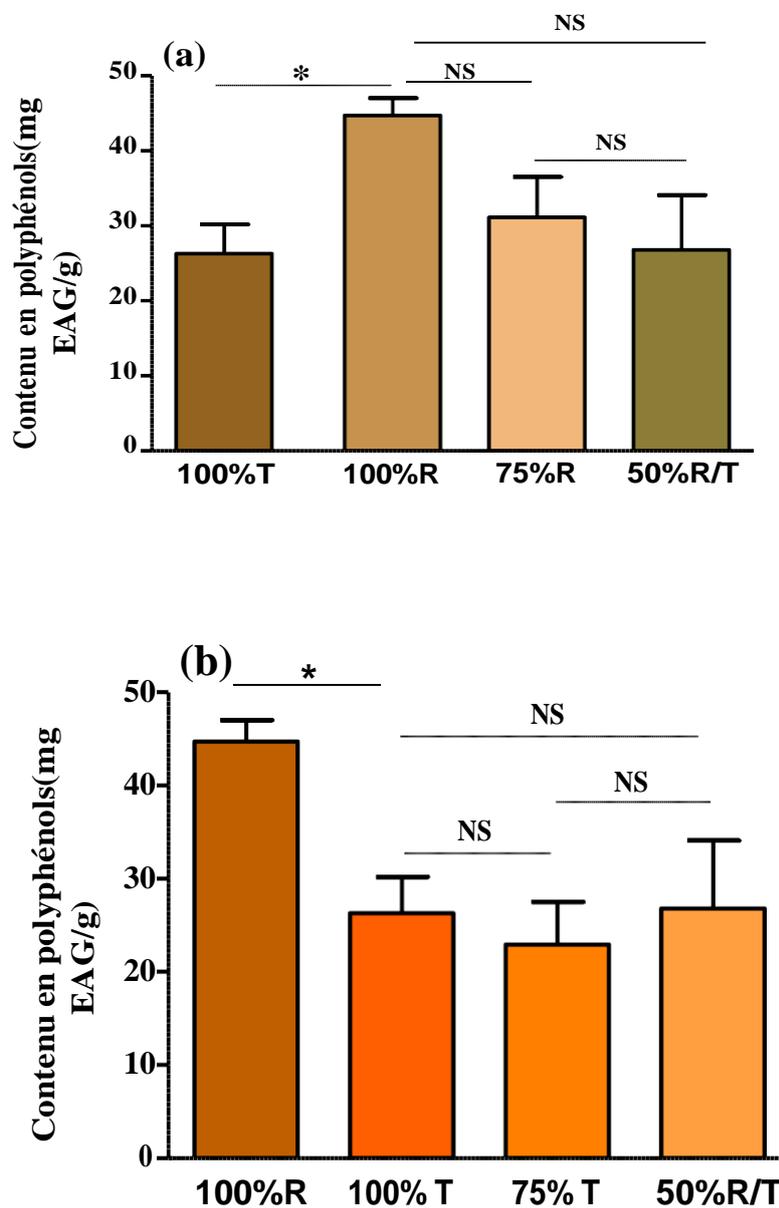


Figure 9: Teneurs en polyphénols dans les extraits des racines (100%R) et des tiges (100%T) de *Hertia cheirifolia* et dans leurs différents mélanges (75%R, 75%T et 50% R/T). Comparaison à l'extrait de racine (100%R) (a). Comparaison à l'extrait de tige (100%T) (b). (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$).

Résultats et discussions

1.2 Contenu en flavonoïdes :

Les flavonoïdes est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ce sont des pigments quasi universels des végétaux et sont responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Havsteen, 2002).

L'estimation quantitative des flavonoïdes dans les différents extraits analysés a été réalisée par la méthode au trichlorure d'aluminium. Le principe de cette méthode colorimétrique est basé sur la capacité de l' AlCl_3 à former un complexe jaune avec les molécules flavonoïques. La teneur en flavonoïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage (**Figure 10**), où la quercétine a été utilisée comme standard et les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

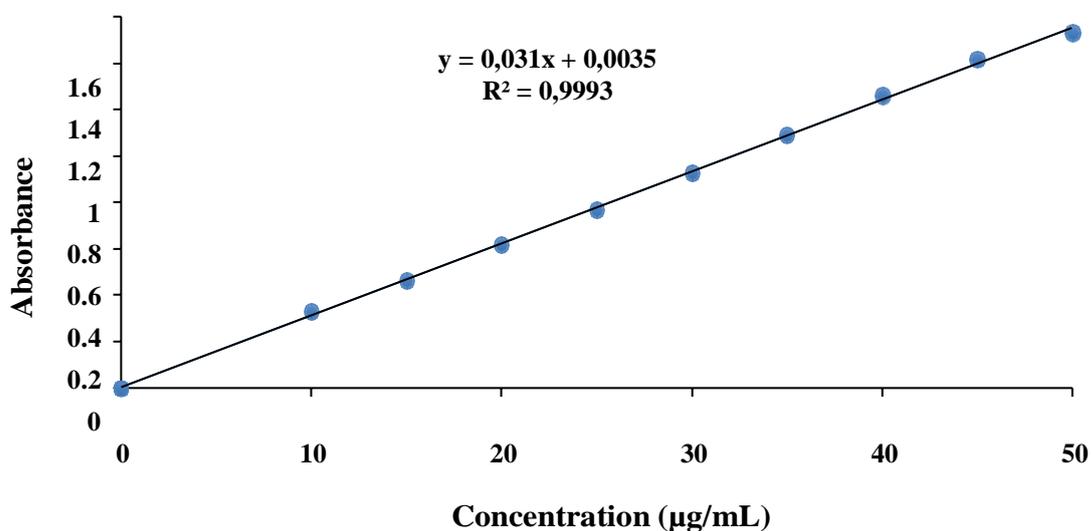


Figure 10 : Droite standard à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats enregistrés lors du dosage des flavonoïdes dans les extraits de tige et de racine ainsi que dans leurs mélanges sont présentés dans la **figure 11**. L'analyse des résultats a révélé qu'il n'y a aucune différence significative ($p > 0,05$) entre l'extrait 100%R et 100%T ($8,54 \pm 2,77$ mg EQ/g ; $10,27 \pm 2,73$ mg EQ/g et, respectivement).

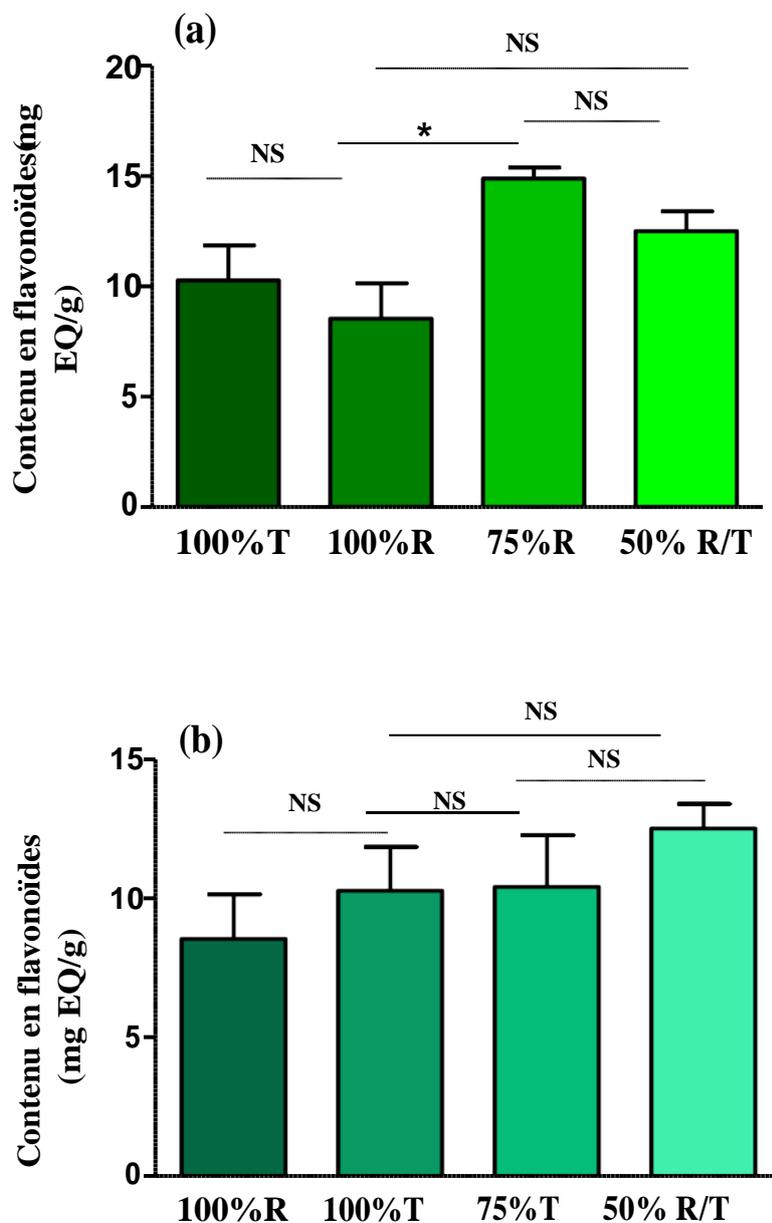


Figure 11: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des racines (100%R) et des tiges (100%T) de *Hertia cheirifolia* et dans leurs différents mélanges (75%R, 75%T et 50% R/T). Comparaison à l'extrait de racine (100%R) (a). Comparaison à l'extrait de tige (100%T) (b). (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$)

Résultats et discussions

D'après les résultats présentés dans la **figure 11a**, le mélange R75% représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux (14.89 ± 0.86 mg EQ/g), significativement différente ($p < 0.05$) par rapport à l'extrait pur de racines 100%R. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre le mélange d'extraits 50% R/T (12.51 ± 1.54 mg EQ/g) et l'extrait 100%R (8.54 ± 2.77 mg EQ/g).

Par ailleurs, les résultats du dosage des flavonoïdes totaux présentés dans la **figure 11b**, montrent que la teneur en flavonoïdes est similaire entre l'extrait pur 100%T (10.27 ± 2.73 mg EQ/g) et les deux mélanges 75%T et 50% R/T (10.41 ± 3.23 mg EQ/g, 12.51 ± 1.54 mg EQ/g, respectivement).

Des teneurs en flavonoïdes supérieures à nos résultats ont été retrouvées dans la racine de *Tamus communis* (Boumerfeg *et al.*, 2009). Tandis que des valeurs plus faibles ont été rapportées par Adida *et al.* (2015) dans l'extrait de racine de la plante *Pituranthos scoparius* de famille Apiacées. D'autres études réalisées par Zaouali *et al.* (2018), sur la plante *Pistacia lentiscus* ont montré des quantités en flavonoïdes dans les tiges qui concordent avec nos résultats. Pour les mélanges d'extraits, nous n'avons pu trouver aucune étude afin de comparer nos résultats.

La différence des teneurs en flavonoïdes observée entre le mélanges 75%R et l'extrait pur 100%R, peut être expliquée par le fait que les extraits de tige et de racines contiennent certaines molécules flavonoïdes qui auraient la même structure chimique d'où leur cumul dans le mélange d'extrait 75%R et l'obtention d'une quantité plus importante ($p < 0.05$). Ceci n'a pas été remarqué pour le reste des extraits, où des concentrations similaires ont été obtenues.

2. Activité antioxydante

Plusieurs méthodes colorimétriques sont utilisées pour l'étude de l'activité anti-radicalaire d'extraits végétaux *in vitro*. La plupart de ces méthodes sont basées sur la décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel (Georgieva *et al.*, 2010). Le potentiel antioxydant des extraits méthanoliques des racines et des tiges ainsi que de leurs différents mélanges a été évalué *in vitro*, par le test de piégeage des radicaux d'hydroxyles (OH) et le test de piégeage du monoxyde d'azote (NO).

2.1 Piégeage des radicaux d'hydroxyles

Les radicaux hydroxyles sont considérés comme étant les radicaux les plus réactifs pouvant induire de graves dommages aux tissus en interagissant avec les biomolécules cellulaires (Zhang *et al.*, 2011). Ainsi, le piégeage de ce radical est important pour la défense antioxydante et la réduction des dommages oxydatifs (Pan et Mei, 2010 ; Li *et al.*, 2014).

La capacité des extraits de racine et de tige de la plante *Hertia cheirifolia* et de leurs mélanges (75% R ; 75%T et 50% R/T) à piéger le radical OH est estimée selon la méthode décrite par Rajamanikandan *et al.* (2011). Le principe de cette méthode est basé sur la production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton qui consiste en la réduction du peroxyde d'hydrogène par des métaux de transition ; des traces de fer ferreux Fe(II) ou de cuivre Cu (II) (Enami *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 12**. Il apparait que tous les extraits de tige, de racine et de leurs mélanges 75%R, 75%T et 50% R/T ont un effet scavenger variable du radical hydroxyle. Nous pouvons constater d'après ces résultats que l'activité de piégeage du radical hydroxyle par l'extrait 100%R ($49.19 \pm 6.92\%$) est la plus élevée par rapport aux autres extraits. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre l'extrait 100%T ($18.57 \pm 4.33\%$) et les mélanges d'extraits 75%R ($40.04 \pm 17.70\%$) et 50% R/T ($39.36 \pm 15.12\%$) par rapport à l'extrait pur 100%R ($49.19 \pm 6.92\%$).

Par ailleurs, l'extrait 100%T semble avoir le potentiel anti-radical OH le plus faible ($18.57 \pm 4.33\%$) par rapport à l'ensemble des extraits analysés. Néanmoins, aucune différence significative n'a été notée par rapport aux deux mélanges d'extraits 75%T et 50% R/T ($28.10 \pm 12.15\%$ et $39.36 \pm 15.12\%$, respectivement).

Le potentiel anti-radicalaire des extraits de la racine, de la tige ainsi que de leurs différents mélanges (R75%, T75% et R/T 50%) peut être expliqué par leur capacité à donner un hydrogène ou à inhiber les réactions d'initiation radicalaires par la chélation des métaux comme le fer et le cuivre (Soucek *et al.*, 2011). La réaction de Fenton sera donc bloquée *in vitro* et par conséquent, une faible quantité de radicaux hydroxyles sera produite.

Résultats et discussions

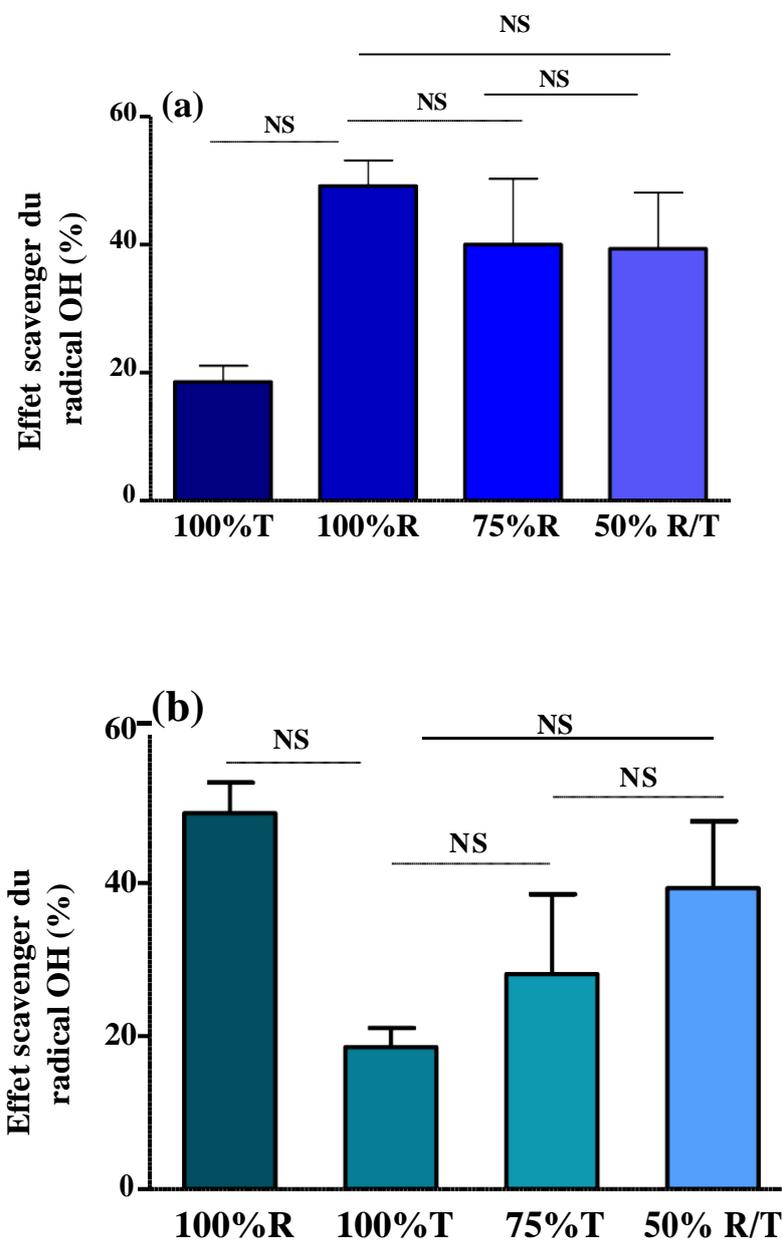


Figure 12: Effet scavenger du radical hydroxyle (OH) par les extraits de racines (100%R) et de tiges (100%T) de *Hertia cheirifolia* ainsi que par leurs différents mélanges (75%R, 75%T et 50% R/T). Comparaison à l'extrait de racine (100%R) (a). Comparaison à l'extrait de tige (100%T) (b). (NS : non significatif).

Résultats et discussions

Deux types de mécanismes peuvent expliquer la capacité des composées phénoliques à neutraliser le radical hydroxyle ; l'un consiste à supprimer la production du radical hydroxyle et l'autre à piéger directement le radical hydroxyle (Nadour *et al.*, 2015). Le premier mécanisme est lié à la réduction des ions métalliques car le peroxyde d'hydrogène est relativement stable en l'absence d'ions de métaux de transition (Zhang *et al.*, 2011). Des études antérieures ont montré également que le mécanisme par lequel les flavonoïdes sont capables de diminuer la production des radicaux hydroxyles semble être la chélation du fer libre et le piégeage direct des radicaux hydroxyles en même temps (Soucek *et al.*, 2011; Nadour *et al.*, 2015).

Les flavonoïdes grâce à leur forte tendance à céder des atomes d'hydrogène portés par les groupements hydroxyles, sont de puissants agents anti radicalaires (Sandhar *et al.*, 2011). Une des caractéristiques structurales des flavonoïdes est la variabilité du taux d'hydroxylation des cycles phénoliques suivant le flavonoïde considéré. Cette caractéristique influe directement sur leur capacité donatrice en hydrogène et donc sur leur potentiel anti-radicalaire (Le *et al.*, 2007).

L'étude de Joshi et Juyal (2018), sur les extraits éthanoliques de *Thymus serpyllum* a montré une activité efficace de piégeage de radical hydroxyle avec un pourcentage d'inhibition proche à celui obtenu dans notre étude. Une autre étude sur les extraits méthanoliques et chloroformiques d'*Ulmus davidiana* ont montré une activité de piégeage des radicaux hydroxydes avec un pourcentage d'inhibition nettement plus important que nos résultats (Jia et Wang, 2007).

L'analyse de corrélation entre l'activité neutralisant le radical OH par les extraits analysés et leurs teneurs en polyphénols a révélé une corrélation moyenne ($r = 0.5087$, $p > 0.05$). Ainsi, l'effet scavenger des radicaux OH ne serait pas seulement lié au contenu en polyphénols. Ceci peut être expliqué par le fait que les extraits analysés pourraient contenir d'autres composés antioxydants agissant en synergie sur le piégeage du radical hydroxyle. Il est largement accepté qu'une puissante activité antioxydante ne serait pas nécessairement liée à une forte teneur en polyphénols (Mour *et al.*, 2001).

Résultats et discussions

2.2. Piégeage du monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est un composé radicalaire réactif sous forme gazeuse. Sa solubilité dans l'eau est comparable à la solubilité du monoxyde de carbone et de l'oxygène moléculaire. La charge nulle du NO le rend soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires (Sennequier et Vadon-Le-Goff, 1998). Les résultats de l'activité scavenger du monoxyde d'azote exercé par les extraits de tige, de racine et des différents mélanges de ces deux extraits de la plante *Hertia cheirifolia* sont illustrés dans la **figure 13**.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait 100%T possède un potentiel anti-radical NO significativement supérieur ($p < 0.05$) à celui exercé par l'extrait 100%R ($53.80 \pm 6.86\%$ vs $42.51 \pm 7.05\%$). D'autre part, une différence significative a été également observée entre l'extrait de racine pur 100%R et le mélange d'extraits 75%R ($57.15 \pm 7.6\%$ vs $42.51 \pm 7.05\%$, $p < 0.01$) ainsi que 50% R/T ($63.99 \pm 4.07\%$ vs $42.51 \pm 7.05\%$, $p < 0.05$). Tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les mélanges d'extraits 75%R et 50% R/T (**Figure 13**).

Pour l'extrait pur de tiges 100%T, aucune différence significative n'a été observée par rapport à l'extrait 75%T ($53.80 \pm 6.86\%$ vs $59.56 \pm 6.47\%$). Par contre, le mélange 50% R/T a révélé un pourcentage de neutralisation du NO, significativement supérieur ($p < 0.05$) à celui obtenu par l'extrait 100%T. Celui-ci n'a montré aucune différence significative par rapport au mélange 50% R/T avec une valeur de $63.99 \pm 4.07\%$.

Le monoxyde d'azote produit à partir du nitroprussiate de sodium dans une solution aqueuse à pH physiologique interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrites, qui ont été mesurés à l'aide du réactif de Griess (Green *et al.*, 1982).

Les acides phénoliques se sont avérés de bons scavengers du radical NO, ceci est dû à la grande capacité des groupements hydroxyles présents au niveau de leurs structures à donner un atome d'hydrogène pour piéger le radicale NO (Atmani *et al.*, 2009). Parallèlement, le mélange de racine avec tige améliore le potentiel anti-NO de racine, cet effet revient probablement à des interactions entre les différentes structures des molécules bioactives contenues dans le mélange par rapport à l'extrait pur.

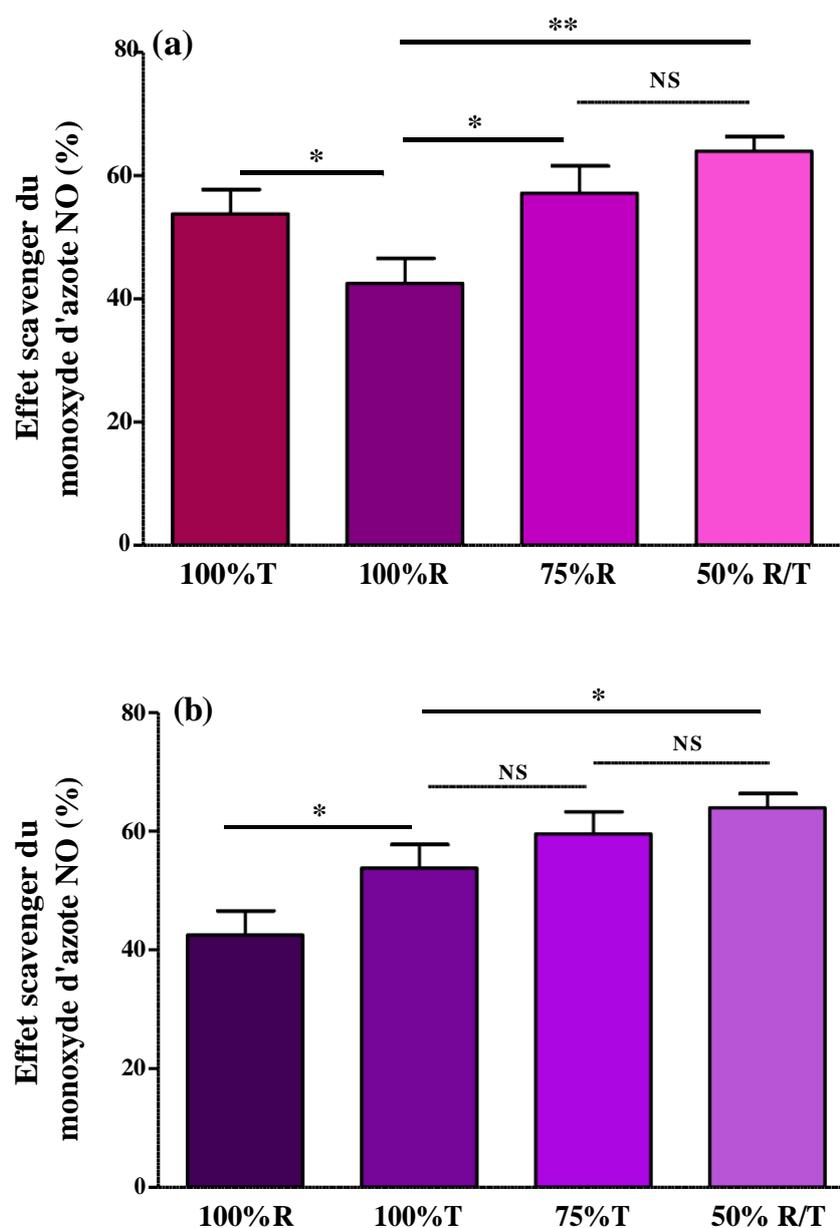


Figure 13: Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les extraits de racines (100%R) et de tiges (100%T) de *Hertia cheirifolia* ainsi que par leurs différents mélanges (75%R, 75%T et 50% R/T). Comparaison à l'extrait de racine (100%R) (a). Comparaison à l'extrait de tige (100%T) (b). (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

Résultats et discussion

Les résultats suggèrent que les extraits des racines de *Heirtia cherifolia* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires (Tepe *et al.*, 2005 ; Aslan *et al.*, 2006).

De Plus, des études ont montré que l'effet antioxydant des substances naturelles est largement dû à leurs composés phénoliques (Yang *et al.*, 2002 ; Nagai *et al.*, 2003). Notre étude le confirme étant donné que les deux extraits purs racine et tige sont une source de ces polyphénols.

L'analyse de corrélation a montré qu'il y a une corrélation négative ($r = - 0.9216$, $p < 0.05$) entre l'activité scavenger du monoxyde d'azote et les teneurs en composés phénoliques contenus dans les différents extraits analysés. Cela veut dire que dans ce cas, plus l'extrait est riche en polyphénols, moins il est puissant dans la neutralisation du NO.

CONCLUSION

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires au développement de futurs médicaments. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

Au cours de ce travail, nous avons évalué le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans différents extraits de *Heirtia cherifolia*. De plus, nous avons étudié l'activité antioxydante par analyse de l'activité scavenger du radical hydroxyl (OH), et l'activité scavenger du monoxyde d'azote (NO).

Les résultats obtenus pour l'analyse quantitative des composés phénoliques et flavonoïdes de la racine et de la tige, ainsi que les mélanges de ces deux extraits montrent la richesse de ces derniers en polyphénols et en flavonoïdes. Le dosage des polyphénols totaux, a révélé que l'extrait de racine pure est le plus riche en polyphénols ($48.91 \pm 3, 49$ mg EAG/g) par rapport aux autres extraits analysés. Par contre, le dosage des flavonoïdes a révélé des contenus similaires entre les extraits analysés.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, les résultats ont montré que l'activité neutralisant le radical NO par le mélange d'extraits 50% R/T est la plus élevée ($63.99 \pm 4.07\%$) par rapport aux extraits purs 100%R ($42.51 \pm 7.05\%$) et 100%T ($53.80 \pm 6.86\%$). Ainsi, les capacités radicaux-libres révélées dans cette étude peuvent être liées directement au contenu des extraits de *Heirtia cherifolia* en polyphénols mais également à la structure de ces composés ainsi qu'aux différentes interactions pouvant exister entre eux.

La plante sélectionnée dans ce travail contient probablement des molécules très intéressantes en tant que substances à pouvoir antioxydant. Elles peuvent à cet effet être employées pour des applications thérapeutiques. Notre étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de cette plante et supporte son intérêt dans le développement pharmaceutique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. (2017). Natural polyphenols : An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8) :1689-1699.
- Abdelouhab K. « Activités anti-inflammatoires et antiarthritiques d'extraits de *Hertia cheirifolia* chez la souris et le rat avec arthrite rhumatoïde expérimentale ». Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 2021.
- Adida H, Benariba N, Bechiri A, Chekroun E, Djaziri R. Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos Scoparius*. *Phytothérapie*. 2015 ;5.
- Akhgar, MR, Shariatif M, Akhgar AR, Moradalizadeh M, Faghihi-Zarandi A. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil from *Hertia intermedia*. *Chem nat Compd* 2012; 48 : 329-33.
- Al Ghouleh I, Khoo NK, Knaus UG, Griendling KK , Touyz RM, Thannickal VJ, et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free radical biology and medicine* 2011;51(7): 1271-1288.
- Algeciras-Schimnich A, Cook WJ, Milz TC, Saenger AK, Karon BS. Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry* 2007; 40: 1311-1316.
- Al-Gubory KH. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod Biomed Online* 2014; 29(1): 17-31.
- Allain P. Extrait de "Les médicaments". CdM Editions, 3ème édition 2008 : 2000-501.
- Amič D, Bešlo D, Trinajstić. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoïdes. *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 *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine* 2009; 16: 1156-1161.
- Arzumanian V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E. Mecanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina* 2003; 39(6): 535-541.
- Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F, Özkan H. Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia*.

- Atmani D, Chaher N, Atmani D, Berboucha M, Debbache N, Boudaoud H. Flavonoids in Human Health : From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science* 2009; 5 : 225-237.
- Attia S, Grissa-Lebdi K, Mailleux AC, Heuskin S, Lognaye G, Hancea T. Acaricidal activities of Santolina Africana and Hertia cheirifolia essential oils against the twospotted spidermite (Tetranychusurticae). *Pest Mang Sci* 2012; 68: 1069-1076.
- Attia S, Grissa-Lebdi K, Raki A, Hance T, Mailleux AC. Persistence de la toxicité de quatre extraits naturels de plantes sur Tetranychus urticae et sa variation avec l'ajout du Tween20. *Tunisian Journal of Plant Protection* 2015 ; 10 : 35-44.
- Awah FM, Verla AW. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of Ocimum gratissimum leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010 ; 4(24) : 2479-2487.
- Baborun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Inkas M, Uycky M., Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim.- Forsch* 1996 ; 46 : 1086-1094.
- Bakchiche B, Gherib A, Smail A, Cutodia G ,Graca M. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products* 2013; 46: 85-96.
- Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120:483-495.
- Barreda, Luis P, Maria CT., Eduardo BO, Ian R., Félix F, Viviana D. Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of Antarctica 2015; 112(35):10989- 10994.
- Beaudoux JL, Vasson MP. Sources des espèces réactives de l'oxygène.in radicaux libres et stress oxydant.sAspects biologiques et pathologiques. Edited by Lavoisier 2005.
- Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology 2004; 61: 461-47.
- Bensakhria, A. Le stress oxydatif. Toxicologie générale 2018 :70-86

- Bentahar A, Khennouf S, Bouaziz A, Djidel S. Phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extracts from *Citrus sinensis* L. and *Citrus reticulata* L. fruits. *Journal of Drug Delivery Therapeutics* 2020; 10(5): 308-313.
- Bento-Silva A, Koistinen VM, Mena P, Bronze MR, Hanhineva K, Sahlstrøm S, Kitrytè V, et al. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? *European Journal of Nutrition* 2020 ; 59:1275-1293.
- Birben E , Murat U, Sahiner MD, Sackesen C, Serpil Erzurum S , Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 2012; 5:9–19.
- Boizot N, Charentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés Phénoliques des organes d'un arbre forestier. INR-Amélioration génétique et physiologie forestière laboratoire d'analyse biochimique. *Le Cahier des Technique de l'Inra* 2006 :79-82.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Khennouf S, Arrar L. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research* 2009; 23(2): 283-288.
- 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's* leaves. *Nat Sci* 2012 ; 4 : 825-831.
- Brand M D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol* 2010; 45: 466-472.
- Burnie G, Forresster S, Greig D, Guest S, Harmmony M, Hobley S, Jackson G, et al. *Botanica, Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Paris 2006; 120-626.
- Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera- Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona- Aparicio L, Coballase-Urrutia E. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14:1455-1476.
- Carocho M, Ferreira P. Morales, and M. Soković. Antioxidants and prooxidants: effects on health and aging, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 2
- Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z., Wan SB., Lam WH., Chan TH, Dou QP. Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci* 2004 ; 9 : 2618.

- D'Archivio MC, Filesi R, Di Benedetto R, Gargiulo C, Giovannini, et Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Supe. Sanita* 2007; 43(4) 348– 361.
- De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses* 2013; 5(2) : 708-731.
- Delattre J, Beaudeau JL, Rousselot B. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris 2005 ; 14: 93-94.
- Descamps E, Gele P, Bordet R, Vamecq J. Modulation Pharmacologique du Stress Oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue* 2006 ; 20:4.
- *divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella*. *Journal of Pharmaceutical Biology* 2006;44: 247-252.
- El-Demerdash FM, Tousson EM, Kurzepa J, Habib SL. Xenobiotics oxidative stress, and antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2018.
- Enami S, Sakamoto Y, Colussi AJ. Fenton chemistry at aqueous interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111(2): 623-628.
- Erdman JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman p, et al. Flavonoids and Heart Health Proceedings of the ILSI North America Flavonoids workshop . *The Journal of Nutrition* 2007; 137(3) : 718S-737S
- Favier A. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. 2003 : 108-115.
- Fleuriot A, Deloire A. Histochemical and Biochemical Aspects of Cicatrization of Tomato Fruit Lesions. *Zeitschrift für Pflanzen physiologie* 1982 ; 107(3) : 259-268.
- Georgieva S, Boyadzhiev L, Angelelov G. Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydante. *Revue de génie industriel* 2010 ; (5) :124-132.
- Ghedira k. Les flavonoïdes : structure propriétés biologiques rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 2005 ; 3 : 162-169.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem* 1982 ; 126 :131-138.
- Haleng J, Pincemail JO, Defraigne C, Charlier JP, CHaPelle. Le stress oxydant 2007; 628-638.

- Halliwell B and Gutteridge J M C .Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford 2007.
- Halliwell B and M Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?.*Brazilian Journal of Pharmacology* 2004; 142(2): 231-255.
- Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 2006 ; 141(2): 312-322.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology et Medicine*, 1994 ; 16(6) : 845-850.
- King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J of the American dietetic association* 1999; 99:213-218.
- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry* 2007.45: 244-249.
- Lai YJ, Tsai SH, Lee MY. Isolation of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties. *Food Science and Biotechnology* 2014; 23(4): 1231-1236.
- Le K, Chiu F, Ng K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 2007; 105(1): 353-363.
- Lee J, Koo NS, Min DB. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2004 ; 3(1) : 21-33.
- Leverve X. Stress oxydant et antioxydants *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 2009; 44(5) : 219-224.
- 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.
- Liguori I, Russo G , Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D1 , Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–772

- Lynch MP, Faustman C, Silbart LK, Rood D, Furr HC. Detection of Lipid-Derived Aldehydes and Aldehyde: Protein Adducts In Vitro and in Beef. *Journal of Food Science* 2001; 66(8): 1093-1099.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P. Composés Phénoliques dans la Plante-Structure, Biosynthèse, Répartition et Rôles ; in : « Les Polyphénols en Agroalimentaire ». Techniques et Documentation. *Lavoisier Paris* 2006 ; 1-27.
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue Nature et Technologie* 2013 ; 9: 35-40.
- Majouli K, Hamdi A, Besbes Hlila M Phytochemical analysis and biological activities of *Hertia cheirifolia* L. roots extracts. *Asian J Trop Med* 2017; 10: 1134-1139.
- Malbert Y. Flavonoid glucodiversification with engineered sucrose-active enzymes. thèse de doctorat, INSA de Toulouse 2014.
- Massiot G, Nuzillard JM. Le Men-Olivier L, Aclinou P, Benkouider A, Khelifa A. Eremophilanolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry* 1990 ; 29 :2207-2210.
- Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009; 674(1-2):36-44.
- Merouane A, Noui A, Medjahed H, Nedjari Benhadj Ali K, Saadi A. Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci* 2014 ; 8(4):1865-1870.
- Mohammedi Z, Atik, F. Impact of solvent extraction type on total polyphénols content and biological activity from *Tamarix phylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2011; 2(1): 609-615.
- Monien B H, Henry B L, Raghuraman A, Hindle M, Desai U R. Novel chemo-enzymatic oligomers of cinnamic acids as direct and indirect inhibitors of coagulation proteinases. *Bioorganic and medicinal chemistry* 2006; 14(23): 7988-7998.
- Nadour M, laroche c, pierre G, Delattre C, moulti-mati F, Michaud P. Structural characterization and biological activities of polysaccharides from olive mill wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology* 2015; 177:431-445.

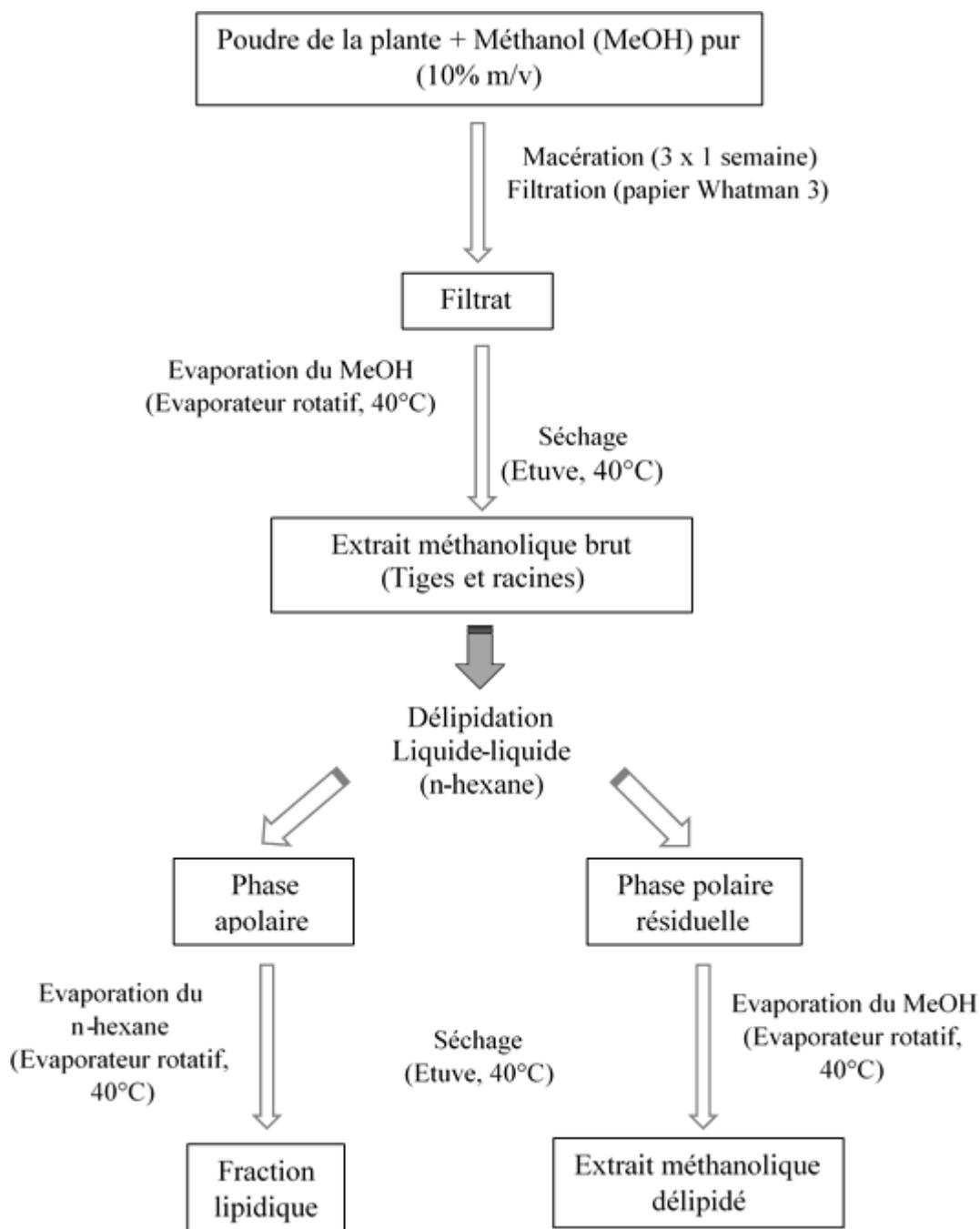
- Nagai T, Reiji I, Hachiro I, Nobutaka S. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry* 2003 ; 80 : 29–33.
- Ngom, S, Diop M, Mbengue M, Kornprobst JM., Samb A. Composition chimique et propriétés antibactériennes des huiles essentielles d’Ocimum basilicum et d’Hyptis suaveolens (L.) Poit récoltés dans la région de Dakar au Sénégal. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie* 2014 ; 10(4) : 109-117.
- Nijveldt R, Nood JE, Hoorn DE, Boelens PG, Norren K, Leeuwen P. Flavonoids a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 74: 418-425.
- O’Mahony JA, Fox PF, Kelly A L. Indigenous Enzymes of Milk BT - Advanced Dairy Chemistry. Proteins. Basic Aspects 2013; 1:337-385.
- Oroian M., Escriche I. Antioxidants Characterization Natural sources extraction and analysis. *Food Research International* 2015 ; 74 :10-36.
- Pan D, Mei X. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers* 2010; 80(3): 908-914.
- Park HJ, Cha HC. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society* 2003; 7: 327-330.
- Peña-Bautista C, Baquero M, Vento M, Chafer-Pericas C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta* 2019; 491: 85-90.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Pharm* 2015; 54-62.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* 2015;30(1):11-26
- Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000; 63(7) : 1035- 1042.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : Nutrition clinique et métabolisme 2002 ; 16 : 233-239.
- Pisoschi AM, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015 ;97 : 55-74.
- Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS Paris, 1963

- 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. *Ind J Pharm Edu Res* 2011; 45:310-316
- Rosenfeld MA, Vasilyeva AD, Yurina LV, Bychkova AV. Oxidation of proteins: is it a programmed process. *Free Radic Res* 2018; 52(1): 14-38.
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma PA. Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *International Pharmaceutica Scientia* 2011; 1(1): 25-41.
- Scalbert A. Fruits et légumes, polyphénols et santé. Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 2004.
- Sennequier N, Vadon-Le-Goff S. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): Mécanisme, regulation et controle. *Médecine/sciences* 1998 ; 14 : 1185-1195.
- Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006 ; 67 : 2058-2070.
- Sharma P, Bhuchan jha A, Dubey shanker R, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012; 1-26.
- Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, Neri LM. Oxidative stress: Role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* 2018; 9(24) :17181–17198.
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecule* 2019; 4(8): 1583.
- 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.
- Starlipper CE, Ketola HG, Noyes AD, Schill WB, Henson FG, Chalupnicki MA, Dittman DE. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research* 2015; 6(1): 89-97.

- Su D, Zhang R, Hou F, Zhang M, Guo J, Huang F, Wei Z. Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; 14 (1).
- Tang SY, Halliwell B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201; 394:1-5.
- Tapiero H, Tew KD, Nguyen BG, Mathé G. Polyphenol do they play a role in the prevention of the human pathologies *Biomed.pharmacothé.* 2002; 56: 200-207.
- Taviano M F, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De-Pasquale R. and Miceli N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 58: 2229.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 2005; 90:333-340.
- Tokarz P et Kaarniranta K. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). 2013: 461– 482.
- Tsai YC, Wang YH, LiuvYC. Overexpression of PCNA Attenuates Oxidative Stress Caused Delay of Gap-Filling during Repair of UV-Induced DNA Damage. *J Nucleic Acids* 2017: 8154646.
- Tsumbu CN, DEBY-Dupont G, Tits M, Angenot L, Frederich M, Kohnen S, et al. Polyphenol Content and Modulatory Activities of Some Tropical dietary Plant Extracts on the Oxidant Activities of Neutrophils and Myeloperoxidase. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13:628-650.
- Valko M., Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T D, Mazur M Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.
- Van Houten B, Santa-Gonzalez GA, Camargo M. DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Curr Opin Toxicol* 2019; 7: 9-16.

- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network an Overview. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10(14): 1677-1694.
- Walters S, Judd CS, Campbell EA, Kellogg PS. Botanique systématique une perspectivesystématique. De boeck supérieur. France 2002.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzymeexpression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004; 44(4): 381-6.
- Yang JH, Lin HC, Mau JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 2002 ; 77 : 229-235.
- Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1850(8):1607-1621.
- Yusuf, Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science Technology* 2006 ;17(2) :64-71.
- Zaouali Y, Bel-Hadj YI, Jaouadi R, Messaoud C , Boussaid M. Sex-related differences in essential oil composition, phenol contents and antioxidant activity of aerial parts in *Pistacia lentiscus L. during seasons*. *Industrial Crops & Products* 2018; 121: 151-159.
- Zbadi R, Mohti H, Moussaoui F. Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine translationnelle* 2018 ; 24(2) : 134-141.
- 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.

ANNEXE



Procédure d'extraction et de délipidation à partir des tiges et racines de *Hertia cheirifolia* L.
(Abdelouhab, 2021).

Résumé

Hertia cheirifolia est une plante médicinale appartenant à la famille des Asteraceae largement utilisée en médecine traditionnelle en méditerranée. La présente étude a été réalisée sur deux extraits purs de tiges (100%T) et de racines (100%R) ainsi que sur leurs mélanges 75%R, 75%T, et 50% R/T. L'objectif était de quantifier les composés phénoliques et d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de ces extraits. D'abord, l'évaluation du contenu en polyphénols a démontré que la teneur la plus élevée est contenue dans l'extrait 100% R (48.90 ± 3.49 mg EAG/g). L'analyse de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical NO a révélé que le mélange des deux extraits 50% R/T possède la capacité antioxydante la plus élevée ($63.99 \pm 4.07\%$). par rapport aux autres extraits analysés. L'ensemble de ces résultats indique que les extraits de tige et de racine de la plante *Hertia cheirifolia* présentent de très bonnes propriétés antioxydantes liées probablement à leur contenu en polyphénols

Mots clés : *Hertia cherifolia*, polyphénols, activité antioxydante, radical hydroxyle, monoxyde d'azote.

Abstract

Hertia cheirifolia is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family. It is widely used in the mediterranean traditional medicine. The present study was performed on two pure extracts of stems (100%S) and roots (100%R) as well as on their mixtures 75%R, 75%S, and 50% R/S. The objective of this study was to evaluate the phenolic content and the antioxidant activity of these extracts *in vitro*. Firstly, the evaluation of the polyphenol content showed that the highest amount is contained in the 100%R extract (48.90 ± 3.49 mg EAG/g). The analysis of the antioxidant activity towards the NO radical revealed that the mixture of the two extracts 50% R/S has the highest antioxidant capacity ($63.99 \pm 4.07\%$). These results indicate that the stem and root extracts of the plant *Hertia cheirifolia* displayed a very good antioxidant properties probably related to their polyphenol content.

Key words : *Hertia cherifolia*, polyphenols, antioxidant activity, hydroxyl radical, nitric oxide.

